

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

LUCIANA TELES CARNEIRO

EFEITO MODULADOR DA OUABAÍNA NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

JOÃO PESSOA – PB

2011

LUCIANA TELES CARNEIRO

EFEITO MODULADOR DA OUABAÍNA NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

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

2011

C289e Carneiro, Luciana Teles.

Efeito modulador da ouabaína no sistema imunológico / Luciana Teles Carneiro.-
- João Pessoa : [s.n.], 2011.
104f. : il.

Orientadora : Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Dissertação(Mestrado) – UFPB/CCS.

1.Farmacologia. 2.Ouabaína. 3.Modulação. 4.Linfócitos.

LUCIANA TELES CARNEIRO

EFEITO MODULADOR DA OUABAÍNA NO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Dissertação de Mestrado submetida à aprovação pelo 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 concentração: farmacologia, após aprovação pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB
(Orientadora)

Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros
Departamento de Morfologia – UFRN
(Examinador Externo)

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
Departamento de Fisiologia e Patologia - UFPB
(Examinador Interno)

Aprovado em _____

Dedico este trabalho aos meus pais Lucília Maria Teles Carneiro e Metódio Vaz Carneiro, pelo apoio, companheirismo e Amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir, nesta caminhada, o ensinamento da fé, da perseverança e da crença em mim mesma e na vida.

Aos meus amados pais Lucília Maria Teles Carneiro e Metódio Vaz Carneiro, por toda compreensão, Amor e carinho a mim dedicados em cada momento desta nossa conquista.

À minha irmã e amiga Virgínia Teles Carneiro: a distância física não foi impedimento para que eu sentisse todo o seu apoio. Senti você ao meu lado em cada instante.

Ao meu namorado Alex Barbosa Carvalho por todo o companheirismo, Amor e paciência nos momentos de angústia e inquietude. Obrigada por sempre me lembrar, mesmo nos momentos mais difíceis, de que está tudo bem.

À amiga Indayá Machado: o seu exemplo de amorosidade e força e as nossas “conversas casuais”, que sempre me lembravam da vida e da alegria que carrego em mim, foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui. Essa conquista também é sua!

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas, por me orientar, incentivar e, principalmente, por me dar a oportunidade de trilhar um aprendizado tão importante para o meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam, por me permitir participar das atividades do seu laboratório e do grupo de estudo. Obrigada pela credibilidade a mim dispensada!

Às integrantes da banca examinadora Dra. Márcia Regina Piuvezam, Dra. Karina Carla Paula de Medeiros e Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos pela gentileza e atenção ao aceitarem avaliar este trabalho.

Às amigas Jacqueline Alves Leite, Juliana Silva Brandi Oliveira e Anne Kaliery de Abreu Alves pela amizade e companheirismo de todos os momentos: carregarei os ensinamentos de bondade e amizade verdadeiras que vocês me proporcionaram em todos os meus dias. Obrigada por tornarem esta caminhada mais leve!

Aos meus companheiros do Laboratório de Imunologia do LTF/UFPB: Pr Dr. Cláudio Roberto Bezerra dos Santos, Josenilson Feitosa de Lima, Hermann Ferreira da Costa, Gabrielle Dermanny Gualberto Gondo, Matheus Marques Guerra Dutra, Danielle Ingrid Bezerra Vasconcelos, Airla Laana Medeiros, Priscila Jacob, Adriano Alves, Laércia Karla, Laiz Aline, Giciane Carvalho Vieira, Renata Costa, Jessica de Sá Barreto Callou Peixoto, Fagner Carvalho Leite, Ítalo Gregório de Oliveira e Jaime Ribeiro Filho pela disponibilidade de assistência e auxílio sempre presentes.

Aos primeiros amigos do LTF/UFPB Aurylene Carlos e Sócrates Gólzio pelo incentivo e encorajamento iniciais a não desistir e seguir em frente na busca dos meus objetivos.

Aos funcionários do LTF/UFPB José Crispim Duarte, Luiz Cordeiro da Silva e Mônica Rodrigues da Silva: a ajuda, a disponibilidade e as atividades por vocês exercidas são indispensáveis na realização e conclusão de todos os trabalhos desta Pós-Graduação. Muito obrigada por tudo!

Aos professores da Pós-Graduação Dr. Demétrius Antônio de Araújo Machado, Dr. Luís César Rodrigues, Dr. Josean Fachine Tavares, Dr. José Maria Barbosa Filho, Dra. Celidarque da Silva Dias, Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Dra. Mariana Vieira Sobral Castello Branco, Dra. Leônia Maria Batista, Dra. Bagnólia Araújo da Silva, Dr. Isac Almeida de Medeiros, Dr. Rui Oliveira Macedo e Dra. Maria de Lourdes Pereira pela contribuição para o meu aprendizado acadêmico.

A todos os colegas de outros laboratórios do LTF/UFPB e das disciplinas cursadas nesta Pós-Graduação pela ajuda e convivência.

À UFPB e ao LTF pelo apoio técnico e estrutural na realização deste trabalho.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só
se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância
das pessoas que passam por suas vidas.

Clarice Lispector

RESUMO

Inicialmente, conhecida como um esteróide cardiotônico e por sua propriedade de inibir a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, a ouabaína foi identificada como uma substância endógena presente no plasma humano, produzida pela adrenal, hipófise e hipotálamo e capaz de interferir em vários aspectos da resposta imune. Neste trabalho, que teve como objetivo estudar o efeito modulador da ouabaína no sistema imunológico *in vivo* e *in vitro* por meio de modelos murinos, demonstrou-se que o tratamento por três dias consecutivos com ouabaína utilizando a dose de 0,56 mg/kg foi capaz de reduzir a migração celular induzida pelo mitógeno Concanavalina A (Con A) para o peritônio, sendo este fato reflexo da redução do número de leucócitos polimorfonucleares, principalmente, neutrófilos. Neste mesmo modelo, a ouabaína também foi capaz de aumentar o número de leucócitos mononucleares no lavado peritoneal. Avaliando-se o efeito desse tratamento no perfil linfocitário de órgãos periféricos, encontrou-se que, em linfócitos de linfonodos mesentéricos, esta substância induz a uma diminuição de 20% de linfócitos T CD3^+ , concomitante a um aumento de mesmo percentual de linfócitos B, sem, no entanto, modular a proporção de linfócitos TCD4^+ e CD8^+ entre si, bem como o número de células T regulatórias ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$). No timo, o mesmo tratamento com a ouabaína não interfere na proporção das subpopulações linfocitárias estudadas. As análises qualitativas e quantitativas de leucócitos do sangue periférico, da biometria e celularidade do baço, timo e linfonodos mesentéricos não apresentaram alteração em resposta ao tratamento com a ouabaína. Estudos comparativos utilizando tratamentos de um ou dois dias, com a mesma dose de 0,56 mg/Kg não desencadearam modulação, *in vivo*, nas populações de linfócitos T, linfócitos B e das subpopulações de linfócitos TCD4^+ e CD8^+ nos linfonodos mesentéricos. Adicionalmente, a ouabaína foi capaz de inibir a atividade mitocondrial de linfócitos estimulados com Con A, por meio do ensaio de MTT. Estes resultados indicam um papel imunomodulador da ouabaína.

Palavras-chave: Ouabaína. Modulação. Linfócitos.

ABSTRACT

Initially known as a cardiotonic steroid capable to inhibit the $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, ouabain was identified as an endogenous substance present in human plasma, produced by the adrenal, pituitary and hypothalamus and can interfere with various aspects of immune response. In this study, which aimed to study the modulating effect of ouabain on the immune system *in vivo* and *in vitro* using mouse models, we demonstrated that treatment for three consecutive days using 0,56 mg/kg ouabain was able to reduce cell migration induced by mitogen Concanavalin A (Con A) to the peritoneum, and this fact reflects a decrease in the number of polymorphonuclear leukocytes, mainly neutrophils. In this same model, ouabain was also able to increase the number of mononuclear leukocytes in the peritoneal cavity. Evaluating the effect of treatment on lymphocytes in peripheral organs, we found that, in lymphocytes from mesenteric lymph nodes, this substance induces a decrease of 20% of T CD3^+ lymphocytes, concomitant with an increase in same percentage of B lymphocytes, without, however, modulating the proportion of CD4^+ and CD8^+ among themselves, as well as the number of regulatory T cells ($\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$). In the thymus, the same treatment, does not affect the proportion of lymphocyte subpopulations studied. The analysis qualitative and quantitatively of peripheral blood leukocytes, biometrics and cellularity of spleen, thymus and lymph nodes showed no change in response to ouabain treatment. Comparative studies using treatment for one or two days, with the same dose of 0,56 mg/kg did not trigger modulation, *in vivo*, in populations of T lymphocytes, B lymphocytes and subpopulations of CD4^+ and CD8^+ cells in mesenteric lymph nodes. In addition, ouabain was able to inhibit mitochondrial activity of lymphocytes stimulated with Con A, using MTT assay. These findings indicate an immunomodulatory role of ouabain.

Keywords: Ouabain. Modulation. Lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos órgãos linfóides.....	17
Figura 2. Representação interna da medula óssea.....	18
Figura 3. Representação esquemática da distribuição dos linfonodos em camundongos.....	20
Figura 4. Mecanismos envolvidos na ação dos neutrófilos na resposta inflamatória.....	22
Figura 5. Estrutura química da ouabaína.....	24
Figura 6. Esquema da estrutura molecular da Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	25
Figura 7. Análise do sangue periférico.....	45
Figura 8. Proporção das populações de linfócitos T e B nos linfonodos mesentéricos de animais tratados com ouabaína.....	50
Figura 9. Proporção das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos linfonodos mesentéricos (LM) e no timo.....	52
Figura 10. Proporção das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ , CD25 e CD4 ⁺ /CD25, presentes nos linfonodos mesentéricos (LM) e no timo.....	54
Figura 11. Proporção das populações de linfócitos T e linfócitos B e subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em animais tratados com ouabaína por um ou dois dias em linfonodos mesentéricos.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da ouabaína (OUA) na contagem total de células 24h após peritonite induzida por Concanavalina A (Con A).....	42
Gráfico 2. Efeito da ouabaína na contagem diferencial de leucócitos 24h após peritonite induzida por Concanavalina A (Con A).....	43
Gráfico 3. Contagem de leucócitos do sangue periférico.....	46
Gráfico 4. Biometria dos órgãos linfóides.....	48
Gráfico 5. Celularidade dos órgãos linfóides.....	48
Gráfico 6. Efeito da ouabaína no ensaio de viabilidade por MTT em cultura celular de linfonodos mesentéricos estimulados por Concanavalina A (Con A).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: alofococianina

ATP: trifosfato de adenosina

CCL19 e CCL21: quimiocinas produzidas por células de órgãos linfóides periféricos com função de atrair células T

CCR7: receptor para quimiocina CCL21 nas células T

CD: marcador de diferenciação

CON A: concanavalina A

CXCL13: quimiocina que atrai as células B e as células T ativadas em órgãos linfóides periféricos

CXCR5: receptor presente em células de órgãos linfóides periféricos

DMSO: dimetilsulfóxido

EGF: fator de crescimento epidermal

FITC: isotiocianato de fluoresceína

IL: interleucina

LPS: lipopolissacarídeo bacteriano

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

mCD14: receptor presente em monócitos

Na⁺/K⁺ ATPase: sódio-potássio ATPase

NF-κB: complexo protéico que desempenha funções de fator de transcrição celular

NFAT: fator nuclear de células T ativadas

OUA: ouabaína

RPML: Roswell Park Memorial Institute

PBS: tampão salina fosfato

PE: ficoeritrina

SAL: grupo salina

SFB: soro fetal bovino

TCR: receptor de célula T

TNF: fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Breve descrição do Sistema Imunológico e órgãos linfóides.....	16
1.2 Inflamação.....	21
1.3 Ouabaína.....	24
1.3.1 Efeito de ouabaína no sistema imunológico.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Material.....	33
3.1.1 Animais.....	33
3.1.2 Regentes e soluções.....	33
3.1.3 Equipamentos.....	34
3.2 Métodos.....	35
3.2.1 Tratamento <i>in vivo</i> com ouabaína.....	35
3.2.2 Peritonite induzida por Concanavalina A.....	35
3.2.3 Contagem total e diferencial das células obtidas do lavado peritoneal.....	36
3.2.4 Obtenção e coloração do sangue periférico.....	37
3.2.5 Biometria e celularidade do baço, timo e dos linfonodos mesentéricos.....	37
3.2.6 Análise das populações de linfócitos T, linfócitos B e subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ por meio de marcação de antígenos de superfície.....	38
3.2.7 Ensaio de viabilidade por MTT em cultura celular.....	38
3.2.8 Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Efeito de ouabaína na peritonite induzida por Concanavalina A.....	41
4.2 Análise do sangue periférico de animais tratados com ouabaína.....	44
4.3 Avaliação do peso e celularidade dos órgãos linfóides de animais tratados com ouabaína.....	47
4.4 Efeito da ouabaína na proporção subpopulações de linfócitos T e B nos linfonodos mesentéricos.....	49

4.5 Efeito da ouabaína nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos linfonodos mesentéricos e do timo.....	51
4.6 Efeito da ouabaína na subpopulação de linfócitos T CD4⁺/CD25, presente nos linfonodos mesentéricos e no timo.....	53
4.7 Efeito da ouabaína no ensaio de viabilidade por MTT em cultura celular de linfócitos provenientes dos linfonodos mesentéricos.....	55
4.8 Análise das populações de linfócitos T e B nos linfonodos mesentéricos de animais tratados com ouabaína por um ou dois dias.....	57
5. DISCUSSÃO.....	59
6.CONCLUSÕES.....	66
7. PERSPECTIVAS.....	68
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS.....	79
ANEXO A - Artigo submetido ao periódico Mediators of inflammation.....	80
ANEXO B – Certidão do Conselho de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) nº 0407/08.....	99
ANEXO C - Resumos publicados nos Anais do XXXV Congresso of the Brazilian Society of Immunology.....	100
ANEXO D - Resumo publicado nos Anais da 62 ^a Reunião Anual da SBPC.....	102
ANEXO E - Resumo publicado nos Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.....	103
ANEXO F - Resumo publicado nos Anais do XXXIV Congresso of the Brazilian Society of Immunology.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve descrição do Sistema Imunológico e órgãos linfóides

Atualmente, o sistema imunológico é considerado um mantenedor da homeostase fisiológica do organismo. No entanto, por muito tempo foi classificado como um sistema de defesa, e como tal, caracteriza-se pela produção de anticorpos e amplificação da resposta inflamatória, desencadeando processos de inativação, isolamento, eliminação do agente infeccioso e restauração de tecidos lesados durante tais eventos (RUMJANEK; PIUVEZAM; RODRIGUES-MASCARENHAS, 2006).

A resposta imune ocorre imediatamente após a exposição do indivíduo a um agente infeccioso ou inflamatório. No entanto, em casos em que há necessidade de reconhecimento de patógenos a resposta imune desenvolve-se de forma a construir uma imunidade protetora que impeça uma reinfecção. Uma das células envolvidas nas diversas fases dessa resposta é o linfócito, que se subdivide em duas categorias: os linfócitos T e os linfócitos B (DOAN *et al.*, 2006).

Estas células são capazes de reconhecer e responder a diversos microorganismos por meio de receptores de antígenos com alto grau de especialização presentes na superfície da membrana plasmática. Esses receptores são denominados de receptores de células T (TCRs) ou receptores de células B (BCRs) (SHARON, 2000).

Os linfócitos T apresentam em sua superfície celular grupos de diferenciação (CD) que indicam sua capacidade funcional, a exemplo do complexo CD3, formado de várias proteínas e associado ao TCR; do CD4, que reconhece as regiões não polimórficas dos complexos principais de histocompatibilidade (MHC) de classe II e do CD8, que, por sua vez, reconhece as regiões não polimórficas dos complexos MHC de classe I. Aos receptores das células B, associam-se moléculas de superfície como o B220, também chamado CD45RO (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

Os linfócitos originam-se na medula óssea e no timo (órgãos linfóides primários ou geradores) e posteriormente há um direcionamento destas células para os órgãos linfóides secundários ou periféricos, como os linfonodos e o baço, locais onde as respostas dos linfócitos aos antígenos são iniciadas e desenvolvidas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). A distribuição desses tecidos encontra-se ilustrada na Figura 1.

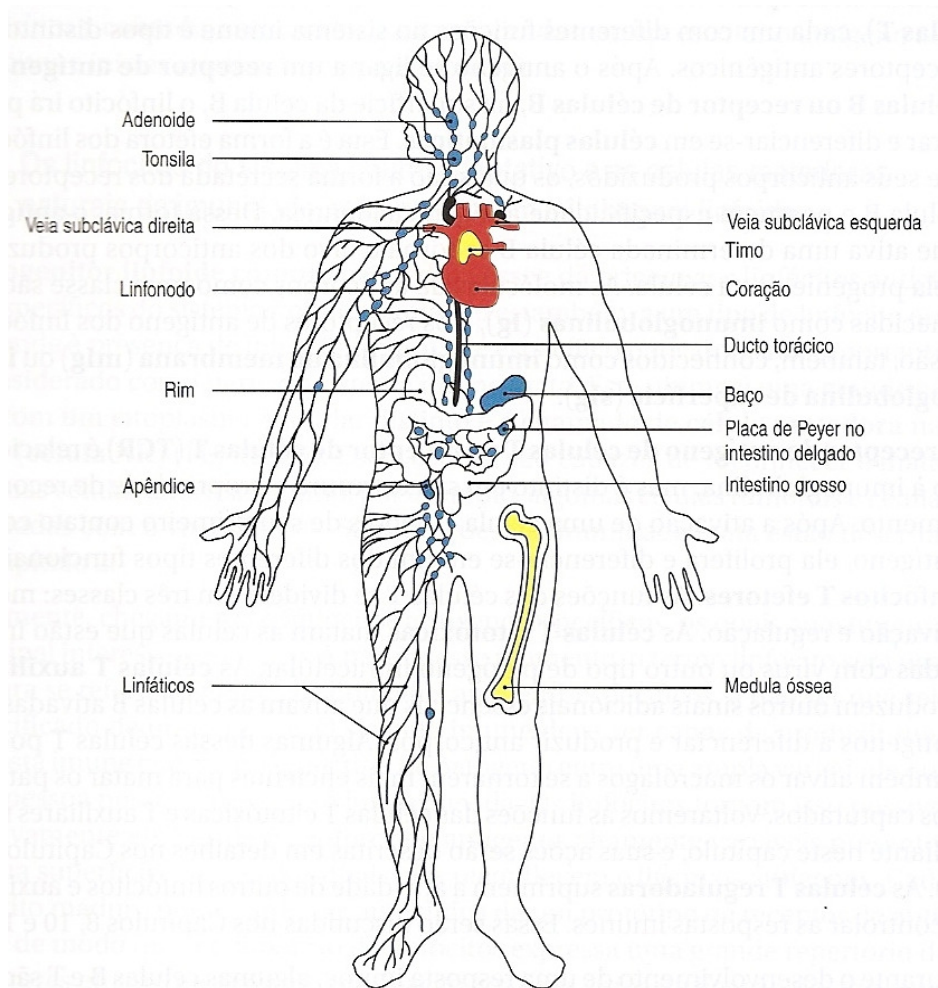


Figura 1. Distribuição dos órgãos linfóides no corpo humano. Retirado de MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010.

A medula óssea é um tecido gelatinoso, situado na cavidade interna de vários ossos, com função hematopoética, onde células-tronco dão origem aos elementos celulares do sangue, entre os quais os eritrócitos, monócitos, leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e linfócitos (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

Na medula óssea, os linfócitos B, situados inicialmente em um região chamada endóstio, sofrem processos de diferenciação e maturação caracterizados por rearranjo e expressão gênica de imunoglobulinas localizadas na superfície celular e correspondente aos receptores. Após tais etapas, as células B deixam a medula óssea por meio do seio central (Figura 2) (SHARON, 2000).

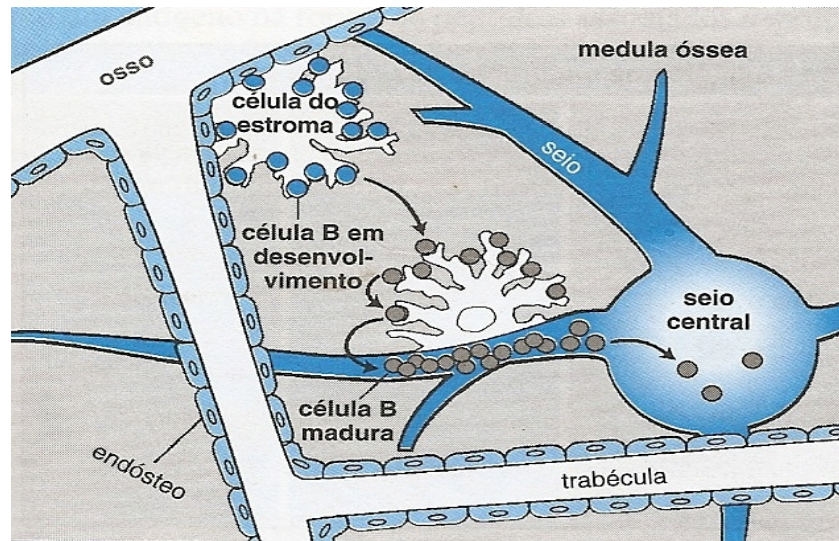


Figura 2. Representação interna da medula óssea. Retirado de SHARON, 2000.

Situado no tórax e formado por massa irregular, o timo cresce após o nascimento, atinge seu tamanho máximo na puberdade e a seguir começa a involuir, entretanto, sem perder a sua função (DÂNGELO & FATTINI, 2002).

Precusores de células T, provenientes da medula óssea, migram para o timo e são denominados timócitos. Neste local, processos de seleção tímica desencadeiam a maturidade fenotípica e funcional destas células (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

O baço reúne funções hematológicas e linfóides devido às suas propriedades de remoção de substâncias particuladas do sangue e de concentrar antígenos e microorganismos transportados pelo sangue. Anatomicamente, neste órgão, os linfócitos ficam concentrados em uma região denominada polpa branca, ao redor de artérias e arteríolas, de modo que os linfócitos T encontram-se imediatamente adjacentes a estes vasos e os linfócitos B situam-se mais profundamente (DOAN *et al.*, 2006).

Os linfonodos são pequenos órgãos nodulares interpostos em toda a extensão dos canais linfáticos ao longo do corpo. À medida que, durante o processo circulatório, o plasma extravasa em direção aos vasos linfáticos, as células com propriedades de capturar e apresentar antígenos aos linfócitos retêm partículas antigênicas microbianas, impedindo que estas retornem ao sangue e desencadeando respostas imunes (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

A distribuição dos linfócitos T e B nos linfonodos depende da ação de quimiocinas. De maneira geral, as células T *naïves* expressam um receptor denominado CCR7 que tem afinidade com as quimiocinas CCL19 e CCL21 produzidas nas zonas de células T do linfonodo (região cortical parafolicular), enquanto as células B *naïves* expressam um outro receptor, o CXCR5, o qual reconhece a quimiocina CXCL13, produzida apenas nos folículos, encontrados na zona cortical dos linfonodos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Para fins de pesquisa, os camundongos são os animais mais utilizados na investigação imunológica, entre outras coisas, devido à semelhança na distribuição dos órgãos linfóides, a exemplo dos linfonodos (Fig. 3), na resposta imunológica, bem como pela possibilidade de realização de técnicas cirúrgicas e de recombinação gênica (PASTORET *et al.*, 1998).

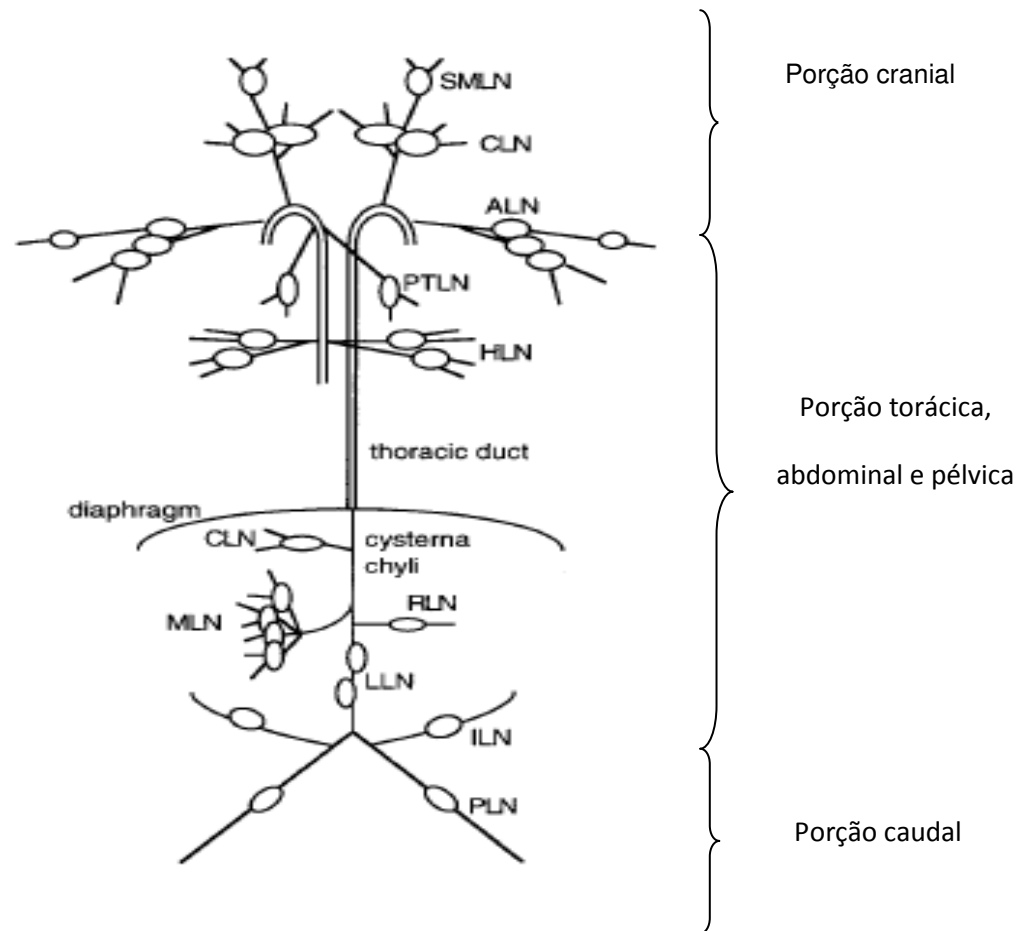


Figura 3. Representação esquemática da distribuição dos linfonodos em camundongos, onde: ALN: linfonodos axilares ; CLN: linfonodos abdominais; HLN: linfonodos hilares; ILN: linfonodos inguinais ; LLN: linfonodos lombares; MLN: linfonodos mesentéricos; PLN: linfonodos poplíteos; PTLN: linfonodos paratímicos; RLN: linfonodos renais e SMLN: linfonodos submandibulares. Modificado de PASTORET *et al.*, 1998.

1.2 Inflamação

A maioria dos agentes infecciosos é capaz de desencadear uma resposta inflamatória. Neste processo, a invasão tecidual ativa os macrófagos e mastócitos, que por sua vez produzem citocinas e quimiocinas (citocinas quimioatrativas). As citocinas podem atuar em células vizinhas (a exemplo da diminuição da adesão das células endoteliais) e as quimicinas atraem outras células da corrente sanguínea para o sítio inflamado, como, em um primeiro momento, os neutrófilos e monócitos (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

Os macrófagos e neutrófilos são células inflamatórias presentes na fase inicial de tal resposta. Além disso, ambos possuem receptores de superfície para constituintes bacterianos e têm grande atividade na captura e destruição de agentes invasores. Nessa etapa, também ocorre o influxo de monócitos, que se diferenciam em macrófagos, reforçando e mantendo o processo inflamatório (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A ação inicial dos neutrófilos é facilitada por mecanismos de estase e vasodilatação característicos do processo inflamatório. Após serem estimulados a migrar para o sítio inflamado, estes leucócitos desenvolvem respostas que envolvem as fases de marginação, rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia (Fig. 4).

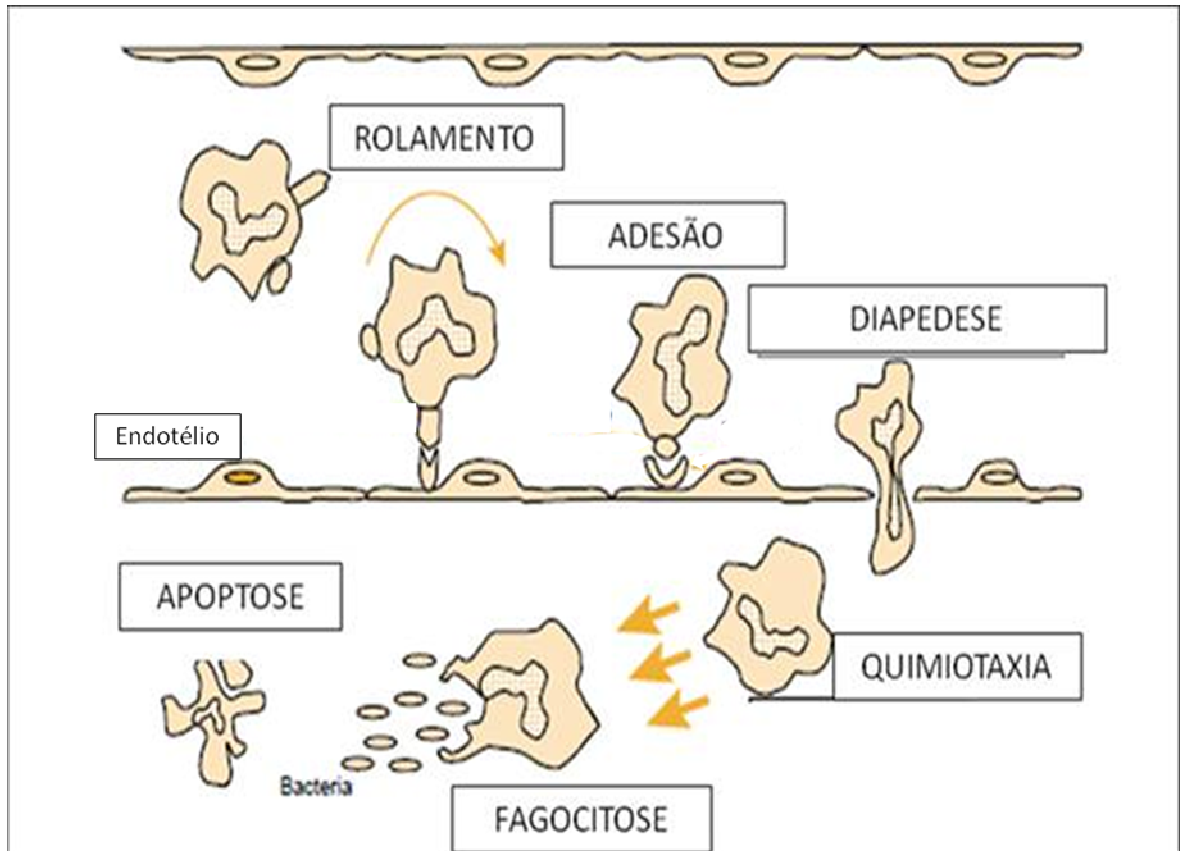


Figura 4. Mecanismos envolvidos na ação dos neutrófilos na resposta inflamatória. Retirado e adaptado de SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004.

A resposta inflamatória representa um complexo processo de interações biológicas e bioquímicas entre células do sistema imunológico e uma infinidade de mediadores biológicos, de forma que três eventos ocorrem durante esta resposta: o aumento significativo do fluxo sanguíneo, o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos para os tecidos circundantes ao local da lesão (RANKIN, 2004).

A inflamação pode se caracterizar por alguns sinais clínicos, denominados sinais flogísticos: calor, dor, rubor e edema. Na minoria dos casos, também pode ocorrer a perda da função. A dilatação e o aumento da permeabilidade vascular acarretam o aumento do fluxo sanguíneo local e o extravasamento de fluido para os espaços intersticiais causando o calor, o rubor e o inchaço (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A lesão tecidual ativa uma série de reações proteolíticas que levam à formação da bradicinina: um peptídeo que atua localmente produzindo dor,

vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e síntese de prostaglandinas (WACHTFOGEL; DeLa CADENA; COLMAN, 1993).

As prostaglandinas e os leucotrienos contribuem de maneira expressiva com os sinais e sintomas da inflamação. As prostaglandinas aumentam acentuadamente a formação do edema e a infiltração leucocitária ao induzir o aumento do fluxo sanguíneo ao local da lesão, bem como potencializam a atividade da bradicinina na produção da dor. Os leucotrienos, por sua vez, desencadeiam respostas sobre a permeabilidade vascular e têm ação quimiotrante para leucócitos polimorfonucleares (SAMUELSSON, 1983).

A atividade das citocinas modula de forma determinante a resposta inflamatória. Um exemplo clássico é o TNF- α , liberado principalmente por macrófagos logo após a lesão, iniciando mecanismos de defesa antimicrobiana e ativando neutrófilos e fagócitos mononucleares. Além disso, uma vez erradicada a infecção, esta citocina participa da reparação tecidual contribuindo para o crescimento de fibroblastos e angiogênese (DINARELLO, 2000).

As citocinas IL-1 e a IL-6 também têm papéis importantes na inflamação. A IL-1 apresenta ações fisiológicas semelhantes ao TNF- α , como a indução da febre e a ativação de cascatas de coagulação. Enquanto a IL-6, secretada por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos tem a capacidade de induzir a secreção de proteínas hepáticas na fase inflamatória aguda e atuar como fator de crescimento e diferenciação de linfócitos B (NAKA; NISHIMOTO; KISHIMOTO, 2002).

A IL-8, secretada também por macrófagos, por sua vez, desenvolve um importante papel quimiotático para neutrófilos nos sítios da inflamação e vários estudos relacionam esta citocina a processos inflamatórios pulmonares (LUSTER, 1998).

A resposta inflamatória é modulada de forma a eliminar a infecção, promover a reparação tecidual e não promover adicionais injúrias teciduais ou mortes celulares por apoptose. Para isto, ocorre um equilíbrio entre a secreção de citocinas próinflamatórias e mediadores antiinflamatórios, a exemplo da IL-10, que é um inibidor de macrófagos ativados e células dendríticas e atua como um importante regulador da resposta inflamatória (OBERHOLZER *et al.*, 2002).

1.3 Ouabaína

Inicialmente conhecida como um composto de origem vegetal, extraída das cascas e raízes da árvore Ouabaio (*Acocanthera ouabaio*) e de sementes do gênero *Strophanthus* (*Strophanthus gratus* e *Strophanthus kombé*), ambos pertencentes à família das Apocynaceae, a ouabaína (Fig 5) foi identificada como uma substância endógena, circulante no plasma de mamíferos superiores (HAMLYN, 1991). Nos últimos anos, a ouabaína tem sido amplamente estudada, por sua capacidade em interferir em vários mecanismos reguladores e mantenedores da homeostase (BAGROV & SAHPIRO, 2008).

A ouabaína endógena é sintetizada pela glândula adrenal, pelo hipotálamo e hipófise e apresenta características químico-estruturais, biológicas e imunológicas idênticas as da ouabaína encontrada em vegetais (FERRANDI *et al.*, 1997; HAMLYN *et al.*, 1991; LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1994; SCHONER, 2000).

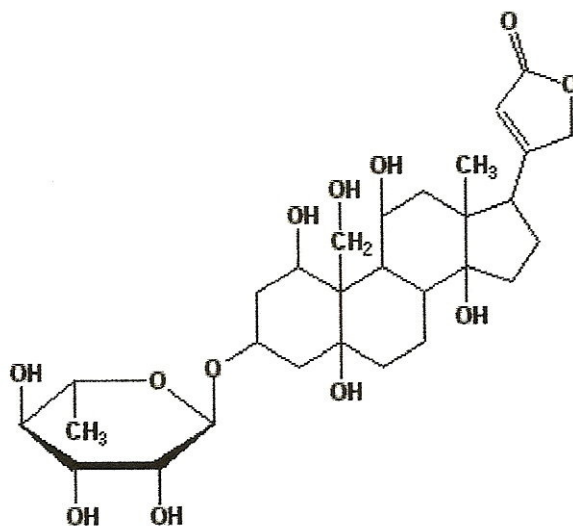


Figura 5. Estrutura química da ouabaína. Retirada de HINSON; DAWNAY; RAVEU, 1995.

Utilizada para tratamento para insuficiência cardíaca por aumentar os níveis de cálcio intracelular (BLAUSTEIN, 1993), esse digitálico tem a propriedade de inibir a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (Fig.6), uma proteína presente na membrana plasmática, que

catalisa o transporte ativo acoplado de Na^+ e K^+ , estabelecendo um gradiente eletroquímico através da membrana (AIZMAN *et al.*, 2001).

A unidade funcional da Na^+/K^+ ATPase é composta por três subunidades, α , β e um membro da família FXYD, denominada unidade γ . A combinação dessas subunidades entre si podem resultar em pelo menos nove diferentes isoenzimas da Na^+/K^+ ATPase em humanos (CRAMBERT & GEERING, 2003).

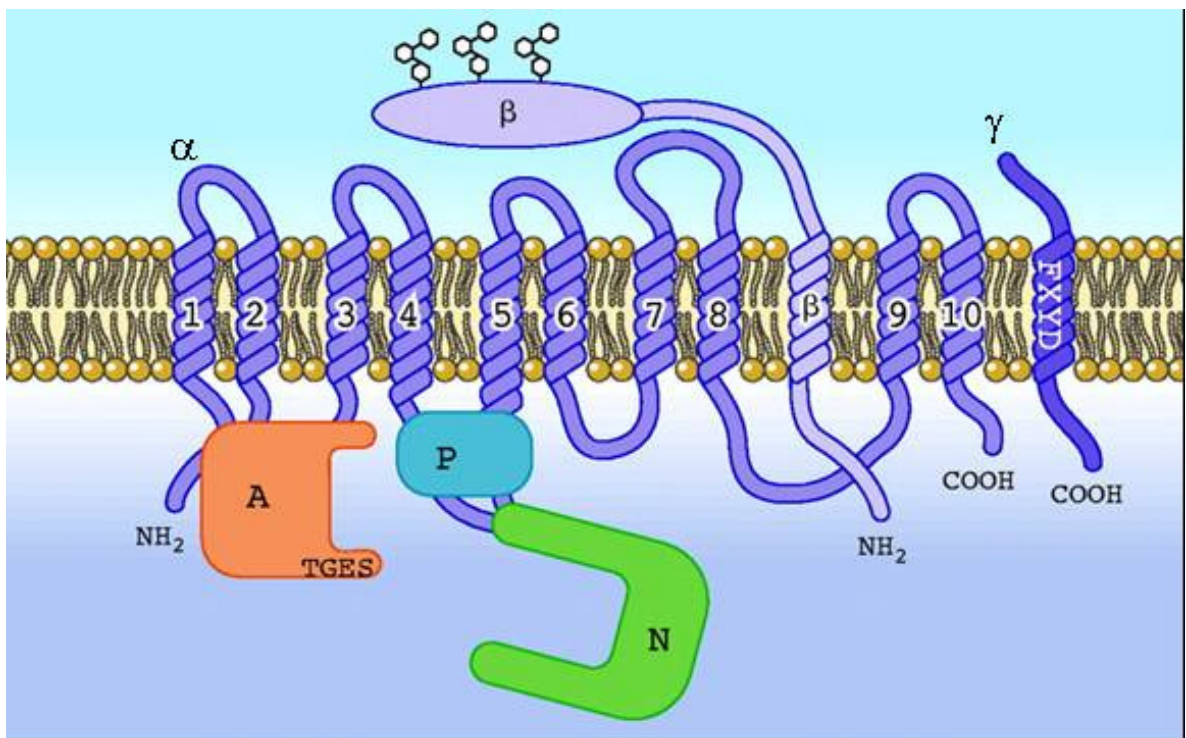


Figura 6. Esquema da estrutura molecular da Na^+/K^+ ATPase. Retirado de HORISBERGER, 2004.

Existem quatro isoformas da subunidade α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) e três da subunidade β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$). À subunidade α é atribuída a função catalítica da enzima, enquanto que a β é responsável pela maturação e inserção da enzima na membrana plasmática e a γ pela modulação da atividade da enzima (LINGREL, 2009).

Em relação à distribuição celular de tais isoformas, a $\alpha 1$ tem presença ubíqua, enquanto a $\alpha 2$ é encontrada principalmente nos músculos esqueléticos, adipócitos, olhos, coração, cérebro e no músculo liso vascular. A $\alpha 3$ é bastante expressa em

neurônios e ovários, e a $\alpha 4$ exclusivamente em espermatozóides (DOSTANIC-LARSON *et al.*, 2006).

Considerando-se a afinidade pela ouabaína, a cadeia $\alpha 3$ apresenta-se mais sensível à ação deste glicosídeo, sendo seguida pela $\alpha 2$. A $\alpha 1$ expressa baixa sensibilidade, e é a isoforma mais encontrada em roedores (RODRIGUES-MASCARENHAS, 2006a).

A ouabaína tem a sua secreção associada ao metabolismo de hormônios esteróides (HAMLYN *et al.*, 2003) e a situações de estresse, podendo esta condição estar relacionada à secreção de norepinefrina e angiotensina (BAUER *et al.*, 2005). Outras evidências sugerem que o hormônio adrenocorticotrópico, a angiotensina II, a vasopressina e a fenilefrina estimulam a liberação da ouabaína proveniente da glândula adrenal *in vitro* (SHAH *et al.*, 1999).

Dentro desse contexto, Laredo e colaboradores (1997), identificaram por meio de estudos com células da adrenal de bovinos que a angiotensina II estimula a secreção da ouabaína endógena por meio de agonistas do seu receptor AT₂, ao mesmo tempo em que a secreção de cortisol e aldosterona não é afetada por estes agonistas.

Além disso, sua secreção está associada a cardiopatias, à insuficiência renal e a alterações vasculares na hipertensão arterial (MANUNTA *et al.*, 2009), de modo que descendentes de pacientes hipertensos apresentam alta concentração de ouabaína no plasma (SCHONER & SCHEINER-BOBIS, 2007).

1.3.1 Efeito de ouabaína no sistema imunológico

A manutenção e regulação da homeostase há muito é estudada e associada ao sistema imunológico, mas só a partir do século XX estudos concretizaram a hipótese de que tal sistema atua em ressonância com os sistemas endócrino e nervoso (RUMJANEK; PIUVEZAM; RODRIGUES-MASCARENHAS, 2006), indicando que ações hormonais influenciam respostas imunológicas e neuronais.

Estudos que correlacionam o sistema nervoso e imunológico demonstram que o cérebro e o sistema imunológico se comunicam por meio de neurotransmissores, citocinas e hormônios. Fibras nervosas secretoras de neuropeptídeos (substâncias

químicas produzidas por células neuronais) estão presentes em órgãos linfóides primários e secundários, da mesma maneira que células imunes podem funcionar como fonte desse tipo de peptídeo. Estas interações são essências na regulação da resposta inflamatória (GARNEA, 1996, STEINMAN, 2004).

Atualmente, sabe-se que hormônios como a prolactina, o hormônio do crescimento e também os glicorticóides são produzidos por células do sistema imunológico, da mesma forma que várias citocinas e mediadores que afetam os linfócitos, são originados de tecidos nervosos e glândulas endócrinas (DARDENNE & SAVINO, 1996).

Os glicocorticóides, em altas concentrações, além da característica supracitada, influenciam na estrutura e função dos órgãos linfóides causando diminuição do volume tímico, apoptose dos timócitos (PEARCE; KHALID; FUNDER, 1981) e dos linfócitos B provenientes da medula óssea (McCONKEY *et al.*, 1991).

Nessa mesma linha de interação entre sistemas, pacientes com hipotireoidismo que sofrem transplante de medula óssea, apresentam diminuição do número de linfócitos em relação a pacientes saudáveis (RUMJANEK; PIUVEZAM; RODRIGUES-MASCARENHAS, 2006).

Entre os vários compostos envolvidos nessa sinergia funcional, encontra-se a ouabaína, que está sendo alvo de vários estudos relacionando-a a regulação de vias fisiológicas e de sinalização imunitária.

A ouabaína é capaz de interferir em diversos aspectos da resposta imunológica e da linfopoese (ECHEVARRIA-LIMA & RUMJANEK, 2006, RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2009).

A linfopoese ocorre na medula óssea, originando o linfócito, célula característica do sistema imunológico, o qual se apresenta nas formas de linfócito T e linfócito B. O primeiro amadurecendo e se diferenciando no timo, e o segundo passando por tais processos na própria medula óssea (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os linfócitos B são células capazes de produzir anticorpos ou imunoglobulinas, enquanto os linfócitos T subdividem-se em duas classes distintas: as células T auxiliares ($CD4^+$), com função reguladora, pela produção de interleucinas, e as células T citotóxicas ($CD8^+$), com caráter efetor, pela destruição de células infectadas por vírus, células mutagênicas e enxertos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; LEVINSON; JAWETZ, 2005).

Em timócitos, células precursoras dos linfócitos T, Rodrigues-Mascarenhas *et al.* (2003), descreveram o efeito da ouabaína no aumento da expressão de CD69, molécula presente durante o processo de maturação das células em questão, decorrente do influxo do cálcio extracelular. Nessas mesmas células, esse digitálico inibe a ação de diversos mitógenos (QUASTEL & KAPLAN, 1968; MORAES *et al.*, 1989), como a concanavalina A (RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2009), estér de forbol (TPA) (OLEJ *et al.*, 1994) e a citocina IL-2 (STOECK; NORTHOFF; RESCH, 1983; OLEJ *et al.*, 1994). Nesse mesmo modelo, a ouabaína é capaz de reduzir a ativação da MAPK p-38, inibindo os níveis de NFAT, um fator de transcrição que regula a síntese de IL-2 (RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2008)

A atuação da ouabaína também é verificada no sinergismo com glicorticóides, onde exacerba a apoptose de timócitos e leva à diminuição do volume desse órgão (RODRIGUES-MASCARENHAS; DOS SANTOS; RUMJANEK, 2006b), além de aumentar a despolarização da membrana plasmática em linfócitos provenientes de linfonodos, baço e timo (RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2008).

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 *et al.*, 1997) e consolida a idéia da ouabaína estar relacionada a processos apoptóticos.

Alem disso, evidências demonstram que a ouabaína ativa a Src, uma proteína quinase de membrana associada a várias vias de sinalização, levando à transativação do EGRF (*epidermal grown factor* – fator de crescimento epidermal), que tem sido identificado como um elemento critico na trasdução de sinais para modulação da atividade de citocinas (HAAS *et al.*, 2002).

Eestudos indicam a ação supressora da ouabaína nos níveis circulantes de IL-6 e TNF- α em modelos utilizando estímulo por LPS *in vivo* e *in vitro* (MATSUMORI *et al.*, 1997) e a ação inibitória de glicosídeos nas vias pró-inflamatórias que envolvem também o TNF- α e o NF- κ B (YANG *et al.*, 2005).

Este trabalho justifica-se pelo fato de vários estudos retratarem a capacidade da ouabína de modular vários aspectos da resposta imune, apesar de sua

interferência na homeostase e ação em processos inflamatórios não estarem bem definidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito modulador da ouabaína no sistema imunológico *in vivo* e *in vitro*, utilizando modelos murinos.

2.2 Objetivos Específicos

Em animais pré- tratados com Ouabaína por 3 dias:

- Verificar a resposta inflamatória utilizando o modelo de peritonite induzida por Concanavalina A, por meio de contagem total e diferencial de leucócitos do lavado peritoneal;
- Quantificar as células do sangue periférico, por meio de análise de lâminas histológicas coradas com Kit Panótico;
- Avaliar a biometria e a celularidade do baço, timo e linfonodos mesentéricos;
- Estudar a proporção das populações de linfócitos T, e subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e linfócitos B no timo e linfonodos mesentéricos, por meio de citometria de fluxo.
- Estudar a proporção de linfócitos Treg, CD4⁺/CD25⁺, presentes no timo e nos linfonodos mesentéricos, por meio de citometria de fluxo;
- Verificar, *in vitro*, o efeito da ouabaína em cultura celular de linfócitos estimulados por Concanavalina A, por meio do ensaio de viabilidade do MTT.
- Realizar análise comparativa da proporção de linfócitos T e linfócitos B nos linfonodos mesentéricos de animais tratados com ouabaína por um ou dois dias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos da estirpe *Swiss*, fêmeas, com cerca de 2 meses de idade, obtidos no biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) – UFPB. Os animais foram mantidos em um ciclo de claro e escuro de 12 horas, com acesso livre à água e comida durante todos os experimentos.

Os animais foram manuseados de acordo com o Comitê de ética em pesquisa animal do LTF/UFPB, em projeto aprovado sob o número 0407/08. Além disso, foram realizados procedimentos com o intuito de evitar o sofrimento dos animais utilizados neste trabalho, pelo uso de anestésicos e da eutanásia por meio do deslocamento cervical.

3.1.2 Reagentes e soluções

- Álcool metílico (CH_3OH) - Vetec
- Anticorpo anti-CD3 murino (ReD systems) – acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) diluído em PBS, de acordo com as instruções do fabricante
- Anticorpo anti-B220 murino (ReD systems) – acoplado a PE (ficoeritrina) diluído em PBS, de acordo com as instruções do fabricante
- Anticorpo anti-CD4 murino (ReD systems) – acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) diluído em PBS, de acordo com as instruções do fabricante
- Anticorpo anti-CD8 murino (ReD systems) – acoplado a PE (ficoeritrina) diluído em PBS, de acordo com as instruções do fabricante
- Anticorpo anti-CD25 murino (ReD systems) – acoplado a APC (aloficocianina) diluído em PBS, de acordo com as instruções do fabricante
- Concanavalina A (Sigma) – solução estoque 1mM em PBS, mantida a -20°C

- Corante eosina azul de metileno segundo Giemsa 0,6g (Vetec) em 100mL
- Corante eosina azul de metileno segundo May-Grünwald 0,3 g (Vetec) em 100mL
- DMSO: dimetilsulfóxido P. A. (Nuclear)
- Kit Panótico (Renylab) – Kit para coloração de lâmina histológica utilizado de acordo com as instruções contidas no manual.
- MTT (Sigma) – Thiazolyl blue – 5mg em 1mL
- Ouabaína (Sigma) – utilizada na dose 0,56mg/kg em RPMI, dissolvida e diluída no momento do uso.
- PBS – NaCl 9g (Reagen), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,9g (Merck), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,26g (Reagen) em 1 litro de água deionizada com pH ajustado para 7,4
- RPMI 1640 (Sigma – R4130)- suplementado com bicarbonato de sódio 2g/L, penicilina 60mg/L e estreptomicina 10mg/L
- Solução salina- NaCl a 0,9% em água destilada
- Soro Fetal Bovino (Gibco) – inativado por 30 minutos a 56°C e estocado em alíquotas de 15 mL a -20°C.
- Tampão fosfato utilizado no Corante May-Grünwald/Giemsa – composto de 71,5 mL da solução A (Na_2HPO_4 anidro 9,47g (Merck) em 1000mL) e 28,5 mL da solução B (KH_2PO_4 anidro 9,08g (Reagen) em 1000 mL) com pH ajustado para 7,2.

3.1.3 Equipamentos

- Balança analítica
- Microscópio óptico
- Centrífuga refrigerada
- Cytospin
- Citômetro de fluxo
- Fluxo laminar
- Estufa
- Leitor de ELISA

3.2 Métodos

3.2.1 Tratamento *in vivo* com ouabaína

Os animais foram selecionados e mantidos como citado acima e tratados com ouabaína na dose de 0,56 mg/kg, dissolvida e diluída em solução salina (0,9%) estéril, através de injeção intraperitoneal, de acordo com estudos anteriores (RODRIGUES-MASCARENHAS, 2006a) por três dias consecutivos.

Em todos os experimentos, foram utilizados dois grupos: salina (SAL) , com animais que receberam injeção intraperitoneal de 200µL de solução salina(0,9%), e ouabaína (OUA), com animais tratados também por meio de injeção intraperitoneal com 200µL de ouabaína na supracitada dose.

Além disso, em ensaios onde foi utilizado o mitógeno concanavalina A, foram utilizados também os grupos CON A, com animais que receberam apenas tal mitógeno, e OUA/CON A, com animais que foram tratados com ouabaína e receberam injeção de CON A no último dia de tratamento.

3.2.2 Peritonite induzida por Concanavalina A

Para indução da peritonite nos camundongos por meio de Con A foram realizadas as seguintes etapas segundo os protocolos de Rodriguez *et al.*, 1992 e Cripps *et al.*, 2005.

- A) A partir de uma solução estoque de Con A com concentração 1mg/mL, retirou-se 600µL e adicionou-se 3000µL de solução salina (0,9%), obtendo-se uma solução com concentração final 0,2mg/mL;
- B) Desta solução final, injetou-se 300µL na cavidade peritoneal dos camundongos, 1 hora após o último tratamento com ouabaína.

- C) Após 24 horas desta injeção peritoneal de Con A, os animais foram eutanasiados e submetidos à corte sagital no epitélio abdominal para exposição da membrana peritoneal;
- D) Após o peritônio estar exposto, injetou-se 10 mL do tampão fosfato PBS gelado na cavidade abdominal do animal e realizou-se manobras de “massagem” nessa região com o intuito de desprender as células inflamatórias;
- E) Após tais manobras, aspirou-se 5 mL do conteúdo abdominal e realizou-se centrifugação com velocidade de 1200 rpm por 5 minutos;
- F) Do conteúdo centrifugado, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 5 mL, realizando-se a homogeneização;
- G) Em seguida à homogeneização, realizou-se a contagem de células totais na câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico em objetiva de 40x.

3.2.3 Contagem total e diferencial das células obtidas do lavado peritoneal

A contagem do número total de células foi realizada na câmara de Neubauer utilizando um microscópio sob contraste de fase.

Para a contagem diferencial, utilizou-se a técnica do citospin, onde 8×10^5 células foram colocadas em lâminas e submetidas a 1100 r.p.m. por 10 minutos. Com finalidade de coloração, após serem centrifugadas, as lâminas foram submetidas ao álcool metílico absoluto (fixador) e aos corantes de May-Grünwald e de Giemsa, segundo protocolo utilizado por Vieira (2008). Após estarem secas, cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células (CARP *et al.*, 1972), utilizando para isso a objetiva de imersão com aumento final de 1000x.

3.2.4 Obtenção e coloração do sangue periférico

Para análise das alterações celulares do sangue periférico dos animais em experimento, foi realizada coloração pelo Kit Panótico Renylab, composto por 03 substâncias diferentes: fixador (etanol), corante basófilo (eosina) e corante acidófilo (azul de metileno).

O sangue foi coletado da cauda dos camundongos e feito esfregaço em lâmina. Após o material coletado estar seco, a lâmina foi corada de acordo com as instruções do fabricante. A lâmina foi lavada em água corrente e deixada para secar em temperatura ambiente.

A análise das lâminas foi realizada por meio de contagem diferencial das células do sangue periférico por meio de microscopia óptica, de modo que cada lâmina foi percorrida até a totalização de 100 células (CARP *et al.*, 1972),. Nesta contagem utilizou-se a objetiva de imersão com aumento final de 1000x.

3.2.5 Biometria e celularidade do baço, timo e dos linfonodos mesentéricos

Os camundongos foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. O baço, timo e os linfonodos mesentéricos foram retirados e mantidos, por alguns minutos, em meio RPMI. Foi utilizada uma balança analítica para mensuração do peso dos supracitados órgãos e, em seguida, os órgãos foram macerados com um êmbolo de uma seringa para obtenção da suspensão celular em uma rede de nylon sobre placa de Petri contendo meio RPMI. As suspensões celulares foram centrifugadas a 1200rpm durante 5 minutos. As células foram novamente suspensas em meio RPMI para contagem celular na câmara de Neubauer utilizando um microscópio sob contraste de fase com objetiva de 40x. Para a realização da celularidade do baço foi utilizado a solução de Boyle com o intuito de lisar as hemácias.

3.2.6 Análise das populações de linfócitos T, linfócitos B e subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ por meio de marcação de antígenos de superfície

Para a marcação das moléculas de superfície utilizaram-se anticorpos anti-CD3, anti- B220, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD25 (todos da ReD Systems). Para isto, 1×10^6 células foram centrifugadas a 1200 r.p.m. por 5 minutos e incubadas por 30 minutos a 4°C em 20 µL do anticorpo, na concentração estipulada pelo fabricante. No fim da incubação, as células foram lavadas e suspensas em PBS para leitura em citômetro de fluxo. Os dados obtidos foram submetidos ao software de análise para citometria de fluxo WinMDI 2.8.

3.2.7 Ensaio de viabilidade por MTT em cultura celular

Para a cultura celular, 1×10^6 linfócitos, provenientes de animais tratados com ouabaína por três dias consecutivos, foram incubados por 48h em meio RPMI + 10% de Soro Fetal Bovino na presença ou ausência de 2,5µg/mL do mitógeno Con A, em uma estufa a 37°C com 5% de CO₂. Ao fim do período de incubação, realizou-se o ensaio de viabilidade por MTT de acordo com Mosmann, (1983), onde foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- A) Adicionou-se 20µL de MTT em cada poço, homogeneizando-se;
- B) Quatro horas após a adição do MTT, centrifugou-se a placa com velocidade 1200rpm por 5 minutos;
- C) Após ser desprezado o sobrenadante, adicionou-se 200µL de DMSO em cada poço, homogeneizando-se;
- D) Em seguida, as células foram submetidas ao leitor de ELISA, utilizando-se filtro com comprimento de onda 570nm.

3.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média utilizando o programa de computador GraphPad Prism 5.01. Como ferramentas estatísticas foram utilizados o Test t de Student ou o ANOVA, sendo considerados significativos resultados com valores de $p < 0,005$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito de ouabaína na peritonite induzida por Concanavalina A

Uma das características do processo inflamatório é a migração de células para sítio inflamado (LEUNG, 2007). Neste trabalho, foi utilizado o modelo de peritonite aguda induzida pela lectina Concanavalina A (Con A), que possui atividade quimiotática para neutrófilos (SAKAMOTO *et al.*, 1995). Esse efeito deve-se à ação de citocinas e agentes inflamatórios que induzem a expressão de moléculas de adesão celular (CAMs) e estas, por sua vez, levam à mobilização dos referidos leucócitos (BAINTNER *et al.*, 2007).

Como descrito pela literatura, após 24 horas, observou-se que a Con A foi capaz de induzir um aumento do infiltrado celular peritoneal (65%), obtendo-se um valor de 15×10^7 células totais, demonstrando a confiabilidade do modelo (RODRIGUEZ *et al.*, 1992; CRIPPS *et al.*, 2005). O tratamento apenas com a ouabaína não interferiu no número de células presentes no peritônio quando comparados ao grupo salina. No entanto, a associação de ouabaína com a Con A produziu uma inibição significativa no influxo de células totais para o peritônio induzido pela Con A, em aproximadamente 76% (Gráf. 1).

Além da contagem total, foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos presentes no infiltrado celular após o estímulo com a Con A. Nesta contagem, observou-se que os leucócitos polimorfonucleares representam aproximadamente 80% (12×10^7 células) do número de células totais do referido lavado, enquanto os mononucleares representam em torno de 20% (3×10^7 células).

Os dados demonstraram que o efeito da ouabaína observado no resultado supracitado é um reflexo da redução do número de leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, em 77%, no infiltrado peritoneal (Gráf. 2A). A ouabaína também foi capaz de aumentar o número de leucócitos mononucleares no lavado peritoneal quando comparados ao grupo Con A em um percentual de 82%.

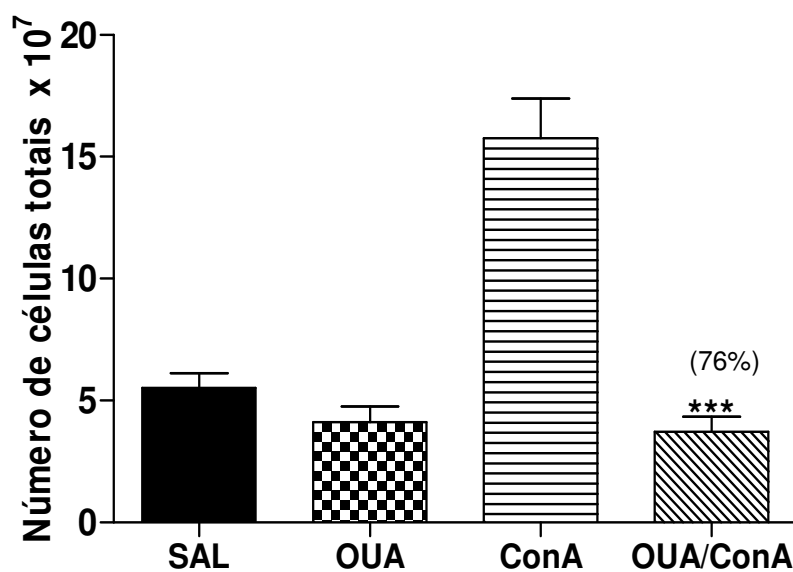


Gráfico 1. Efeito da ouabaína (OUA) na contagem total de células 24h após peritonite induzida por Concanavalina A (Con A). Animais foram tratados com salina (SAL) ou ouabaína (OUA) 0,56mg/kg por 03 dias consecutivos e desafiados com Con A 0,2 mg/mL. Estão representados o número total de células x10⁷, a partir do lavado peritoneal. Foi utilizado como ferramenta estatística o ANOVA, onde *** significa p<0,0001, quando comparados os grupos Con A e Oua/Con A (animais que receberam apenas Con A e animais tratados com ouabaína e que receberam Con A, respectivamente). Para este experimento, foi utilizado um n de dez animais por grupo.

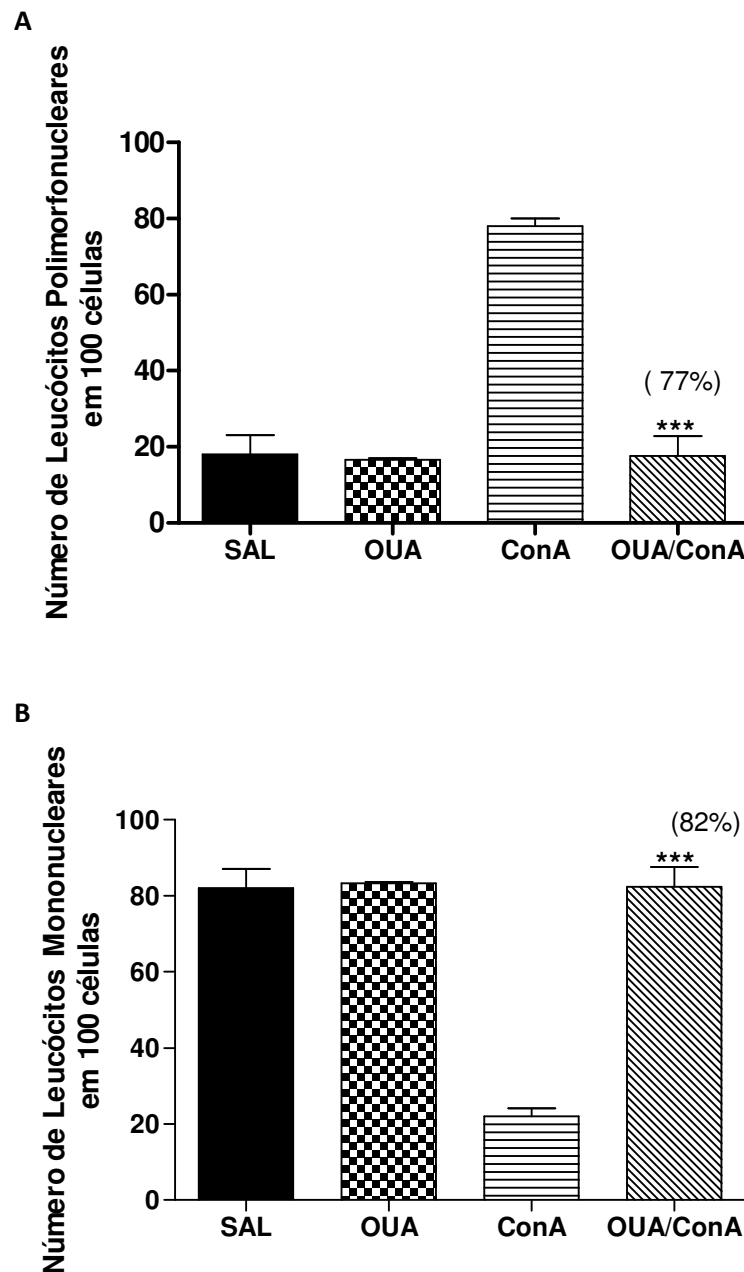


Gráfico 2. Efeito da ouabaína na contagem diferencial de leucócitos 24h após peritonite induzida por Concanavalina A (Con A). O lavado peritoneal foi submetido à contagem diferencial dos leucócitos, após a confecção e coloração das lâminas. Animais foram tratados com salina (SAL) ou ouabaína (OUA) 0,56mg/kg por 03 dias consecutivos e desafiados com Con A 0,2 mg/mL. Os valores representam o número de polimorfonucleares (Gráf. 2A) e mononucleares (Gráf. 2B) em 100 leucócitos. Foi utilizada a ferramenta estatística ANOVA, onde *** significa $p < 0,0001$ quando comparados animais que receberam apenas Con A (Con A) e animais tratados com ouabaína e que receberam Con A (OUA/Con A), em ambas as figuras. Para este experimento foi utilizado um n de três animais por grupo.

4.2 Análise do sangue periférico de animais tratados com ouabaína

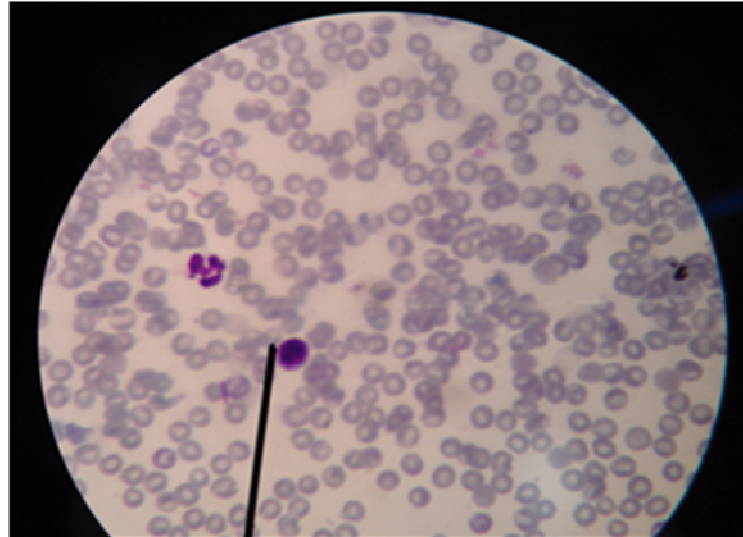
Como visto anteriormente, o tratamento com a ouabaína foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório induzido por Con A. Além disso, dados de nosso laboratório (artigo submetido em anexo) demonstraram que a ouabaína é capaz de inibir o edema inflamatório induzido por diversos agentes flogísticos.

Em vista da possibilidade de que os efeitos antiinflamatórios mediados pela ouabaína estejam relacionados a modificações no sistema imunológico, resolveu-se estudar o papel da ouabaína nesse sistema, avaliando parâmetros como as populações celulares presentes no sangue periférico de animais tratados com ouabaína.

As células avaliadas nesta contagem foram os leucócitos granulócitos (neutrófilos e eosinófilos), linfócitos e os monócitos pelo uso do esfregaço sanguíneo (Fig.7 A e B).

A análise do esfregaço sanguíneo de animais pré-tratados com ouabaína, por meio de contagem diferencial em 100 células, demonstrou que não houve modificação no perfil leucocitário quando comparado ao grupo controle tratados com salina (Gráf. 3). Os valores dos números de células do animal controle estão de acordo com os descritos na literatura (VASCONCELOS *et al.*, 2007; PETKOVA *et al.*, 2008).

A



B

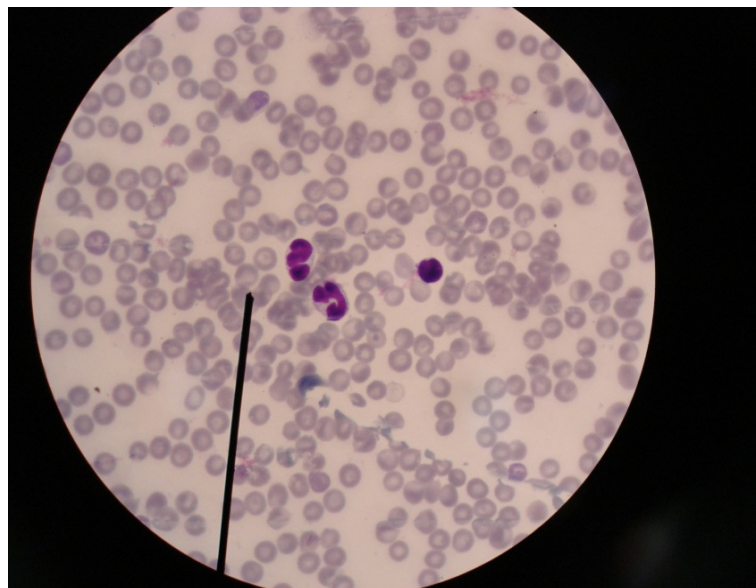


Figura 7. Análise do sangue periférico Esfregaço de células de sangue periférico de animais que foram tratados com solução salina (A) e com ouabaína 0,56 mg/kg por três dias consecutivos (B). A coloração foi realizada com o Kit Panótico. Aumento de 100X. Foi utilizado um n de 14 animais por grupo.

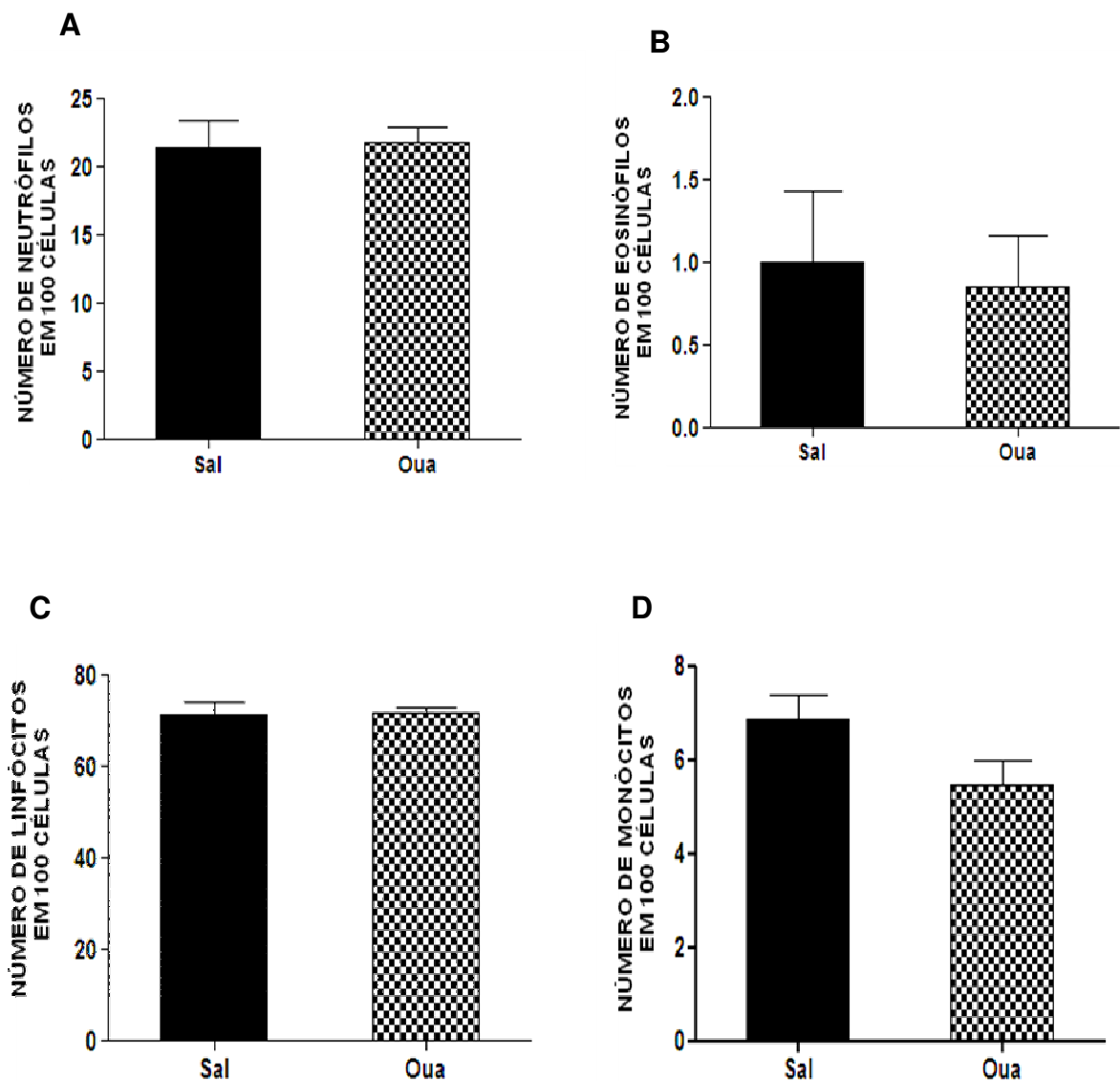


Gráfico 3. Contagem de leucócitos do sangue periférico. Análise do sangue periférico de animais tratados com solução salina (SAL) ou tratados com ouabaína (OUA) 0,56mg/kg por três dias consecutivos. Os valores representam o número células encontradas em um total de 100 células, onde: (A) neutrófilos, (B) eosinófilos, (C) linfócitos e (D) monócitos. Foi utilizado um n de 14 animais por grupo. Ferramenta estatística: teste T de Student.

4.3 Avaliação do peso e celularidade dos órgãos linfóides de animais tratados com ouabaína

A ação dos hormônios esteróides na atrofia de órgãos linfóides, como o timo (PEARCE; KHALID; FUNDER, 1981), e na diminuição do número de células do timo, baço e linfonodos mesentéricos (PADGETT; SIBLEY; JERRELIS, 2000) já foi descrita na literatura.

Considerando a característica esteroidal da molécula ouabaína (SCHONER, 2002) e os seus efeitos imunomoduladores já descritos na literatura (RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2008), avaliou-se o peso e a celularidade dos órgãos linfóides supracitados em animais tratados com ouabaína.

Na análise da biometria de animais tratados com ouabaína, verificou-se que não houve alterações nos pesos do timo, baço e dos linfonodos mesentéricos quando comparados aos grupos que receberam solução salina (Gráf. 4). Em relação à celularidade, o grupo tratado com ouabaína também não apresentou alteração no número total de células dos órgãos linfóides estudados, quando comparados aos grupos tratados com solução salina (Gráf.5).

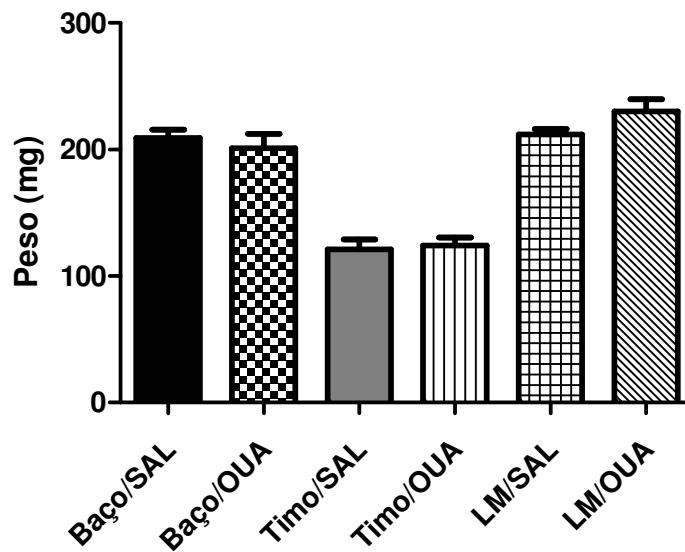


Gráfico 4. Biometria dos órgãos linfóides. Foi realizada a biometria dos seguintes órgãos linfóides: baço, timo e linfonodos mesentéricos (LM), em animais (n = 5 por grupo) que receberam solução salina (SAL) e ouabaína (OUA) 0,56mg/kg por três dias consecutivos. Foi utilizada como ferramenta estatística o teste T de Student.

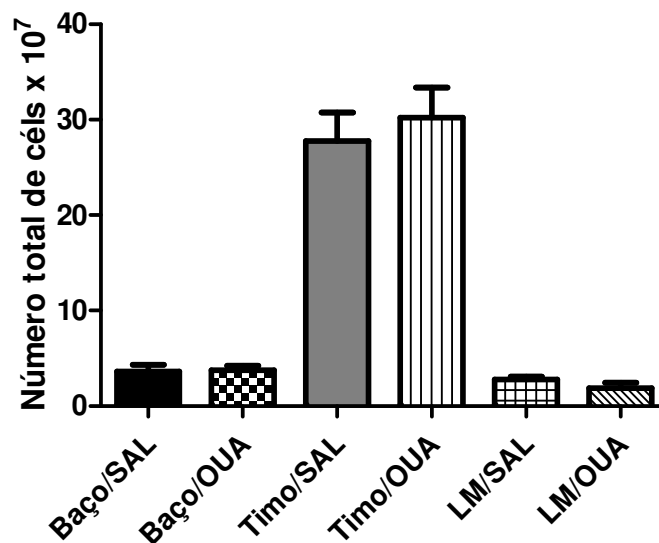


Gráfico 5. Celularidade dos órgãos linfóides. Foi realizada a contagem do número total de células presentes nos seguintes órgãos linfóides: baço, timo e linfonodos mesentéricos (LM), em animais (n = 5 por grupo) que receberam solução salina (SAL) e ouabaína (OUA) 0,56mg/kg por três dias consecutivos. Foi utilizada como ferramenta estatística o teste T de Student.

4.4 Efeito da ouabaína na proporção subpopulações de linfócitos T e B nos linfonodos mesentéricos

Apesar da ouabaína não alterar a biometria e o número de células total dos órgãos linfóides analisados, ainda é possível que os seus efeitos descritos estejam relacionados a alterações nas populações de linfócitos T e B. Dessa forma, foi estudado o efeito do tratamento com ouabaína nas populações dos referidos linfócitos por citometria de fluxo. Foram utilizados grupos com animais tratados com solução salina (SAL) e ouabaína (OUA) por três dias consecutivos.

Nos linfonodos mesentéricos encontramos diversas classes de linfócitos, entre elas os linfócitos B, situados prioritariamente nas zonas foliculares, e os linfócitos T, encontrados mais próximos aos cordões paracorticais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Para fins de marcação de moléculas de superfície, por meio de citometria de fluxo, utilizamos o anticorpo anti-B220 (também denominado anti- CD45RO) para identificar os linfócitos B e anti-CD3 para os linfócitos T.

Na análise entre as populações de linfócitos T e B do linfonodo mesentérico, verificou-se que o tratamento com a ouabaína foi capaz de reduzir de forma significativa, em torno de 20%, a população de linfócitos T em relação ao grupo salina. Em contrapartida, na população de linfócitos B houve um aumento em torno do mesmo percentual, nos animais do grupo ouabaína em relação ao grupo salina (Fig. 8)

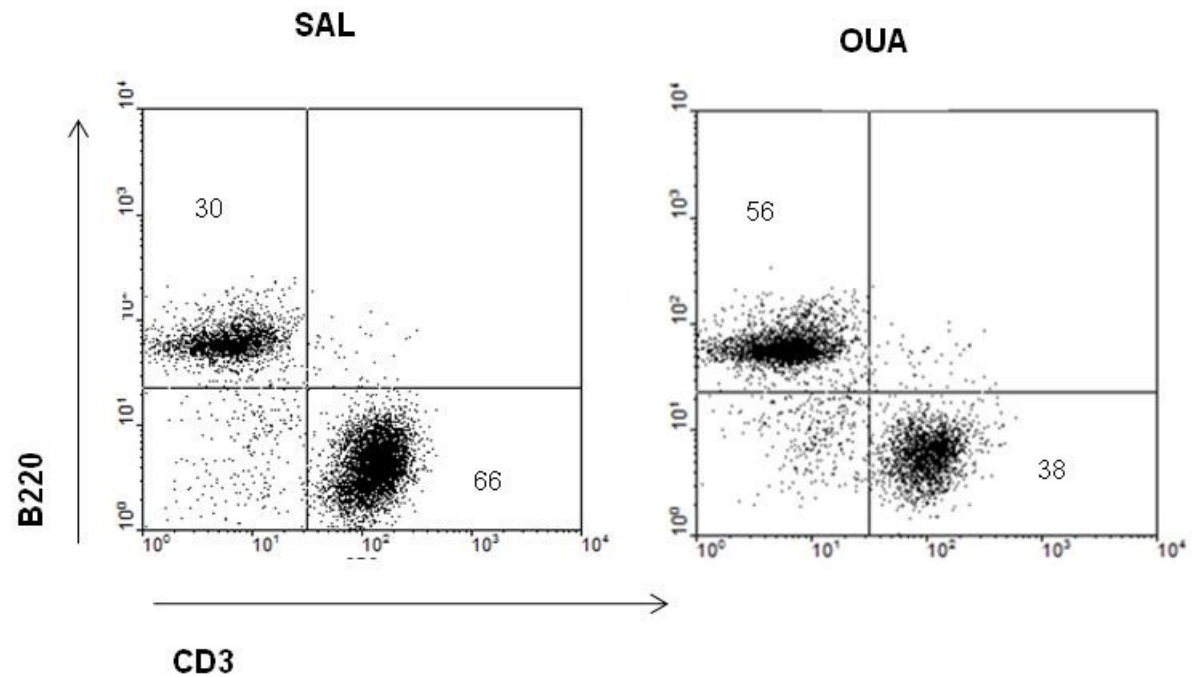


Figura 8. Proporção das populações de linfócitos T e B nos linfonodos mesentéricos de animais tratados com ouabaína. Células de animais tratados com solução salina (SAL) ou ouabaína (OUA) 0,56mg/Kg por três dias consecutivos foram marcadas com os anticorpos anti-B220 e anti-CD3 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, realizou-se a leitura por citometria de fluxo. Os números da abscissa representam a expressão da molécula de superfície CD3 (linfócitos T) e da ordenada, B220 (linfócitos B). Foi utilizado um n de três animais por grupo.

4.5 Efeito da ouabaína nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos linfonodos mesentéricos e do timo

Alguns estudos demonstraram que a ouabaína é capaz de regular etapas da maturação e proliferação de timócitos (SZAMEL & RESCH, 1981; RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2008). Este aspecto e sua produção endógena sugerem que este glicosídeo possa ter um papel fisiológico ainda não elucidado.

O timo é o local de maturação e diferenciação das células T, que neste órgão, são também chamadas de timócitos. Após processos de seleção, os linfócitos T desenvolvidos encaminham-se aos órgãos linfóides periféricos, como o linfonodo (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

O resultado anterior demonstrou que a ouabaína é capaz de reduzir o número de linfócitos T no linfonodo mesentérico. Esse fato pode ser reflexo de interferência na maturação dessas células no timo e pode afetar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Decidiu-se avaliar, por meio da citometria de fluxo, as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do linfonodo mesentérico e do timo, utilizando os anticorpos para as moléculas de superfície CD4 e CD8.

Em relação aos linfonodos mesentéricos, quando analisadas as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, encontrou-se que o tratamento com ouabaína causou uma redução no percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparado ao grupo salina, como reflexo da redução dos linfócitos T CD3⁺ observados no dado anterior. Entretanto, preservou-se a proporção entre os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Fig. 9).

Quando foi avaliada uma possível modulação na proporção das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ no timo dos animais previamente tratados com ouabaína, foi verificado que não há alteração percentual na proporção das subpopulações avaliadas entre os animais que foram tratados com solução salina e os que foram tratados com ouabaína (Fig.9).

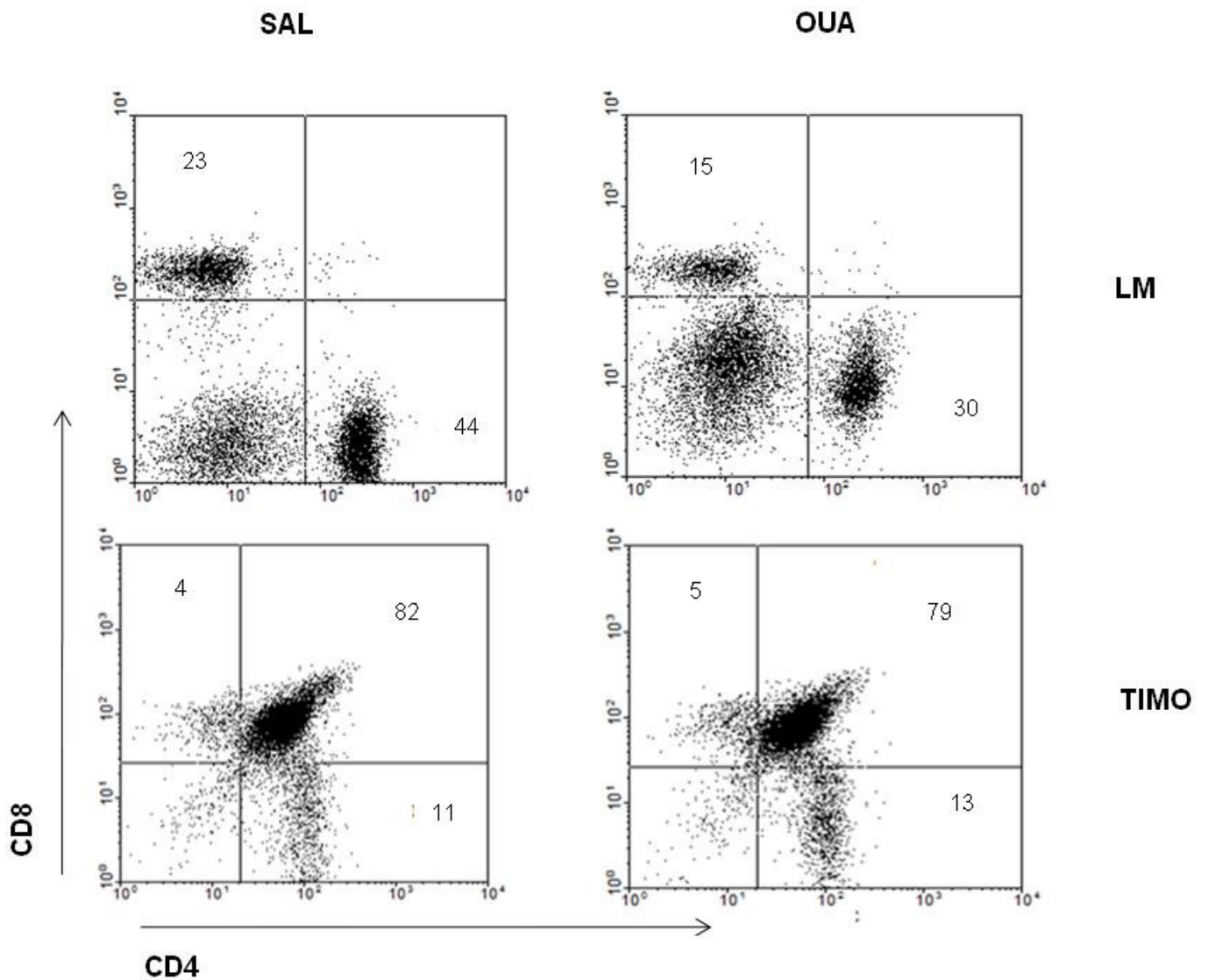


Figura 9. Proporção das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos mesentéricos (LM) e no timo. Linfócitos e timócitos foram tratados com solução salina (SAL) ou ouabaína (OUA) 0,56mg/Kg por três dias consecutivos e marcados com os anticorpos anti- CD4 e anti-CD8 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, realizou-se a leitura por citometria de fluxo. Os números da abscissa representam a expressão da molécula de superfície CD4 (linfócitos T CD4⁺) e da ordenada, CD8 (linfócitos T CD8⁺). Foi utilizado um n de três animais por grupo.

4.6 Efeito da ouabaína na subpopulação de linfócitos T CD4⁺/CD25, presente nos linfonodos mesentéricos e no timo

Estudos recentes relataram que o sistema imune produz uma população de células T, chamadas células T regulatórias (Tregs) que são associadas à imunossupressão (SAKAGUCHI *et al.*, 2008). Estas células são melhor caracterizadas na população de linfócitos T CD4⁺ e apresentam a expressão da molécula de superfície CD25 (KOZLOWSKA *et al.*, 2007).

A redução de linfócitos T observada no linfonodo mesentérico e os efeitos anti-inflamatórios da ouabaína podem estar associados a alterações na população de Tregs. Sendo assim, foi avaliado se a ouabaína exerce algum efeito na expressão das células T regulatórias.

Foram utilizados grupos de animais tratados com solução salina e com ouabaína 0,56mg/Kg por três dias consecutivos e avaliadas as populações de linfócitos T CD4⁺/CD25⁺, presentes nos linfonodos mesentéricos e no timo.

A partir destas análises, observou-se que a ouabaína não foi capaz de alterar a expressão das células T CD4⁺/CD25⁺ quando comparadas ao grupo salina nos órgãos estudados (Fig. 10). A percentagem de células T CD4⁺/CD25⁺ dos animais do grupo salina estão de acordo com os dados da literatura (BOMMIREDDY *et al.*, 2008)

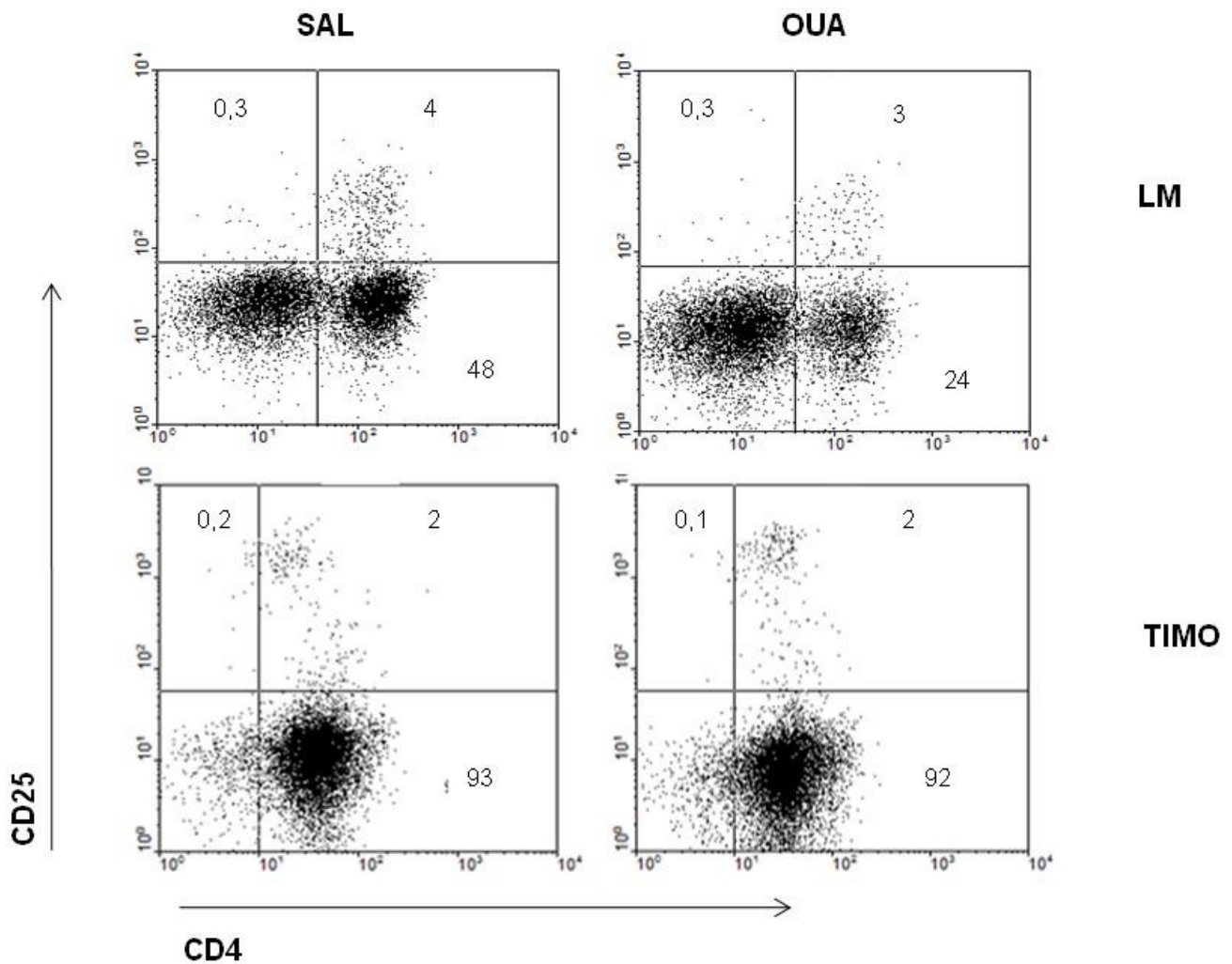


Figura 10. Proporção das subpopulações de linfócitos T CD4⁺, CD25⁺ e CD4⁺/CD25⁺, presentes nos linfonodos mesentéricos (LM) e no timo. Linfócitos e timócitos foram tratados com solução salina (SAL) ou ouabaína (OUA) 0,56mg/Kg por três dias consecutivos e marcados com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, realizou-se a leitura por citometria de fluxo. Os números da abscissa representam a expressão da molécula de superfície CD4 e da ordenada, CD25. Foi utilizado um n de três animais por grupo.

4.7 Efeito da ouabaína no ensaio de viabilidade por MTT em cultura celular de linfócitos provenientes dos linfonodos mesentéricos

A ouabaína, *in vivo*, e na mesma dose utilizada nesse trabalho, é capaz de sinergizar com a hidrocortisona na morte celular por apoptose de timócitos murinos (RODRIGUES MASCARENHAS *et al.*, 2006). Outros dados demonstraram que a ouabaína é capaz de inibir a proliferação celular desencadeada por mitógenos em linfócitos maduros de sangue periférico humano (PIRES *et al.*, 1997) e em timócitos murinos (SZAMEL & RESCH, 1981)

A partir dessas informações e da redução de linfócitos T (CD3⁺) encontrada nos linfonodos mesentéricos nos dados anteriores, verificou-se a ação da ouabaína administrada *in vivo* por três dias, em linfócitos provenientes de linfonodos mesentéricos estimulados, *in vitro*, pelo mitógeno Con A. Para isso, foi utilizado o ensaio de viabilidade celular utilizando a técnica do MTT, que avalia a atividade mitocondrial por meio da redução do sal tetrazólico.

Após o período de incubação de 48h, como esperado, verificou-se um aumento significativo na atividade mitocondrial dos linfócitos provenientes de animais tratados com salina e estimulados por Con A. Por outro lado, o tratamento com a ouabaína foi capaz de reduzir o efeito da Con A em torno de 30% (Gráf. 6).

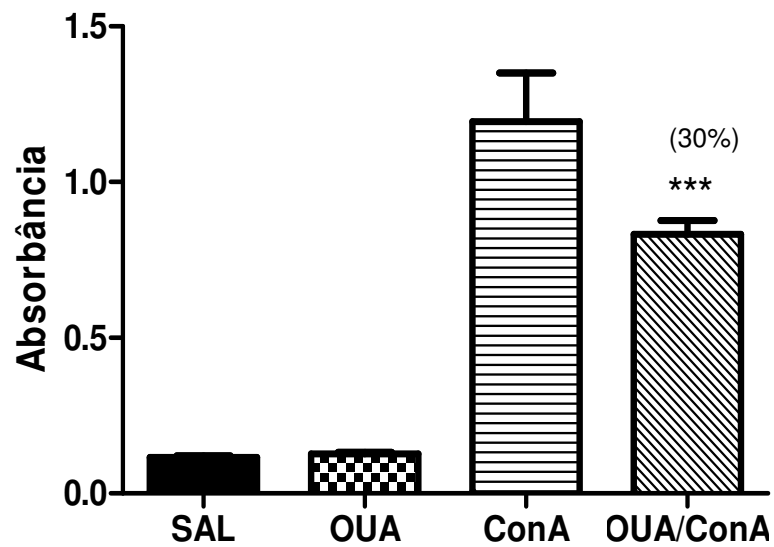


Gráfico 6. Efeito da ouabaína no ensaio de viabilidade por MTT em cultura celular de linfonodos mesentéricos estimulados por Concanavalina A (Con A). Linfócitos foram incubados por 48 horas em meio RPMI e SFB a 10% provenientes de animais que foram tratados com solução salina (SAL) ou ouabaína (OUA) 0,56mg/Kg por três dias consecutivos. Analisou-se a absorbância referente a redução do sal tetrazólico por ELISA, que representa a atividade mitocondrial de linfócitos estimulados por Con A (Con A) provenientes de animais tratados com solução salina (SAL) em comparação com linfócitos também estimulados pelo mesmo mitógeno tratados com ouabaína 0,56mg/kg (OUA/Con A). Utilizou-se como ferramenta estatística o ANOVA, onde *** significa $p < 0,0003$ e um n de três animais por grupo.

4.8 Análise das populações de linfócitos T e B nos linfonodos mesentéricos de animais tratados com ouabaína por um ou dois dias

Com o intuito de verificar se é possível observar os efeitos da ouabaína no linfonodo mesentérico, em tratamentos inferiores a três dias, animais foram tratados com ouabaína por um ou dois dias. Em seguida, realizou-se a análise das populações de linfócitos T e B e das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Verificou-se que tanto em um quanto em dois dias de tratamento com ouabaína não há alteração na presença de linfócitos T e B (Fig. 11A), bem como na expressão das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Fig.11B) no referido órgão, quando comparados os grupos tratados com ouabaína e solução salina.

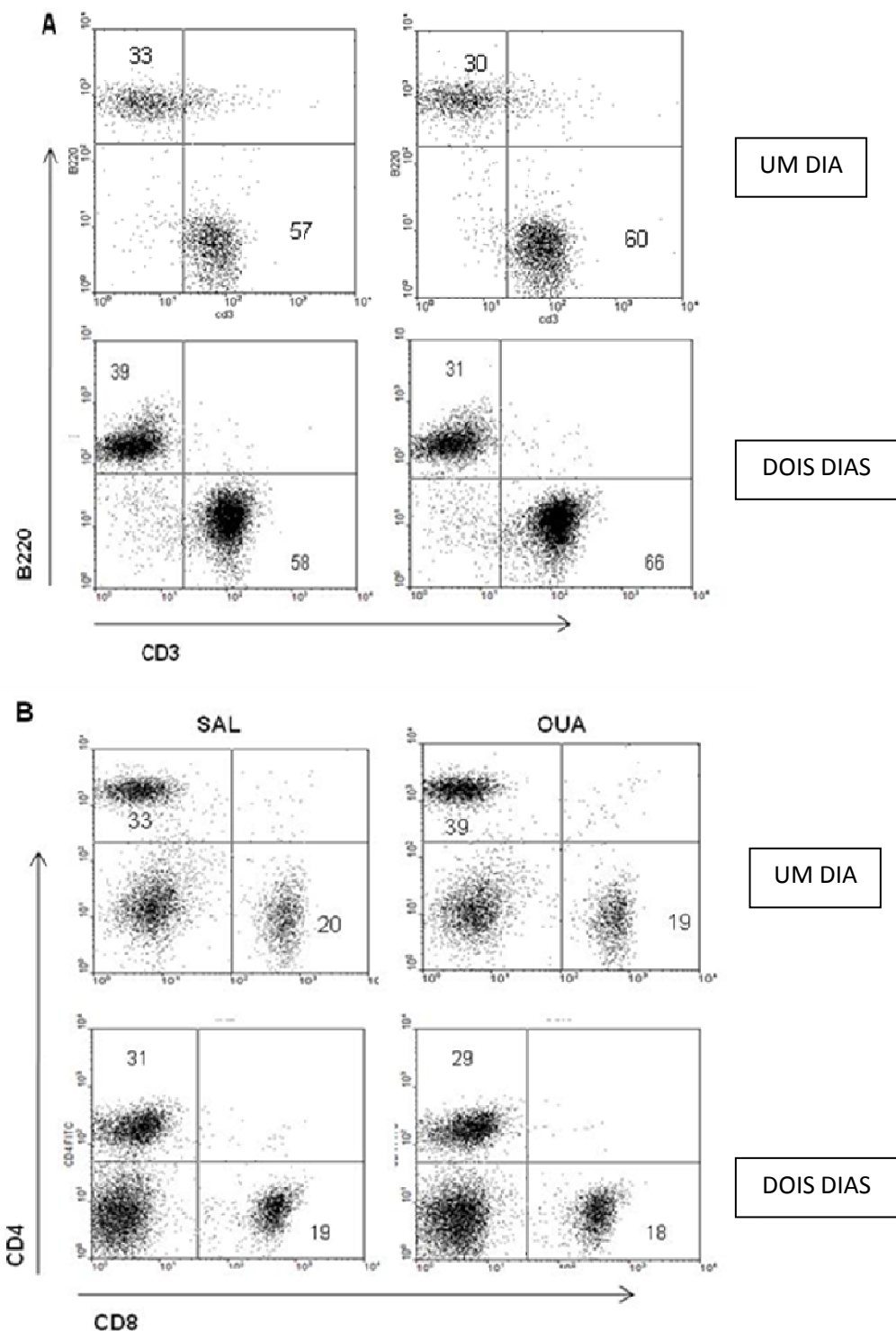


Figura 11. Proporção das populações de linfócitos T e B e subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em animais tratados com ouabaína por um ou dois dias, em linfonodos mesentéricos. Linfócitos foram tratados com solução salina (SAL) ou ouabaína (OUA) 0,56mg/Kg por um ou dois dias e marcados com os anticorpos anti- CD3, anti-B220, anti-CD4 e anti-CD8 de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, realizou-se leitura por citometria de fluxo.. Os números da abscissa representam a expressão da molécula de superfície CD3 (linfócitos T – Fig. 11A) e CD8 (linfócitos T CD8⁺ - Fig. 11B) e da ordenada, B220 (linfócitos B – Fig. 11A) e CD4 (linfócitos T CD4⁺ – Fig. 11B). Foi utilizado um n de três animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

A confirmação da existência, no plasma humano, de um composto esteroidal endógeno estruturalmente, biologicamente e imunologicamente idêntica à ouabaína extraída de plantas (HAMLYN, 1991) levanta a hipótese de que esta substância exerce atividade moduladora na manutenção da homeostase corpórea.

O presente trabalho avaliou a possível ação imunomoduladora da ouabaína, *in vivo*, em animais pré-tratados por três dias consecutivos utilizando a dose de 0,56mg/kg, já estabelecida em estudos anteriores pelo nosso grupo, por meio do modelo de peritonite induzida por Con A, análise do sangue periférico e estudo do perfil linfocitário de órgãos linfóides primários e secundários. Além disso, *in vitro*, verificou-se a ação da ouabaína em linfócitos provenientes de animais previamente tratados também por três dias, estimulados pelo mitógeno concanavalina A (Con A), por meio de ensaio de viabilidade celular utilizando a técnica do MTT.

A inflamação, iniciada por citocinas e quimiocinas, caracteriza-se pela dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, levando a um aumento do fluxo sanguíneo local e ao extravasamento de fluído para os tecidos. Na fase inicial deste processo os principais tipos de células presentes são os macrófagos e, em grande número, os neutrófilos. O influxo de neutrófilos é logo seguido pelo de monócitos, que rapidamente, diferenciam-se em macrófagos, dando continuidade à resposta inata (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As paredes celulares de vários patógenos apresentam estruturas regulares, a exemplo das lectinas, que são reconhecidas pelo sistema imunológico como não pertencentes a componentes próprios do organismos, desencadeando respostas imunes. Com o intuito de simular respostas biológicas desencadeadas por microorganismos, lectinas de vegetais são utilizadas em modelos experimentais, a exemplo da Con A (BAINTNER *et al.*, 2007).

Utilizando o modelo de peritonite induzida por Con A, verificamos que animais tratados por três dias consecutivos pela ouabaína e que foram desafiados com a Con A, apresentaram uma redução do influxo de células totais para o peritônio em torno de 76% em relação ao grupo apenas desafiado com a referida lectina. Além disso, na contagem diferencial realizada dos leucócitos presentes no infiltrado celular, essa redução refletiu-se na diminuição do número de leucócitos porlimorfonucleares, principalmente, neutrófilos.. A partir desta mesma contagem diferencial verificou-se que a ouabaína foi capaz de aumentar o número de leucócitos mononucleares em relação a animais do grupo Con A.

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares com grande capacidade fagocitária que chegam ao sítio inflamatório pela ação de citocinas e quimiocinas liberadas por macrófagos ao entrarem em contato com antígenos microbianos. As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α têm ampla modulação sobre esses leucócitos na resposta inflamatória, e, por sua vez, são reguladas pelo fator de transcrição NF- κ B (CARMICHAEL & WILLS, 2005).

Estudos anteriores demonstraram que a ouabaína reduz *in vivo* e *in vitro* a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α após estímulo por LPS (MATSUMORI *et al.*, 1997), podendo este efeito estar relacionado com a redução do infiltrado peritoneal relatado acima.

Além disso, Yang e colaboradores (2005) identificaram que glicosídeos como a digoxina (que também apresenta habilidade em modular a Na⁺/K⁺ATPase) e a olenadrina suprimem a via de sinalização inflamatória induzida pelo NF- κ B e TNF- α , podendo isto também estar relacionado à modulação na expressão neutrofílica no modelo supracitado.

Monócitos derivam dos mesmos precursores mielóides dos neutrófilos e se mantêm circulantes no sangue até se diferenciarem em macrófagos teciduais, adquirindo características dependentes do tecido em que vão atuar (CARMICHAEL & WILLS, 2005).

Macrófagos sofrem uma resposta fisiológica denominada MDR (*macrophage disappearance reaction* – reação de desaparecimento de macrófagos) em resposta a determinados estímulos no peritônio. Nesta resposta, após estímulo inflamatório, mecanismos de coagulação, intimamente relacionados a processos inflamatórios, induzem uma diminuição no número de macrófagos no lavado peritoneal, pelo aumento da adesividade à parte interna da membrana do peritônio. Esse fenômeno parece ser essencial para a ativação dos macrófagos e em até 48 horas após o contato com estímulo flogístico, o número de macrófagos se reestabelece (BARTH *et al.*, 1995). Tal fato justifica a redução do número de macrófagos encontrado após o tratamento com a Con A.

Por outro lado, o aumento do número de macrófagos, em comparação ao grupo Con A, no lavado peritoneal causado pela ouabaína pode estar relacionado a uma inibição da ativação dessas células. Estudos indicam que a ouabaína diminui a expressão de mCD14 em monócitos por meio da transativação do EGRF e da MAPK p38 (VALENTE *et al.*, 2009). O mCD14 é um receptor presente na superfície

citoplasmática dos monócitos e representam um importante papel na geração de resposta imune inata contra patógenos bacterianos.

A análise do esfregaço sanguíneo de animais pré-tratados com ouabaína bem como a avaliação da biometria e da celularidade do timo, baço e linfonodos mesentéricos não apresentaram alterações quando comparados aos animais que receberam solução salina por três dias consecutivos.

Os linfócitos são as células que melhor representam a resposta imune adaptativa. O linfócito B tem origem na medula óssea, local onde passa por processos de maturação e diferenciação, para posteriormente se direcionar aos órgãos linfóides periféricos, como o baço e linfonodos. Por sua vez, o linfócito T também se origina na medula óssea, mas desenvolve seus processos de maturação e seleção no timo. Só após tais processos, o linfócito T encaminha-se aos órgãos linfóides periféricos.

Apesar de não haver sido encontrada diferença nos parâmetros peso e celularidade dos órgãos linfóides estudados, verificamos se o perfil percentual da população de linfócitos presentes em tais órgãos expressava alteração quando comparados animais que receberam solução salina ou ouabaína 0,56mg/kg por três dias consecutivos.

Analisando-se as populações de linfócitos T e B do linfonodo mesentérico, verificou-se que o tratamento com a ouabaína reduziu a população de linfócitos T enquanto que a população de linfócitos B do grupo ouabaína expressou um aumento em torno do mesmo percentual.

Considerando-se o fato de que a alteração de linfócitos T pode ser consequência da maturação dessas células, o que afetaria as subpopulações das mesmas, estudou-se a expressão de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no timo e nos linfonodos mesentéricos.

Nos linfonodos mesentéricos, as subpopulações de linfócitos T dos animais tratados com ouabaína apresentaram redução no percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparados ao grupo salina, como reflexo da redução dos linfócitos T CD3⁺ supracitada. Entretanto, a proporção entre os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, manteve-se preservada.

No timo não foi encontrada alteração percentual na proporção das subpopulações linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ avaliadas entre os animais que foram tratados com solução salina e com ouabaína.

Esses dados indicam que, nesse modelo, parece não haver interferência na maturação de linfócitos no timo. No entanto, a análise dos dados sugere uma modulação periférica, de forma direta ou indireta, nos linfonodos mesentéricos, alterando o perfil das subpopulações de linfócitos. Esses dados podem contribuir para o entendimento dos vários efeitos imunossupressores da ouabaína já descritos na literatura.

Em linfócitos maduros do sangue periférico humano, a ouabaína foi capaz de inibir a proliferação desencadeada por mitógenos, sendo possível detectar no ciclo celular um bloqueio da fase G1 para S, apesar da indução da expressão de CD69, molécula relacionada à ativação celular (PIRES *et al.*, 1997). Esta inibição foi relacionada ao aumento na expressão do mRNA do proto-oncogen *c-myc*, indicando a morte por apoptose (OLEJ *et al.*, 1998).

A utilização apenas da ouabaína na dose utilizada neste trabalho não é capaz de induzir morte celular. No entanto em sinergismo com corticóides, este glicosídeo intensifica a lise celular por apoptose de timócitos (RORIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2006b).

Estudos indicam que a ação inibitória da ouabaína em timócitos estimulados por mitógeno, como o éster de forbol, e tratados com taspigargina está relacionada a modulações no influxo de Ca^{2+} e não somente a alterações das concentrações intracelulares de Na^{+} e K^{+} , devido à sua ação sobre a $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}\text{ATPase}$ (ECHEVARRIA-LIMA *et al.*, 2003; RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2003).

A partir da característica imunossupressora das células T regulatórias (SAKAGUCHI *et al.*, 2008) e dos efeitos anti-inflamatórios da ouabaína, verificou-se a expressão das células T $\text{CD4}^{+}/\text{CD25}^{+}$, não sendo encontrada nenhuma diferença percentual em relação a estas células quando comparados animais tratados por três dias consecutivos com solução salina ou ouabaína 0,56 mg/Kg. Portanto, o efeito supressor da ouabaína em linfócitos dos linfonodos mesentéricos, parece ser independente das células T regulatórias.

Com o intuito de verificar se tratamentos inferiores a três dias expressariam diferenças nos resultados encontrados neste trabalho, realizou-se a análise, nos linfonodos mesentéricos, das populações de linfócitos T e B e das subpopulações de linfócitos T CD4^{+} e CD8^{+} em animais tratados por um ou dois dias, não sendo encontrada nenhuma alteração quando comparados os animais tratados com solução salina e ouabaína 0,56 mg/kg.

Estudos realizados por Paiva e colaboradores (comunicação pessoal) acerca da modulação da ouabaína em linfócitos B, sugerem resultados semelhantes no que se refere ao tempo de tratamento com a ouabaína. Estes dados corroboram a necessidade de três dias de tratamento com a ouabaína para a obtenção das respostas observadas.

Em timócitos murinos, a ouabaína, *in vivo*, foi capaz de inibir a proliferação destas células estimuladas com o mitógeno Con A, por meio da diminuição dos níveis do fator de transcrição NFAT, inibindo a síntese de IL-2 e reduzindo a ativação da MAPK p38 (RODRIGUES-MASCARENHAS *et al.*, 2008).

A partir desses estudos e levando-se em consideração o resultado acima citado da redução de linfócitos T (CD3⁺) encontrada nos linfonodos mesentéricos, avaliou-se a ação *in vivo* da ouabaína administrada por três dias consecutivos, em linfócitos provenientes de linfonodos mesentéricos estimulados, *in vitro*, pelo mitógeno Con A.

Neste modelo, foi utilizado o ensaio de viabilidade celular utilizando a técnica do MTT, que verifica a atividade mitocondrial por meio da ação de desidrogenases na redução do sal tetrazólico.

Após o período de incubação de 48h, os linfócitos de animais tratados com solução salina e estimulados com Con A apresentaram aumento significativo na atividade mitocondrial. Em contrapartida, a ouabaína 0,56 mg/kg foi capaz de reduzir o efeito deste mitógeno, visto que linfócitos de animais tratados com este glicosídeo por três dias consecutivos exibiram uma redução do efeito da Con A em torno de 30%.

Esta redução pode estar associada à resposta encontrada nos linfonodos mesentéricos, em ensaios de citometria de fluxo supracitados, onde o tratamento dos animais por três dias consecutivos com a ouabaína diminuiu a proporção dos linfócitos T CD3⁺.

Sendo assim, a ouabaína é capaz de modular negativamente a resposta imunológica inflamatória, como descrito nos resultados do modelo de peritonite induzida por Con A. Além disso, apesar de não alterar a biometria e a celularidade dos órgãos linfóides estudados, interfere na proporção de linfócitos T e B nos linfonodos mesentéricos e na funcionalidade dos linfócitos T, como observado no ensaio de viabilidade por MTT.

Esses dados corroboram o conceito imunomodulador desta substância e contribuem para o entendimento do seu papel fisiológico e imunossupressor.

6.CONCLUSÕES

- O tratamento por três dias consecutivos com ouabaína utilizando a dose de 0,56 mg/kg foi capaz de induzir a inibição no influxo de células totais para o peritônio induzido pela Con A, sendo este fato reflexo da redução do número de leucócitos polimorfonucleares, principalmente, neutrófilos. Neste mesmo modelo, a ouabaína também foi capaz de aumentar o número de leucócitos mononucleares no lavado peritoneal.
- Parâmetros como o número de leucócitos do sangue periférico, biometria e celularidade do baço, timo e linfonodos mesentéricos não apresentaram alteração em resposta ao tratamento com a ouabaína.
- Em linfonodos mesentéricos, *in vivo*, a ouabaína, na mesma dose e com o mesmo período de tratamento supracitados, foi capaz de induzir a diminuição do percentual de linfócitos T CD3⁺ e o aumento de linfócitos B.
- Nestes mesmos órgãos, as subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, apresentaram uma redução percentual quando comparadas as do grupo salina condizente com a redução encontrada nos linfócitos T CD3⁺. No entanto, as subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ não expressarem diferenças proporcionais entre si.
- O mesmo tratamento, com a mesma dose de ouabaína, não modificou a proporção das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ no timo.
- *In vivo*, no timo e nos linfonodos mesentéricos, a avaliação da expressão das células Tregulatórias CD4⁺/CD25 não sofreu modificação pela ação do tratamento de três dias consecutivos da ouabaína 0,56mg/kg.
- O estudo comparativo, *in vitro*, da atividade mitocondrial, por meio do teste de viabilidade do MTT, em linfócitos estimulados pela Con A que receberam, *in vivo*, tratamento por três dias consecutivos com ouabaína 0,56 mg/Kg ou solução salina, indicou uma ação inibitória da ouabaína.
- Tratamentos de um ou dois dias, com a mesma dose de 0,56 mg/Kg não desencadearam modulação, *in vivo*, nas populações de linfócitos T, linfócitos B e das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos mesentéricos.
- A ouabaína possui ação imunomoduladora.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar o modelo de peritonite induzida por Con A em animais tratados com ouabaína por 1 e 2 dias ;
- A partir deste mesmo modelo, avaliar, *in vivo*, a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 por células presentes no lavado peritoneal em animais tratados com ouabaína;
- Avaliar, *in vitro*, citocinas produzidas por linfócitos de animais tratados com ouabaína;
- Estudar, *in vitro*, por meio de citometria de fluxo, o ciclo celular de linfócitos provenientes de animais tratados com ouabaína e estimulados com o mitógeno Con A;
- Verificar, *in vitro*, se a ouabaína interfere na expressão de CD69 em linfócitos T provenientes de animais tratados com ouabaína e ativados por Con A.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia Celular & Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2008.

AIZMAN, O.; ULHEN, P.; LAL, M.; BRISMAR, H.; ASPERIA, A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 13420-13424, 2001.

BAGROV, A. Y., SAHPIRO, J. I. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. *Nat Clin Pract Nephrol*, v. 4, p. 378–392, 2008.

BAINTNER, K., BODNAR, Z., KISS, P., KISS, A. L., LUKATS, A. Effect of intraperitoneally administered and plant lectins on leukocyte diapedesis and visceral organ weight in rats and mice. *Pathology Oncology Research*, v. 13, p. 139-143, 2007.

BAUER, N., MÜLLER-EHMSSEN, J., KRÄMER, U., HAMBARCHIAN, N; ZOBEL, C., SCHWINGER, R. H. G., NEU, H., KIRCH, U., GRÜNBAUM, E. G., SHONER, W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs – effects of β - blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*, v. 45, p. 1024-1028, 2005.

BENJAMINI, E., COICO, R., SUNSHINE, G. *Imunologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002.

BLAUSTEIN, M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{++} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol*, v. 264, p. 1367-1387, 1993.

BOMMIREDDY, R., BABCOCK, G. F., SINGHE, R. R., DOETSCHMAN, T. $\text{TGF}\beta 1$ deficiency does not affect the generation and maintenance of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ putative T_{reg} cells, but causes their numerical inadequacy and loss of regulatory function. *Clin Immuno*, v. 127, p. 206-213, 2008.

BORTNER, C. D., HUGHES, F.M. JR, CIDLOWSKI, J. A. A primary role K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 32436-32442, 1997.

CARMICHAEL, A., WILLS, M. The Immunology of Infection. *Medicine*, v. 33, p. 3-9, 2005.

CARP. R. I., LICURSI, P. C., MERZ, P. A. MERZ, G. S. Neutrophils in mouse peripheral blood after inoculation with material from Multiple sclerosis patients. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 136, p. 618-29, 1972.

CRAMBERT, G., GEERING, K. FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na,K-ATPase. *Sci STKE*, v. 166, p. 1-9, 2003.

CRIPPS, J. G., CRESPO, F. A., ROMANOVSKI, P., SPATOLA, A. F., FERNANDEZ-BOTRA, R. Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan-cytokine interactions. *International Immunopharmacology*, v. 5, p. 1622-1632, 2005.

DÂNGELO, J. G., FATTINI, C. A. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*. 2 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2002.

DARDENNE M., SAVINO, W. Interdependence of the endocrine and immune systems. *Advances in Neuroimmunology*, v. 6, p. 297-307, 1996.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest*, v. 11, p. 503–508, 2000.

DOAN, T., MELVOLD, R., DOAN, C. *Imunologia Médica Essencial*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2006.

DOSTANIC-LARSON, I. LORENZ, J. N., VAN HUYSSSE, J. W. NEUMANN, J. C., MOSELEY, A. E., LINGREL, J.B. Physiological role of the alpha1- and alpha 2-isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 290, p. 524–28, 2006.

ECHEVARIA-LIMA, J, ARAÚJO, E. G., MEIS, L. RUMJANEK, V. M. Ca²⁺ Mobilization Induced by Ouabain in Thymocytes Involves Intracellular and Extracellular Ca²⁺ Pools. *Hypertension*, v. 41, p. 1386-1392, 2003.

ECHEVARIA-LIMA, J., RUMJANEK, V. M. Effect of ouabain in the immune system. *Current Hypertension Reviews*, v. 2, p. 83-95, 2006.

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, p. 886-896, 1997.

GARNEA, D. Regulatortory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs. *Advances in Neuroimmunology*, v. 6, p. 61-74, 1996.

HAAS. M., WANG, H., TIAN. J., XIE, Z. Src-mediated Inter-receptor Cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the Epidermal Growth Factor Receptor Relays the Signal from Ouabain to Mitogen-activated Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 18694-18702, 2002.

HAMLYN J.M., BLAUSTEIN M.B., BOVA S., DUCHARME D.W., HARRIS, D.W., HARRIS, D.W., MANDEL, F., MATHEWS W.R., LUDENS J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasm. *Proc Natl Acad Sci*, v. 88, p. 6259-6263, 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. *Ann N Y Acad Sci*, v. 986, p. 685-693, 2003.

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

HORISBERGER, J. D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)*, v. 19, p. 377-387, 2004.

JAWETZ, E., LEVINSON, W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 7. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005.

KAWAMURA, A., J. GUO, Y. ITAGAKI, Y., WANG, Y., HAUPERT, G. T., JR, MAGIL, S., GALLGHER, R. T., BEROVA, N., NAKANISHI, K. On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci*, v.96, p. 6654-6659, 1999.

KOSLWOSKA, E., BIERNACKA, M., CIECHOMSKA, M., DRELA, N. Age-related changes in the occurrence and characteristics of thymic CD4⁺ CD25⁺ T cells in mice. *Immunology*, v. 122, p. 445-453, 2007.

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

LAREDO, J., SHAH, J.R., LU, Z., HAMILTON, B.P. , HAMLYN, J. M. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cortical cells via angiotensin II receptors. *Hypertension*, v. 29, p. 401-407, 1997.

LEUNG, K. VCAM-1 internalizing peptide-28 nanoparticles. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database*, v. 1, p. 1-4, 2007.

LINGREL, J. B. The Physiological Significance of the Cardiotonic Steroid/Ouabain-Binding Site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol*, v. 72, p. 395-412, 2010.

LUSTER, A.D. Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine*, v. 338, p 436-445, 1998.

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, p. 5959-5068, 2001.

MANUNTA, P., FERRANDI, M., BIANCHI, G, HAMLYN, J. M. Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease. *Journal of Hypertension*, v. 27, p. 9-18, 2009.

MATSUMORI, A., ONO, K., NISHIO, R., IGATA, H., PHARM, B, SHIOI, T., MATSUI, S., FURUKAWA, Y., IWASAKI, A., NOSE, Y., SASAYAMA, S. Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. *Circulation*, v. 96, p. 1501-1506, 1997.

McCONKEY D.J., HARTZELL P., AMADOR-PEREZ J.F., ORRENIUS S., JONDAL M. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *Journal of Immunology*, v. 6, p. 1801-1806, 1989.

MORAES, V. L.G., OLEJ, B., DE LA ROCQUE, L., RUMJANEK, V.M. Lack of sensitivity to Ouabain in natural killer activity. *FASEB J*, v. 3, p. 2425-2429, 1989.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal o Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2010.

NAKA, T., NISHIMOTO, N., KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Research*, v. 4, p. 233-242, 2002.

OBERHOLZER, A., OBERHOLZER, C., BAHJAT, K.S., UNGARO, R., TANNAHIL, C. L., MURDAY, M., BAHJAT, F. R., ABOUHAMZE, Z., TSAI, V. LaFACE, D., HUTCHINS, B., MOLDAWER, L. L., CLARE-SALZLER, M. J. Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells. *Journal of Immunology*, v. 168, p. 3412-3418, 2002

OLEJ, B., DELA ROCQUE L., CASTILHO, F.P.D., MEDIANO, I.F., CAMPOS, M.M., RUMJANEK, V.M Effect of ouabain on lymphokine – activated killer cells. *Int J Immunopharmacol*, v. 16, p. 769-774, 1994.

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

PADGETT, E. L., SIBLEY. D. A., JERRELIS, T.R. Effect of adrenalectomy on ethanol-associated changes in lymphocyte cell numbers and subpopulations in thymus, spleen, and gut-associated lymphoid tissue. *Journal of Immunopharmacology*, v. 22, p. 285-298, 2000.

PASTORET, P., GRIEBEL, P.,BAZIN, H., GOVAERTS, A. *Handbook of Vertebrate Immunology*. San Diego: Academic Press, 1998.

PEAKMAN, M., VERGANI, D. *Imunologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999.

PEARCE, P., KHALID, B.A., FUNDER, J.W. Androgens and the thymus. *Endocrinology*, v. 109, p. 1073-1077, 1981.

PETKOVA, S. B., YUAN, R., TSAIH, S., SCHOTT, W., ROOPENIAN, D. C., PAIGEN, B. Genetic influence on immune phenotype revealed strain-specific variations in peripheral blood lineages. *Physiol Genomics*, v. 34, p. 304-314, 2008.

PIRES, V., HARAB, R. C., OLEJ, B., RUMJANEK, V. M. Activated lymphocytes: augmentation of CD25 expression on TPA-stimulated cells and of CD69 on PHA- and TPA-stimulated cells. *Int J Immunopharmac*, v. 19, p. 143-148, 1997.

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

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, v. 15, p. 3-17, 2004.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Imunologia*. 6 ed. São Paulo: Ed. Manole, 2003.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S., ECHEVARRIA-LIMA, J., DOS SANTOS, N.F., 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, p. 1037-1051, 2003.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. *Regulação de timócitos por ouabaína: mudanças fenotípicas e funcionais*. 2006a. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S., DOS SANTOS, N. F., RUMJANEK, V. M. Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy. *Biosci Rep*, v. 26, p. 159-169, 2006b.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S., BLOISE, F. F., MOSCAT, J., RUMJANEK, V. M. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. *Cell Biology International*, v. 32, p. 1323-1328, 2008.

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

RODRIGUEZ, D., CAVADA, B. S., ABREU-DE-OLIVEIRA, J. T., DE-AZEVEDO-MOREIRA, R. RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 25, p. 823-826, 1992.

RUMJANEK, V. M., PIUVEZAM, M. R., RODRIGUES-MASCARENHAS, S. O sistema neuroimunoendócrino: um novo alvo para intervenções farmacológicas. In: Almeida, R. N. (org.). *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006, p. 322-344.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, v. 220, p. 568-575, 1983.

SHARON, J. *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000.

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

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

SCHONER W., SCHEINER-BOBIS G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, v. 7, p. 173-189, 2007.

SHAH J.R., LAREDO J., HAMILTON, B.P., HAMLYN, J. M. Effects of angiotensin II on sodium potassium pumps, endogenous ouabain, and aldosterone in bovine zona glomerulosa cells. *Hypertension*, v. 33, p. 373-377, 1999.

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

STOECK, M., NORTHOFF, H. e RESCH, K. Inhibition of mitogen-induced lymphocyte proliferation by Ouabain: interference with interleukin 2 production and interleukin 2 action. *J Immunol*, v. 1313, p. 1433-1437, 1983.

STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nature*, v. 5, p. 575-581, 2004.

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

TIAN, J., CAI, T., YUAN, Z., WANG, H., LIU, L., HAAS, M., MAKSIMOVA, E., HUANG, X., XIE, Z. Binding of Src to Na⁺/K⁺ATPase Forms a Functional Signaling Complex. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, p. 317–326, 2006.

VASCONCELOS, T. H. C., MODESTO-FILHO, J., DINIZ, M. F.F.M., SANTOS, H. B., AGUIAR, F. B., MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato de das folhas de Cissus sicyoides L. (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 583-591, 2007.

VIEIRA, G, C. *Efeito do tratamento por nebulização com o extrato de Cissampelos sympodialis Eichl (Menispermaceae) em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina*. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa.

WACHTFOGEL, Y. T., DeLa CADENA, R. A., COLMAN, R. W. Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb Res*, v. 72, p. 1-21, 1993.

YANG. Q., HUANG, W., JOZWIK, C., LIN, J., GLASMAN, M., CAO HUY, H., SRIVASTAVA, M., ESPOSITO, D., GILLETTE, W., HARTLEY, J. POLLARD, H. B. Cardiac glycosides inhibit TNF- α /NF- κ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. *PNAS*, v. 102, p. 9631-9636, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Artigo submetido no periódico Mediators of inflammation

--- Em **qua, 24/11/10**, **Mediators of Inflammation** <noheyr.ehab@hindawi.com> escreveu:

De: Mediators of Inflammation <noheyr.ehab@hindawi.com>

Assunto: MI/912925: Acknowledging Receipt

Para: sandramascarenhas@luf.ufpb.br

Cc: noheyr.ehab@hindawi.com, daniingridb@hotmail.com, jacqpet@hotmail.com,
lucianatelesc@yahoo.com.br, mrpiuvezam@luf.ufpb.br, franjinhapro@hotmail.com,
liana@luf.ufpb.br, vivianrumjanek@yahoo.com.br

Data: Quarta-feira, 24 de Novembro de 2010, 7:59

Dear Dr. Rodrigues-Mascarenhas,

The Research Article titled "ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF OUABAIN IN MICE," by Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos, Jacqueline Alves Leite, Luciana Teles Carneiro, M.R. Piuvezam, Maria Raquel Vitorino de Lima, Liana Cl?bia Lima de Moraes, Vivian Mary Rumjanek and Sandra Rodrigues-Mascarenhas has been received and assigned the number MI/912925.

An editor will be assigned to handle the review process of your manuscript, and he/she will inform you as soon as a decision is reached.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the journal's Manuscript Tracking System.

Thank you for submitting your work to Mediators of Inflammation.

Best regards,

Noheyr Ehab

Editorial Office

Hindawi Publishing Corporation

<http://www.hindawi.com>

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF OUABAIN IN MICE

Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos¹, Jacqueline Alves Leite¹, Luciana Teles Carneiro¹, Márcia Regina Piuvezam¹, Maria Raquel Vitorino de Lima¹, Liana Clébia Lima de Moraes¹, Vivian Mary Rumjanek² and Sandra Rodrigues-Mascarenhas¹

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

2- Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence Address: Sandra Rodrigues Mascarenhas

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

Departamento de Fisiologia e Patologia

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal da Paraíba

58051-970 - João Pessoa, Paraíba - Brasil

e-mail: sandramascarenhas@lft.ufpb.br

Running Title: Ouabain and inflammation

Key Words: Ouabain, inflammation, mice.

ABSTRACT

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

1-INTRODUCTION

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

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

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

Besides the effects described in the immune system, little is known about the role of ouabain in inflammatory processes. During inflammation, a complex program of intracellular signal transduction and transcription events, driven by multiple pro-

inflammatory mediators and cytokines, is activated. The acute inflammation is characterized by exudation of protein-rich fluid, edema, vasodilatation and cell migration, primarily neutrophils, into the site of injury [25]. It was reported that ouabain suppressed the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α stimulated with LPS both *in vitro* and *in vivo* [26]. In addition, cardiac glycoside drugs inhibits TNF- α /NF- κ B signaling pathway, which is a central common regulator for the process of inflammation [27].

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

2-MATERIAL AND METHODS

Animals

Female swiss albino mice (2 months old) were housed in a temperature-controlled room, and received water and food *ad libitum*. During the experiments, animals were treated in accordance with standard regulations for animal laboratorial use (number 0407/08).

Treatment with ouabain

In all experiments, 0.56mg/kg ouabain [16] or PBS was given intraperitoneally (i.p.) for three consecutive days.

Inflammatory paw edema

To induce inflammation, mice received intraplantar injections of carrageenan (2, 5%), compound 48/80 (2 μ g/paw), zymosan (1%), histamine (100 μ g/paw), prostaglandin E2 (5 μ g/paw) and bradykinin (6 nmol/paw) in 20 μ l of phosphate buffered saline (PBS) in the right (ipsilateral) hindpaw and 20 μ l of saline in the left (contralateral) hindpaw. Captopril (5mg/kg) was used 1h prior to bradykinin challenge in order to prevent the action of kininases [28]. All the reagents were obtained from Sigma. Hindpaw edema was measured with a digital micrometer, and is expressed as the difference of thickness (mm) between the stimulated and the saline-injected paw. Dexamethasone (0,5mg/kg), indomethacin (10mg/Kg) and salbutamol (10mg/kg) were used as anti-inflammatory controls and injected i.p. one hour before intraplantar injections.

Peritoneal inflammation model

Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 60 μ g Concanavalin A diluted in sterile saline solution to a final injection volume of 0.1 ml. After 24h, animals were sacrificed and peritoneal lavage was performed with 10 ml of sterile PBS. The fluid was removed for total and differential cell counts and results were reported as cell number/mL of peritoneal wash. Differentiation of leukocyte sub-populations in

peritoneal lavage fluids was performed on cytospin preparations stained with Wright–Giemsa solution (Sigma, St. Louis, MO). For each slide, a minimum of 100 cells was counted microscopically under 1000 magnification.

Acetic acid induced writhing test

Acetic acid administration causes irritation resulting in painful contortions followed by extension of hind limbs [29]. The animals were injected i.p. with 0.1mL/10g of 0.8% (v/v solution) acetic acid one hour after the last treatment with ouabain (0.56mg/kg). Morphine (6mg/Kg) (i.p.) was used for analgesy. Ten minutes after the administration of acetic acid, mice were placed in separate boxes and the number of abdominal writhes was counted for 10 minutes. The antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal writhes when compared to control animals.

Hot plate

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

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by Unpareid test or ANOVA followed *Dunnett's test*, and the results were considered significant if $P < 0.05$.

3-RESULTS

Effect of ouabain on carrageenan, zymosan and 48/80 -induced mice paw edema

The paw edema induced by carrageenan and zymosan involves various mediators such as histamine, bradykinin and prostaglandins [31, 32]. Carrageenan-induced paw edema was significantly reduced in a time-dependent manner by the treatment of 0.56mg/Kg ouabain at 30 minutes (54.9%), 1st (66.4%), 2nd (51.0%) and 5 hour (51.9%) after carrageenan treatment (Fig.1A). On the other hand, ouabain did not interfere in the edema present 24 h after carrageenan injection. A significant anti-inflammatory effect of indomethacin at the dose of 10mg/Kg was observed at all times studied. Similarly to what was observed with carrageenan, ouabain also prevented zymosan edema formation at the 1st (54.4%), 2nd (47.1%), 3rd (34.7%) and 4th hour (26.9%) after treatment, as well as did 0.5mg/kg dexamethasone

(Fig.1B). Paw edema induced by 48/80 was short lasted, with a peak 30 min after injection. Ouabain significantly inhibited the edema, but to a lesser extent than salbutamol, at 30 (69.1%), 60 (79.7%) and 120 minutes (49.7%) after compound 48/80 injection (Fig.1C).

Effect of ouabain on paw edema triggered by different inflammatory mediators

A number of mediators are involved in the inflammatory response elicited by carrageenan, zymosan and 48/80 [31-34]. The effect of ouabain was tested against inflammation induced by different mediators and compounds, including histamine, prostaglandin E2 and bradykinin. A significant anti-inflammatory effect of salbutamol and dexamethasone was always observed. The results in Fig.2A indicate that ouabain was incapable to inhibit the edema induced by histamine at any of the times studied. On the other hand, the administration of Ouabain produced a significant reduction in the mouse paw edema induced by prostaglandin E2 and bradykinin (Fig.2B and C). A significant anti-edema effect of ouabain was observed at 15 (79.8%), 30 (82.1%) and 60 minutes (96.0%) after prostaglandin E2 challenge and at 15 (34.0%), but not at 30 minutes after bradykinin challenge.

Effect of ouabain treatment on the cellular influx into the peritoneal cavity

Peritoneal inflammation was induced and the number of cells recruited into the peritoneal cavity was measured as an indication of the degree of inflammation. As shown in Fig. 3A, administration of ouabain alone had no effect on the number of resident peritoneal cells in unchallenged mice. However, after induction of inflammation, treatment with ouabain led to a 70-80% reduction in the total cell numbers in the peritoneal cavity after 24h, as a reflex of the inhibition of polymorphonuclear leukocytes (Fig.3B). These data are consistent with an attenuated inflammatory response observed.

Effect of ouabain on acetic acid induced writhing response

The results of acetic acid-induced writhing responses in mice, which indicates ouabain's analgesic activity were presented in Fig. 4. It was demonstrated that ouabain caused a significant inhibition (45%) on the writhing responses induced by acetic acid when compared to the control group, as well as did the analgesic drug, 6mg/kg morphine (78%).

Effect of ouabain on the hot plate test

The results of the hot plate test revealed that the latency time was increased (74%) when animals were tested 30 minutes after the last injection of ouabain. On the other

hand, ouabain was not capable to interfere in the latency observed after 60 or after 120 min ouabain injection. The analgesic drug, 6mg/kg morphine modulated the pain, increasing the latency time (more than 70%)

4-DISCUSSION

Inflammation is a local or systemic tissue reaction caused by injurious agents that inhibits its further dissemination, eventually repair damaged tissue and may cause pain. Three major events occur during the inflammatory response: the blood supply to the affected area is increased substantially, capillary permeability is increased, and leukocytes migrate from the capillary vessels into the surrounding interstitial spaces to the site of inflammation or injury [35].

Inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1), trigger the activation of transcription factor NF-kappaB, that induces the expression of a variety of genes. It has been demonstrated that ouabain prevents NF-kappaB-inducible protein expression [36]. Besides that, digitoxin and structurally related cardiac glycoside drugs potently block activation of the TNF-alpha/NF-kappaB signaling pathway [26]. It was also demonstrated that ouabain regulates the production of proinflammatory cytokines such as interleukin IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor [26, 37] and enhances the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production [38].

In agreement with the immunosuppressive effects that have been previously observed, in the present work ouabain inhibited inflammation and nociception. To study the role of ouabain in the inflammatory process, initially we used the carrageenan and zymosan-induced paw edema. These models induce inflammatory responses, including edema formation, neutrophil infiltration and development of hyperalgesia [39]. Henriques and co-workers [40] showed that carrageenan injection into the mouse paw induces a biphasic edema that develops in the first 6h, followed by a second phase, that starts at 24h. The early phase is mainly mediated by histamine, serotonin and by an increasing synthesis of prostaglandins such as prostaglandin E₂. Recent studies have shown that carrageenan also induces peripheral release of nitric oxide (NO) sustained by TNF- α , IFN- γ and IL-1. These cytokines have been shown to induce iNOS in a variety of cells [41]. The late phase is mainly sustained by prostaglandin release and NO [42]. In the present work, we found that ouabain inhibits the inflammation after 30min, 1, 2 and 6h, but not after 24h of carrageenan challenge. The anti-inflammatory effect observed in the first phases could be related to the suppression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α [26] and by the blockade of the TNF- α /NF- κ B signaling pathway [27]. In agreement with the results using carrageenan, ouabain was also able to inhibit zymosan edema formation at all periods studied. The intraplantar administration of zymosan activates of the complement system [43] promotes increased expression of COX-2 and prostaglandin production, mainly of type E₂, and increases the production of nitric oxide [29]. A *controversy* exists regarding the *role* played by ouabain on mast cell degranulation. Stimulatory and inhibitory effects were reported [44, 45]. Some data have also demonstrated that ouabain had no effect on mast cell degranulation [46]. In this work, the edema induced by mast cell degranulation using 48/80 was also inhibited.

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

Another feature of acute inflammation is cell migration, primarily neutrophils, into the site of injury. The inhibitory effect of ouabain on neutrophil migration was confirmed through peritoneal inflammation induced by concanavalin-A. This mitogen possess chemotactic activity for neutrophils [47] and ouabain produced a clear inhibition in the influx of polymorphonuclear cells to the peritoneal cavity. Together with the previous data, this result clearly demonstrates that ouabain has an anti-inflammatory effect.

Prostaglandins are potent sensitizing agents, able to modulate multiple sites of nociceptive pathways [48]. Prostaglandin E2 acts synergistically with bradykinin in the induction of pain. These substances are among the most important mediators of the inflammatory hyperalgesia [49-51]. Our results demonstrated that ouabain produced a significant reduction in the mouse paw edema induced by prostaglandin E2 and bradykinin. These data prompted us to evaluate the role of Ouabain in the nociception.

The acetic acid-induced abdominal writhing is a sensitive method to evaluate peripherally acting analgesics. In this model, released arachidonic acid via cyclooxygenase and prostaglandin biosynthesis plays a role in the nociceptive mechanism [52-54]. In the present work, it was demonstrated that ouabain and morphine, caused a significant inhibition, 45% and 78% respectively, on the writhing responses induced by acetic acid when compared to the control group (Fig.4). This peripheral analgesic potential might be related to the inhibition of PGE2 and bradykinin.

To better evaluate the role of ouabain in pain, we used the thermal model for nociception, the hot plate test, which is a specific central antinociceptive test [55-57]. Ouabain was found to have antinociceptive activity in the hot plate test, increasing the latency time (74%) when tested 30 minutes, but not 60 nor 120 min after the last injection of ouabain. These results demonstrates an antinociceptive effect of ouabain, but further studies are necessary to elucidate the mechanism behind the observed effects.

Conclusion

For the first time, the present work demonstrated, *in vivo*, the anti-inflammatory and analgesic potential of Ouabain, which might be related to the inhibition of prostaglandin E2 and bradykinin.

5- ACKNOWLEDGMENTS

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

6-REFERENCES

- [1] G. Scheiner-Bobis and W. Schoner, "A fresh facet for ouabain action", *Nature Medicine*, vol.7, pp. 1288-1289, 2001.
- [2] J.M. Hamlyn, M.B. Blaustein, S. Bova, *et al.*, "Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, pp. 6259- 6263,1991.
- [3] M. Ferrandi, P. Manunta, S. Balzan, *et al.*, "Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays", *Hypertension*, vol. 30, pp. 886-896, 1997.
- [4] J. Laredo, B.P. Hamilton, and J.M. Hamlyn, "Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells", *Endocrinology*, vol.135, pp. 794-797, 1994.
- [5] W. Schoner, "Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus", *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, vol. 108, pp. 449-454, 2000.
- [6] A. Goto, K. Yamada, H. Nagoshi, *et al.*, "Stress-induced elevation of ouabain like compound in rat plasma and adrenal", *Hypertension*, vol. 26, pp.1173-1176,1995.
- [7] N. Bauer, J. Müller-Ehmsen, U. Krämer, *et al.*, "Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs - Effects of β -Blockade and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition", *Hypertension*, vol. 45, pp. 1024-1028, 2005.
- [8] M.P. Blaustein, J. Zhang, L. Chen, *et al.* "The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension", *Hypertension*, vol. 53, pp. 291-298, 2009
- [9] S. Rodrigues-Mascarenhas, A. S. de Oliveira, N. Amoedo, *et al.*, "Modulation of the immune system by ouabain", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1153, pp. 153-163, 2009.
- [10] M. Szamel, S. Schneider and K. Resch, "Functional interrelationship between (Na⁺ K⁺)-ATPase and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogenstimulated rabbit thymocytes", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 256, pp.9198-9204, 1981.

- [11] V. Pires, R. C. Harab, B. Olej, *et al.*, "Ouabain effects on activated lymphocytes: augmentation of CD25 expression on TPA-stimulated cells and of CD69 on PHA-and TPA-stimulated cells", *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 19, pp.143-148, 1997.
- [12] V.L. de Moraes, B. Olej, L. de la Rocque, *et al.*, "Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity". *The FASEB Journal*, vol.3, pp. 2425-2429, 1989.
- [13] J. Echevarria-Lima, E. G. de Araújo, L. de Meis, *et al.*, "Ca²⁺ mobilization induced by ouabain in thymocytes involves intracellular and extracellular Ca²⁺ pools". *Hypertension*, vol. 41, pp.1386-1392, 2003.
- [14] S. Rodrigues Mascarenhas, J. Echevarria-Lima, N. F. dos Santos, *et al.*, "CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry", *Life Sciences*, vol. 73, pp.1037-1051, 2003.
- [15] C. L. Mann, C. D. Bortner, C. M. Jewel, *et al.*, "Glucocorticoid induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na (+)/K (+)-adenosine triphosphatase", *Endocrinology*, vol. 142, pp. 5059-5068, 2001.
- [16] S. Rodrigues-Mascarenhas, N.F. dos Santos and V.M. Rumjanek, "Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy", *Bioscience_Reports*, vol. 26, pp.159-169, 2006.
- [17] R.C. Valente, C.R. Nascimento, E.G. Araújo, *et al.*, "mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of epithelial growth factor receptor and activation of p38 mitogen-activated protein kinase", *Neuroimmunomodulation*, vol.16, pp.228-236, 2009.
- [18] A. D. Foey, A. Crawford and N. D. Hall, "Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na, K-ATPase activity", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1355, pp. 43-49, 1997.
- [19] P. Kometiani, J. Li, L. Gnudi, *et al.*, "Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes – The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, pp. 15249-15256, 1998.
- [20] M. Haas, A. Askari, and Z. Xie, "Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 27832- 27837, 2000.
- [21] K. Mohammadi, P. Kometiani, Z. Xie, *et al.*, "Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp.42050-42056, 2001.

- [22] Z. Xie, "Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer", *Cellular and Molecular Biology*, vol. 47, pp. 383-390, 2001.
- [23] S. Harwood and M.M. Yaqoob, "Ouabain-induced cell signaling: Review.", *Frontiers in Bioscience*, vol.10, pp. 2011-2017, 2005.
- [24] S. Rodrigues-Mascarenhas, F. F. Bloise, J. Moscat, *et al.*, "Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes", *Cell Biology International*, vol.32, pp.1323-1328, 2008.
- [25] E. R. Sherwood and T. Toliver-Kinsky, "Mechanisms of the inflammatory response". *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, vol.18, pp. 385-405, 2004.
- [26] A. Matsumori, K. Ono, R. Nishio *et al.* "Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain". *Circulation*, vol.96, pp.1501-1506, 1997.
- [27] Q. Yang, W. Huang, C. Jozwikz, *et al.*, "Cardiac glycosides inhibit TNF- α /NF κ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 9631-9636, 2005.
- [28] C.R. Correa and J.B. Calixto, "Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse", *British Journal of Pharmacology*, vol.110, pp.193-198, 1993.
- [29] R. Koster, M. Anderson, and E.J. Debber, "Acetic acid for analgesic screening", *Federation Proceedings*, vol. 18, pp. 412-414, 1959.
- [30] G. Woolfe and A.D. MacDonald, "The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol)", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 80, pp. 300-307, 1944.
- [31] S. Cuzzocrea, B. Zingarelli, G. Calapai, *et al.*, "Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production", *Life Sciences*, vol.60, pp. 215–220,1997.
- [32] R.Vinegar, J.F. Truax, J.L. Selph, *et al.*, "Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat", *Federation Proceedings*, vol.46, pp. 118-126, 1987.
- [33] F. Datti, M. Datti, E. Antunes, *et al.*, "Influence of chronic unpredictable stress on the allergic responses in rats", *Physiology & Behavior*, vol. 77, pp. 79–83, 2002.
- [34] L.M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer", *Nature*, vol. 420, pp. 860-867, 2002.

- [35] J. Rankin. "Biological mediators of acute inflammation." *AACN Clin Issues*, vol. 15, pp.03-17, 2004.
- [36] Y. Takada , K. Matsuo , H. Ogura , *et al.*, "Odoroside A and ouabain inhibit Na⁺/K⁺-ATPase and prevent NF-kappaB-inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport", *Biochemical Pharmacology*, vol.78, pp.157-1166, 2009.
- [37] A. Matsumori, K. Ono, R. Nishio, *et al.*, "Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain", *Cytokine*, vol. 12, pp. 294-297, 2000.
- [38] G. Sowa and R. Przewłocki, "Ouabain enhances the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by rat peritoneal macrophages", *Immunopharmacology*, vol. 36, pp.95-100, 1997.
- [39] R.L. Handy and P.K. Moore, "A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity", *British Journal of Pharmacology*, vol. 123, pp. 1119-1126, 1998.
- [40] M.G.M.O. Henriques, P.M.R. Silva, M.A. Martins, *et al.*, "Mouse paw oedema. A new model for inflammation", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 20, pp. 243-249, 1987.
- [41] A. Ianaro, C.A. O'Donnell, M. Di Rosa, *et al.*, " A nitric oxide inhibitor reduces inflammation, down regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice", *Immunology*, vol. 82, pp. 370-375, 1994.
- [42] A.R.M.S. Brito and M.A. Antonio, "Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae)", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 61, pp. 215-228, 1998.
- [43] L. Pillemer, L. Blum, I.H. Lepow, *et al.*, "The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena", *Science*, vol.120, pp. 279-285, 1954.
- [44] J. Lago, A. Alfonso, M.R. Vieytes. L.M. Botana. "Ouabain-induced enhancement of rat mast cells response. Modulation by proteinphosphorylation and intracellular pH". *Cellular Signalling*, vol.7, pp. 515-524, 2001.
- [45] T. Okazaki, V.S. Ilea, A. Okazaki, *et al.* "Inhibition of antigen induced histamine release by ouabain". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 5, pp. 454-462, 1976.
- [46] M. Senol, I.H. Ozerol, A.V. Patel, *et al.* "The effect of Na⁺-K⁺ ATPase inhibition by ouabain on histamine release from human cutaneous mast cells". *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 294, pp. 25-29, 2007.

- [47] J. G. Cripps, F. A. Crespo, P. Romanovskis, *et al.* "Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan–cytokine interactions". *International Immunopharmacology*, vol.5, pp. 1622-1632, 2005.
- [48] M. Burian and G. Geisslinger, "COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites", *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 107, pp.139-154, 2005.
- [49] A. Dray "Inflammatory mediators of pain", *British Journal of Anaesthesia*, vol. 75, pp. 125-131, 1995.
- [50] J.D. Richardson and M.R. Vasko, "Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 302, pp. 839-845, 2002.
- [51] H.Vanegas and H. Schaible, "Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord", *Progress in Neurobiology*, vol. 64, pp. 327-363, 2001.
- [52] E. M. Franzotti, C.V. Santos, H.M. Rodrigues HM, *et al.*, "Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca)", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 72, pp. 273-277, 2000.
- [53] R. Deraedt, S. Joughney, F. Delevakee, *et al.*, "Release of prostaglandin E and F in an algogenic reaction and its inhibition", *European Journal of Pharmacology*, vol.61, 17-24, 1980.
- [54] H.O.J. Collier, J.C. Dinneen, C.A. Johnson, *et al.*, "The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse", *British Journal of Pharmacology Chemotherapy*, vol.3, pp. 295–310, 1968.
- [55] R.C. Silveira e Sá, L. E. G. de Oliveira, F.F.F. Nóbrega, *et al.*, "Antinociceptive and Toxicological Effects of *Dioclea grandiflora* Seed Pod in Mice", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, pp.1-6, 2010.
- [56] D. S. França, A. L. S. Souza, R.K. Almeida , *et al.*, "B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice", *European Journal of Pharmacology*, vol. 421, pp.157-164, 2001.
- [57] A. R. Campos, F. A. A. Albuquerque, V. S. N. Rao *et al.*, "Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice", *Fitoterapia*, vol. 73, pp.116-120, 2002.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Effect of the pre-treatment with Ouabain (OUA; 0.56mg/Kg) administered intraperitoneally on paw edema triggered by carrageenan (CAR), zymosan (ZYM) and 48/80 in mice. Mice received intraplantar injections of carrageenan (2.5%, A), zymosan (1%, B) or compound 48/80 (2µg/paw, C) in 20µl phosphate buffered saline (PBS) in the right hindpaw and 20µl of PBS in the left hindpaw. Each point represents the mean of eight animals. Indomethacin (IND, 10mg/Kg), dexametasone (DEXA, 0.5mg/Kg) and salbutamol (SALB, 10mg/kg) were used as anti-inflammatory controls and injected i.p. one hour before intraplantar challenge. Asterisks denote the significance levels compared with CAR, ZYM or 48/80 group. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by Unpaired test or ANOVA followed *Dunnett's test*. **P < 0.01 and ***P<0.001.

FIGURE 2: Effect of the pre-treatment with Ouabain (OUA, 0.56mg/Kg) administered intraperitoneally on paw edema triggered by histamine (HIS), prostaglandin E2 (PGE2) and bradykinin (BRAD). Mice received intraplantar injections of histamine (100µg/paw, A), prostaglandin E2 (5 µg/paw, A) or bradykinin (6 nmol/paw, C) in 20µl of phosphate buffered saline (PBS) in the right hindpaw and 20µl of PBS in the left hindpaw. Each point represents the mean of eight animals. Dexametasone (0.5mg/Kg) was used as anti-inflammatory control and injected i.p. one hour before intraplantar challenge. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by Unpaired test or ANOVA followed *Dunnett's test*. **P < 0.01 and ***P<0.001.

FIGURE 3: Effect of the pre-treatment with Ouabain (OUA, 0.56mg/Kg) administered intraperitoneally on peritoneal inflammation triggered by Concanavalin A (ConA, 60µg/300 µL) on total (A) and differential cell counts (B). Each bar represents the mean of nine animals. Asterisks denote the significance levels compared with ConA values. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by Unpaired test or ANOVA followed *Dunnett's test*. **P < 0.01 and ***P<0.001.

FIGURE 4: Effect of the pre-treatment with Ouabain (OUA, 0.56mg/Kg) administered intraperitoneally on acetic acid-induced writhing response in mice. Each bar represents the mean of nine or ten animals. Morphine (MOR, 6mg/Kg) administered intraperitoneally was used for analgesy . Asterisks denote the significance level compared with control values. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by Unpaired test or ANOVA followed *Dunnett's test*. **P < 0.01 and ***P<0.001.

FIGURE 5: Effect of pre-treatment with Ouabain (OUA, 0.56mg/Kg) administered intraperitoneally (30, 60 or 120min before evaluation) on hot plate test in mice. Each point represents the mean of fourteen animals. Morphine (10mg/Kg) administered intraperitoneally at the same times was used for analgesy. Asterisks denote the significance level compared with saline (SAL) values. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by software Graphpad Prism using Student's *t*-test followed by Unpaired test or ANOVA followed *Dunnett's test*. **P < 0.01 and ***P<0.001.

FIG.1

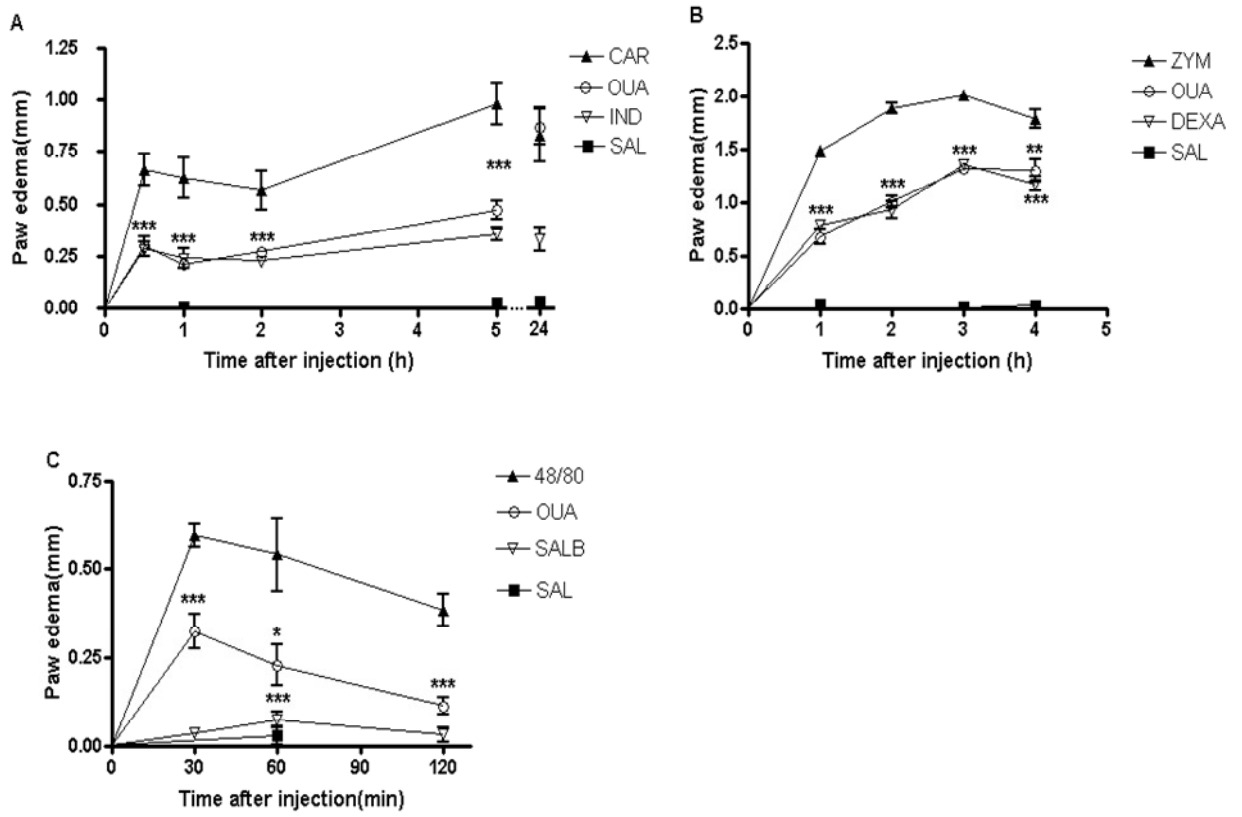


FIG.2

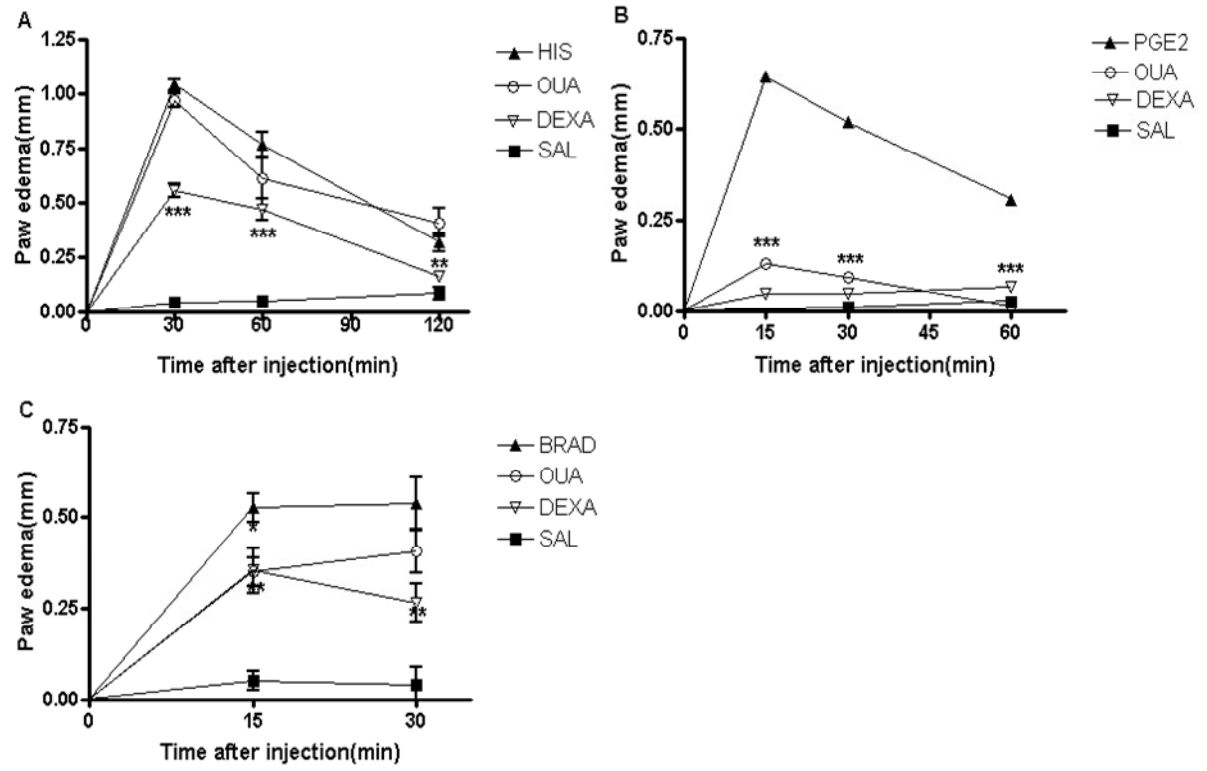


FIG.3

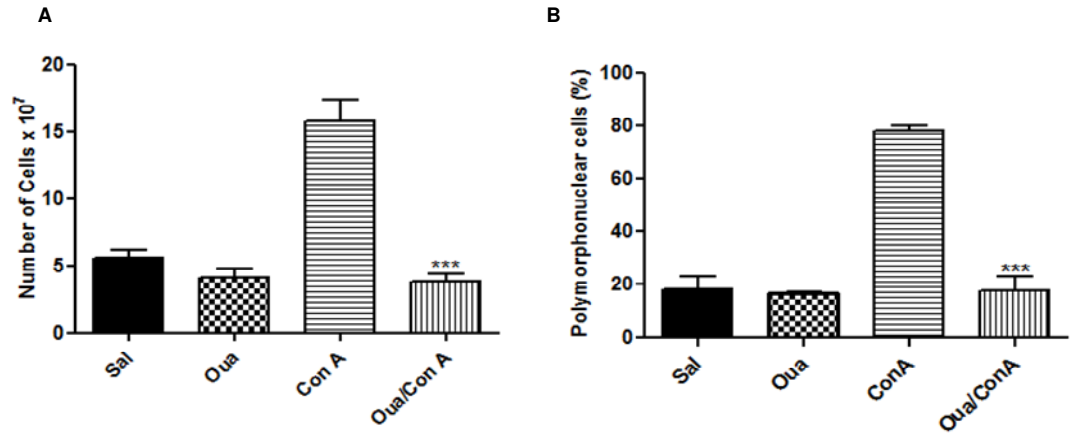


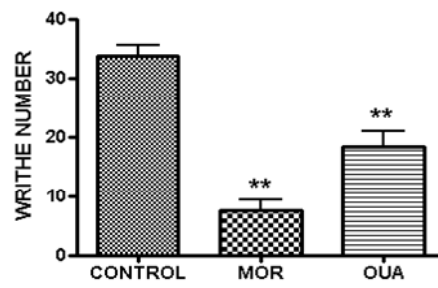
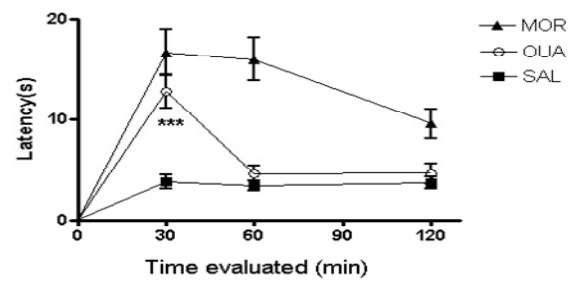
FIG.4

FIG.5

ANEXO B - Certidão do Conselho de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) nº 0407/08



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**CERTIDÃO**

João Pessoa, 06 de agosto de 2008

CEPA Nº. 0407/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadora: Profa. Dra. Sandra R. Mascarenhas

Departamento/Setor: LTF/UFPB

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

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

Atenciosamente,

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

ANEXO C - Resumos publicados nos Anais do XXXV Congresso of the Brazilian Society of Immunology



IR012

07 Immunoregulation (IR)

OUABAIN IS CAPABLE OF MODIFYING THE EXPRESSION PROFILE OF LYMPHOCYTES

CARNEIRO, LUCIANA TELES (1), LEITE, JACQUELINE ALVES (1), ALVES, ANNE KALIERY DE ABREU (1), RUMJANEK, VIVIAN M. (2), RODRIGUES-MASCARENHAS, SANDRA (1)

Introduction: ouabain, initially known as a cardiotonic steroid capable of inhibiting the Na⁺/K⁺ ATPase, was identified as an endogenous substance of human plasma, being produced by the adrenal, pituitary and hypothalamus. Despite the studies of our group portraying the ability of ouabain to modulate various aspects of the immune response, including its anti-inflammatory potential and immunosuppressive effects, little is known about the physiologic effect of this substance in the immune system. **Objective:** the aim of this work was to evaluate, in vivo, the immunomodulatory action of ouabain in primary and secondary lymphoid organs. **Methods:** for this, mice were pre-treated for three consecutive days with ouabain (0,56 mg/kg) through intraperitoneal injection. The possible modulatory action of ouabain was evaluated by flow cytometry. The cellularity and weight of thymus and mesenteric lymph node were also measured. **Results:** in the mesenteric lymph node, ouabain pretreatment was capable of decreasing the number of CD3⁺ cells (30%) concomitant with an increase in the percentage of the B220⁺ cell population (20%), but did not interfere in the number of Treg cells (CD4⁺CD25⁺), nor in the cellularity of the evaluated organs. Furthermore, in the thymus, ouabain did not affect the proportion of the various lymphocyte subpopulations. **Conclusion:** based on the above results, ouabain may play a physiological role by modifying the expression profile of lymphocytes in peripheral organs such as the mesenteric lymph node. This effect could be involved in the mechanisms whereby ouabain exerts its immunosuppressive effects described previously. **Financial Support:** Capes, FAPERJ e Fapesq/CNPq



IR026

07 Immunoregulation (IR)

OUABAIN MODULATES THE ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE IN THE PERITONEUM

LEITE, JACQUELINE ALVES(1); CARNEIRO, LUCIANA TELES(1); BRANDI, JULIANA DA SILVA(1); RODRIGUES-MASCARENHAS, SANDRA(1).

Introduction: Ouabain, a potent inhibitor of the Na⁺,K⁺-ATPase pump, was identified as an endogenous substance of human plasma. In recent years, ouabain has been widely studied for its ability to interfere with various regulatory mechanisms and maintain homeostasis. Our group have demonstrated the ability of ouabain to modulate inflammatory processes and other aspects of the immune response, but little is known about the mechanisms involved. **Aim:** This study aimed to investigate, in vivo, the modulating effect of ouabain in the peritoneal inflammation model. **Methods:** Mice were pre-treated intraperitoneally (i.p.) for three consecutive days with Ouabain (0,56 mg/kg) and stimulated with Con-A (60µg/300 µL, i.p.). After 24h, animals were sacrificed and peritoneal lavage was performed. The fluid was removed for total and differential cell counts. The concentrations of the pro-inflammatory cytokine TNF-α in peritoneal lavage fluids were assayed using ELISA kit (Bio Science). **Results:** Ouabain alone had no effect on the number of resident peritoneal cells in unchallenged mice. However, after induction of inflammation, treatment with ouabain led to a 76% reduction in the total cell numbers in the peritoneal cavity, as a reflex of the inhibition of polymorphonuclear leukocytes (80%). Furthermore, the treatment with ouabain reduced the levels of TNF-α in the peritoneal lavage. **Conclusion:** Ouabain modulated the acute inflammatory response induced by ConA, by reducing cell migration and the levels of TNF-α. However, further studies are necessary to elucidate the mechanisms involved. **Support:** FAPESQ-PB / MCT-CNPq and CAPES

ANEXO D - Resumo publicado nos Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC

<http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/3688.htm>

62ª Reunião Anual da SBPC

C. Ciências Biológicas - 9. Imunologia - 2. Imunologia Celular

EFEITO IMUNOMODULADOR DA OUABAÍNA NA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA E NA MIGRAÇÃO CELULAR

Luciana Teles Carneiro ¹
 Jacqueline Alves Leite ¹
 Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos ¹
 Jessica de Sá Barreto Callou Peixoto ¹
 Juliana Silva Brandi Oliveira ¹
 Sandra Rodrigues Mascarenhas ¹

1. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba-UFPB

INTRODUÇÃO:

A ouabaína, inicialmente conhecida como um composto de origem vegetal extraída das cascas e raízes da árvore Ouabaio (*Acocanthera ouabaio*), foi identificada como uma substância endógena, circulante no plasma de mamíferos superiores, sendo produzida pela adrenal, hipófise e hipotálamo. Nos últimos anos, a ouabaína tem sido amplamente estudada, por sua capacidade em interferir em vários mecanismos reguladores e mantenedores da homeostase. Apesar dos estudos do nosso grupo que tratam a capacidade da ouabaína de modular diversos aspectos da resposta imunológica, pouco se sabe sobre o seu papel em processos inflamatórios. A inflamação pode ser definida como um processo fisiológico, que envolve complexas interações entre todas as células envolvidas. Caracteriza-se pela liberação de mediadores, como a prostaglandina E2 (PGE2), a partir dos tecidos injuriados, que funcionam como mensageiros, provocando efeitos como aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma no sítio atingido, com posterior migração celular para a área afetada. Este trabalho teve como intuito investigar o efeito modulador da ouabaína na inflamação induzida por PGE2, bem como avaliar a migração celular no peritônio induzida pelo mitógeno Concanavalina A (ConA).

METODOLOGIA:

Na execução dos modelos experimentais foram utilizados camundongos fêmeas da espécie *Swiss albinus*, com idade entre 6 e 8 semanas. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB sob o número 0408/09. A ação moduladora da ouabaína no ensaio com a PGE2 foi avaliada por meio do modelo de edema cutâneo, onde foi injetado 5µg/pata, enquanto que no modelo de peritonite aguda, utilizou-se o mitógeno ConA (60µg/animal), onde se realizou o lavado peritoneal e posterior contagem total e diferencial dos leucócitos, pela técnica de citospin. A análise estatística foi realizada no Graph Pad Prism, utilizando o One-way ANOVA e aplicando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS:

A ouabaína inibiu significativamente o edema induzido pela PGE2 em todos os tempos avaliados (15, 30 e 60 minutos), assim como reduziu a migração celular induzida pela ConA no peritônio, em um percentual de 76%. Na contagem diferencial entre as células mono e polimorfonucleares, observou-se uma ação inibitória da ouabaína, de aproximadamente 80% nos leucócitos polimorfonucleares.

CONCLUSÃO:

Com base nos resultados expostos, pode-se sugerir que a ouabaína apresenta atividade antiinflamatória, modulando a formação do edema inflamatório e a migração celular.

Instituição de Fomento: Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba - FAPESQ/PB e Minist. da Ciência e Tecnol/ Conselho Nacional de Desenv. Cient. e Tecnol. - MCT/CNPq

Palavras-chave: ouabaína, inflamação, migração celular.

ANEXO E - Resumo publicado nos Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil

Código: **FAR45**

Área do Conhecimento: **6. Farmacologia / Toxicologia (estudos préclínicos e pesquisa clínica)**

Título: **ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DA ALGA MARINHA *GRACILARIA FEROX***

Danielle Ingrid Bezerra de Vasconcelos

Luciana Teles Carneiro, Jacqueline Alves Leite, Maria de Fátima Vanderlei de Souza, Sandra Rodrigues Mascarenhas

Alga, Extrato, Imunomoduladora, Antiinflamatória

6. Farmacologia / Toxicologia (estudos préclínicos e pesquisa clínica)

Poster

DANIELLE INGRID BEZERRA DE VASCONCELOS

Universidade Federal da Paraíba

Introdução: pesquisas recentes revelam o potencial das algas como fonte de produtos químico-farmacológicos, a exemplo: atividade antioxidante (Rocha F.D., Rev. bras. Farmacogn., v.17, p.631, 2007); antibacteriana (Ali M.S., Nat. Prod. Lett., v.16, p.407, 2002); antiangiogênicas; antitumorais (Dias P.F., Cancer Chemother. Pharmacol., v.56, p.436, 2005) e contra o vírus linfotrópico de célula T humana do tipo 1 (Romanos M.T.V., Cancer Invest., v.20, p.1, 2002). Entre estas algas, o gênero *Gracilaria* destaca-se por possuir atividade antiinflamatória in vitro (Lee H.J., Arch Pharm Res., v.32, p.45, 2009). Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar, in vivo, a atividade imunomoduladora do extrato hidroalcólico (EtOH) da *Gracilaria ferox*, na inflamação induzida por diferentes agentes flogísticos. **Métodos:** o edema de pata foi induzido, em camundongos (n=6), por meio da injeção no coxim plantar de 20 µl de Carragenina (2,5%), Histamina (100µg/pata) ou PGE2 (5µg/pata), 1 hora após o tratamento com dexametasona 0,5mg/Kg (i.p.) ou com o EtOH de *G. ferox* (via oral) nas doses 62,5, 125, 250 e 500 mg/Kg. **Resultados:** o EtOH da *G. ferox* apresentou atividade antiflogística (em torno de 59%) frente à carragenina em todos os tempos estudados: 30, 60, 120 minutos, 5 e 24 h, à exceção das doses 125 e 250 mg/Kg, no último tempo. Entretanto, não houve resposta antiinflamatória quando se utilizou a Histamina e a PGE2. **Discussão/ Conclusão:** o edema de pata induzido por Carragenina é bifásico: nas primeiras horas os principais mediadores são histamina e serotonina. Tardamente há migração celular, aumento da liberação de óxido nítrico e PGE2, sendo este um dos importantes fatores de manutenção do edema. Pode-se concluir que o EtOH de *G. ferox* apresenta potencial atividade antiinflamatória, por inibir o edema ocasionado por Carragenina. No entanto, esta resposta independe da ação da Histamina e PGE2. **Suporte financeiro:** CNPq

ANEXO F - Resumo publicado nos Anais do XXXIV Congresso of the Brazilian
Society of Immunology



IR024

INSTITUTION: Universidade Federal da Paraíba

**THE ANTI-INFLAMMATORY ACTION OF OUABAIN IS
INDEPENDENT TO HISTAMINE RELEASE**

AUTHORS: VASCONCELOS DIB; LEITE JA; DUTRA MMG; CARNEIRO LT; LIMA JF; PIUVEZAM MR; RUMJANEK VMBD; MASCARENHAS SR.

Introduction: Previously known as a steroid capable of inhibiting the Na⁺/K⁺ATPase, ouabain has been identified as an endogenous compound of human plasma, capable of interfering in many aspects of the immune system. Ouabain synergizes with hydrocortisone in vivo in the induction of thymic atrophy. However it is still unknown the effects of ouabain in inflammatory processes.

Aim: The aim of this work is to study, in vivo, the effects triggered by ouabain on acute inflammation models.

Methods: The possible anti-inflammatory activity of ouabain was accessed in the allergic paw edema (Ovalbumin 400µg/paw) and in the compound 48/80 (2µg/paw), histamine (100µg/paw) and carrageenan (500µg/paw)- induced mouse paw inflammation.

Results: We observed that ouabain significantly inhibited the allergic paw edema (around 50%) 30 minutes after ovalbumin challenge, but not in the later periods studied. Similarly, ouabain exhibited a biphasic response in the edema induced by carrageenan, inhibiting the inflammation after 30min, 1, 2 and 6h (approximately 56%) but not after 24h. In the edema induced by compound 48/80, ouabain exerted 62% inhibition but did not interfere in the inflammation induced by histamine.

Conclusion: In conclusion, this novel in vivo anti-inflammatory action of ouabain in different inflammation models appears to be unrelated to histamine release.