



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

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE OUABAÍNA EM MODELO
MURINO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

**JOÃO PESSOA - PB
2016**

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

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE OUABAÍNA EM MODELO MURINO DE
LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

**JOÃO PESSOA – PB
2016**

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE OUABAÍNA EM MODELO MURINO DE
LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

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 requisito parcial 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

2016

S586e Silva, Juliane Santos de França da.
Efeito anti-inflamatório de ouabaína em modelo murino de
lesão pulmonar aguda induzida por LPS / Juliane Santos de
França da Silva.- João Pessoa, 2016.
102f. : il.
Orientadora: Sandra Rodrigues Mascarenhas
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Ouabaína. 3. Lesão pulmonar
aguda. 4. LPA. 5. SDRA. 6. LPS.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

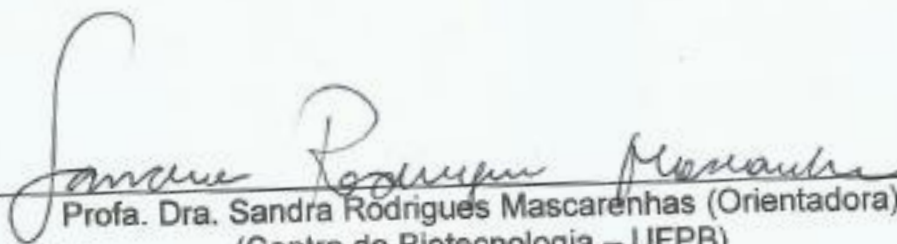
JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE OUABAÍNA EM MODELO MURINO DE
LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

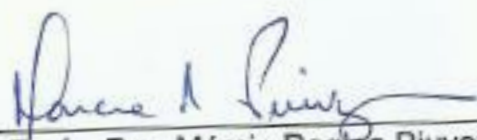
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais E Sintéticos Bioativos**, área de concentração – Farmacologia.

Dissertação de Mestrado aprovada em 17/10/2017

BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
(Centro de Ciências da Saúde – UFPB. Avaliadora Interna)

Profa. Dra.). Márcia Rosa de Oliveira
(Centro de Ciências Exatas e Naturais – UFPB. Avaliadora Externa)

Dedico este trabalho a meus pais e meus irmãos pelo amor incondicional e por serem minha fonte de alegria e inspiração. Dedico também a Daniel Ferreira (in memoriam) que foi em vida, o melhor amigo que eu pude ter!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela sua infinita bondade e misericórdia. Por me permitir realizar mais um sonho e por guiar meus passos até aqui, suas bênçãos em minha vida são incontáveis.

A minha querida orientadora, **Sandra Rodrigues Mascarenhas** por ter confiado em mim e ter aceitado me incluir em seu grupo de pesquisa. Nem no meu sonho científico mais perfeito eu conseguiria ter uma orientadora melhor. Obrigada pelos ensinamentos, companheirismo, compreensão e por ser uma pessoa incrível, não só no lattes! A Senhora além de orientadora é uma incentivadora e eu tenho muita sorte em ser sua filha científica.

Aos meus maravilhosos pais, **Janeide** e **Francinaldo** por me apoiarem em todas as minhas decisões, por me incentivarem e por me ajudarem a realizar meu sonho de ser farmacêutica, e agora Mestre! Obrigada por terem me dado tudo que sempre puderam e por terem me ensinado seus valores, os quais eu levo comigo com orgulho. Sem vocês nenhuma das conquistas na minha vida teriam sido possíveis e nem teriam sentido!

Ao meu irmão mais velho **Pierre**, por sempre me ajudar e me defender. É com alegria que lembro de quando éramos crianças e fazíamos tudo juntos, esse amor fraternal só cresce! As minhas irmãs **Ivânia** e **Sarah** por serem amigas e companheiras de todas as horas, por dividirem tudo comigo e por me ajudarem quando preciso. Aos meus irmãozinhos mais novos **Hugo**, **Edu**, **João Pedro** e **João Miguel** por serem minha fonte de alegria e inspiração, vocês são incríveis e estar com vocês é a melhor coisa desse mundo!

As minhas avós: **Nevinha**, por ser incrivelmente maravilhosa e por ser a melhor pessoa que eu conheço no mundo! Obrigada por sempre cuidar de mim, me mimar e não esconder de ninguém que eu sou a neta preferida (kkk)! E **Iraci**, por sempre me incentivar e torcer pelo meu sucesso. Obrigada por sempre me aconselhar, me estimular e por me colocar sempre em suas orações.

Ao meu namorado **Guilherme Urquiza**, por estar sempre disposto a enfrentar qualquer empreitada comigo, por sempre me ajudar em todos os aspectos, ser meu companheiro e me dar amor incondicional. Essa conquista é nossa! Sem você essa trajetória teria sido mais árdua.

A minha querida sogra, **Mércia Urquisa** por me acolher em sua casa e estar sempre disposta a me apoiar em tudo. A Senhora é uma das pessoas mais maravilhosas que eu já conheci! Sua ajuda e incentivo foram essenciais para a construção e finalização desse trabalho.

Ao meu cunhado **Henrique Urquisa** por sempre me dar caronas e principalmente por dividir comigo o trabalho de cuidar da minha irmã (kkk)!

A todos os membros do laboratório de Imunofarmacologia em especial a **Luiz Henrique** pelos ensinamentos, colaboração e paciência de sempre (ou quase sempre kkk), a **Laércia** pelo apoio emocional, moral e técnico-científico, a **Fernanda** por ser a aluna de iniciação científica mais aplicada e competente do mundo a **Larissa** por sempre está disposta a ajudar e dar sua contribuição e a **Alysson** pela colaboração na histologia. Esse trabalho é tão meu quanto de vocês! Agradeço também as professoras **Márcia** e **Giciane** pela colaboração e ajuda na concretização desse trabalho e ao professor **Cláudio**.

As professoras **Márcia Regina Piuvezan**, **Márcia Rosa de Oliveira** e **Patrícia Mirella da Silva Scardua** que aceitaram compor a banca examinadora e contribuir na melhora deste trabalho.

Agradeço aos professores **Fábio Souza**, **Luiz Fernando Marques**, **Mário Vasconcelos**, **Adalberto Costa**, **Alba Caiffo** e **Eduardo Oliveira** por durante a graduação, terem me inspirado e por terem despertado em mim o desejo de seguir carreira acadêmica a fim de um dia poder lecionar tão bem quanto vocês!

A todos os amigos que conquistei durante a graduação em farmácia, em especial a **Laércia Karla**, por estar comigo desde o primeiro período e dividir não só a vida pessoal como também a bancada de laboratório. Sua amizade é um dos maiores presentes de Deus na minha vida. Agradeço também a sua família incluindo sua mãe **Dona Clélia**, seu pai **Lula**, e suas Irmãs **Larissa** e **Dafne** por sempre me acolherem na sua casa.

Agradeço a minha turma de mestrado e aos amigos que o “LTF” me deu, em especial a **Andressa Lira** que desde que a conheci tem se mostrado uma amiga fiel, verdadeira e para todas as horas! Além do diploma de mestre, sua amizade é uma das coisas mais maravilhosas que esses dois anos de mestrado me proporcionaram.

A minha amiga de infância **Kalina Lima** que me conhece melhor que ninguém e desde a quarta série (a 17 anos) divide comigo os melhores e piores

momentos da minha vida. Esse título de mestre é mais um dos sonhos que sonhamos juntas e que vira realidade. Daqui a uns meses é o seu! Eu te agradeço por tudo, por estar sempre presente na minha vida não importando as circunstâncias, por ser a melhor psicóloga e amiga desse mundo.

Ao meu amigo **Danilo Ferreira**, por sempre estar disposto a me ajudar e me estender a mão sem esperar nada em troca. Sua amizade é um bem muito preciso na minha vida e é essencial para superar a falta que seu irmão me faz!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Tenho orgulho de fazer parte desse programa e não há outro lugar no mundo que eu queira estar fazendo ciência além daqui!

A todos os funcionários que compõem o Programa, em especial a **Mônica** pela alegria contagiante e a **Carol** pela excelência e simpatia.

A Universidade Federal da Paraíba pela infraestrutura e a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“O farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra”.

Eclesiástico, 38:7

RESUMO

A Ouabaína é um esteroide cardiotônico inicialmente descrito como uma substância de origem vegetal. Em 1991, a sua produção endógena por mamíferos superiores foi identificada e desde então suas ações fisiológicas vêm sendo estudadas. Trabalhos do nosso grupo demonstraram que a ouabaína modula a resposta inflamatória aguda induzida por diferentes agentes flogísticos, sendo também capaz de interferir negativamente no perfil inflamatório desencadeado pela *Leishmania (L.) amazonensis*. A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma doença inflamatória caracterizada por inflamação aguda e extenso acúmulo de polimorfonucleares e de mediadores pró-inflamatórios, que culmina com dano alveolar difuso podendo levar o paciente a óbito por hipoxemia severa. Não há dados na literatura sobre os efeitos da ouabaína na LPA. **Objetivos:** Avaliar o efeito imunomodulador de ouabaína em modelo murino de LPA induzida por LPS. **Métodos:** Camundongos BALB/c machos foram tratados via intraperitoneal com ouabaína na dose de 0,56 mg/Kg por um período de três dias consecutivos, 1h após o último tratamento os animais foram desafiados via intranasal com LPS (2,5 mg/Kg); 24h após o desafio, os animais foram eutanasiados, as amostras biológicas coletadas e os parâmetros inflamatórios, incluindo migração celular, exsudato proteico, produção de citocinas, expressão de TLR4 e alterações histopatológicas foram então avaliados. Os dados foram analisados pelo software PRISMA. **Resultados:** O tratamento com a ouabaína diminuiu a migração de leucócitos totais para o sítio inflamado (48,84%), evento este, associado a diminuição da migração de neutrófilos (70,7%) e independente da migração de macrófagos. Ouabaína também diminuiu o exsudato proteico na região bronco-alveolar (26,32%) e a produção das citocinas TNF- α (14,80%), IL-6 (47,07%) e IL1- β (33,59%), entretanto essa redução na produção desses mediadores não mostrou relação com a expressão do TLR4. Adicionalmente, as alterações histopatológicas características da LPA também foram reduzidas pelo tratamento com ouabaína. **Conclusões:** Os resultados obtidos demonstram que ouabaína possui ação anti-inflamatória na LPA induzida por LPS.

Palavras-chave: ouabaína; lesão pulmonar aguda; LPA; SDRA; LPS

ABSTRACT

Ouabain is a cardiotonic steroid initially described as a substance of plant origin. In 1991, the endogenous production of higher mammals was identified and since then their physiological actions have been studied. Work of our group have demonstrated that ouabain modulates the acute inflammatory response induced by different phlogistic agents, also being able to interfere negatively in inflammatory profile triggered by *Leishmania (L.) amazonensis*. Acute lung injury (ALI) is a serious inflammatory disease characterized by acute inflammation, extensive accumulation of polymorphonuclear leukocytes and accumulation of proinflammatory mediators, which culminates with diffuse alveolar damage and which may cause the patient died due to severe hypoxemia. There is no data in the literature on the effects of ouabain in ALI. **Objectives:** Evaluate the immunomodulatory effect of ouabain in a murine model of ALI induced by LPS. **Methods:** BALB / c mice were treated intraperitoneally with ouabain at a dose of 0.56 mg / kg for a period of three consecutive days, 1 hour after the last treatment the animals were challenged intranasally with 40µl of an LPS solution (2 5 mg / kg); 24 hours after challenge, the animals were euthanized, the collected biological sample and inflammatory parameters, including cell migration, protein exudates, cytokine production, TLR4 expression and histopathological changes were then evaluated. Data were analyzed by PRISMA software. **Results:** The treatment with ouabain decreased total leukocytes migration to the inflamed site (48,84%), this event associated with decreased neutrophil migration (70,71%) and independent of macrophage migration. The ouabain also decreased the exudate protein in the broncho-alveolar region (26,32%) and production of the cytokines TNF- α (14,80%), IL-6 (47,07%) and IL1- β (33,59%), however this reduction in the production of these mediators was not related to the expression of TLR4. Additionally, the ALI histopathology changes were also reduced by treatment with ouabain. **Conclusions:** The results show that ouabain has anti-inflammatory action in ALI induced by LPS.

Keywords: ouabain; acute lung injury; ALI; ARDS; LPS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral e classificação dos glicosídeos cardíacos.	20
Figura 2. Estrutura química da ouabaína.	23
Figura 3. Esquema de liberação fisiológica da ouabaína.	24
Figura 4. Imunologia da LPA.	35
Figura 5. Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.	43
Figura 6. Esquema representativo da contagem de células totais e diferenciais.	45
Figura 7. Esquema representativo do ensaio imunoenzimático ELISA tipo sanduiche.	46
Figura 8. Esquema de citometria de fluxo para análise da expressão do receptor TLR4.	48
Figura 9. Esquema representativo do processamento histológico.	50
Figura 10. Histograma representativo para a expressão do TLR4.	60
Figura 11. Efeito do tratamento com ouabaína sobre as alterações morfológicas do pulmão de animais submetidos a LPA induzida por LPS (aumento 100x).	62
Figura 12. Efeito do tratamento com ouabaína sobre as alterações morfológicas do pulmão de animais submetidos a LPA induzida por LPS (aumento 400x).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema dos tratamentos na Lesão pulmonar aguda induzida por LPS.	42
--	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento com ouabaína na migração de leucócitos totais e diferenciais para o espaço broncoalveolar na lesão pulmonar aguda induzida por LPS.	55
Gráfico 2. Efeito do tratamento com ouabaína no influxo de proteínas para a região bronco-alveolar e consequente formação do edema pulmonar.	57
Gráfico 3. Efeito do tratamento com ouabaína na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6.	58
Gráfico 4. Efeito do tratamento com ouabaína na expressão do TLR4.	60
Gráfico 5. Score histológico do efeito do tratamento com ouabaína sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	Angiotensina IIHidróxido de sódio
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
CD	Cluster of differentiation
C-3	Carbono 3
C-17	Carbono 17
CEUA	Conselho de ética para uso de animais
DEXA	Dexametasona
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FACS	Fluorescent-activated classificador de células
e.p.m.	Erro Padrão da Média
FIO₂	Fração inspirada de oxigênio
HE	Hematoxilina-eosina
INF-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
K⁺	íon potassio
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Nm	Nanomolar
Na⁺	Íon sódio
NFATc	Fator nuclear de ativação da célula T c1
Nnos	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Espécies reativas de nitrogênio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κB
OUA	Ouabaína
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TLRs	Receptores semelhantes a toll
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TGF-β	Fator de transformação de crescimento β

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Glicosídeos cardíacos	20
1.2	Ouabaína	23
1.3	Efeito da ouabaína no sistema imune e no processo inflamatório	26
1.4	Lesão Pulmonar Aguda	28
1.5	Fisiopatologia da LPA	30
1.6	Imunologia da LPA	31
1.6.1	Papel dos macrófagos alveolares e dos TLR	31
1.6.3	Papel das citocinas e dos neutrófilos	32
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos Específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Material	40
3.1.1	Substâncias e sais	40
3.1.2	Aparelhos e equipamentos	40
3.2	Métodos	40
3.2.1	Animais	40
3.2.2	Preparo da ouabaína	41
3.2.3	Protocolo Experimental de LPA induzida por LPS	41
3.2.4	Tratamento dos animais	42
3.2.5	Determinação da migração de leucócitos totais e diferenciais no BALF	43
3.2.6	Quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α no BALF	45
3.2.7	Avaliação do influxo de proteínas para a região broncoalveolar	46
3.2.8	Avaliação da expressão do TLR4	47
3.2.9	Avaliação da histopatologia pulmonar	48
3.2.9.1	Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)	50
3.2.10	Análise estatística	52
4	RESULTADOS	54

4.1	Efeito da ouabaína no número de células totais e diferenciais do BALF de camundongos com LPA experimental	54
4.2	Efeito da ouabaína na permeabilidade vascular pulmonar	56
4.3	Efeito da ouabaína na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6	57
4.4	Efeito da ouabaína na expressão do TLR4	59
4.5	Efeito da ouabaína na histopatologia pulmonar da lesão pulmonar aguda	61
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

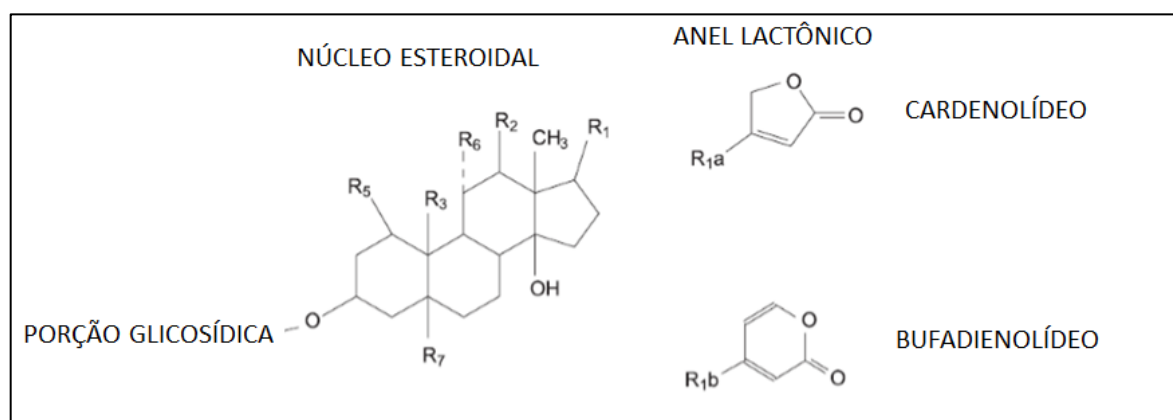


1. INTRODUÇÃO

1.1 Glicosídeos cardíacos

Os glicosídeos cardíacos são compostos orgânicos de origem natural e/ou sintética que compartilham a capacidade de atuar sobre a força contrátil do músculo cardíaco (MIJATOVIC et al., 2007). Quimicamente, são compostos que possuem grande diversidade estrutural, entretanto, todos os membros do grupo apresentam um núcleo esteroidal com uma unidade lactona na posição C-17 e um ou mais resíduos glicosídicos na posição C-3 (PRASSAS e DIAMANDIS, 2008). A natureza do anel lactônico classifica os glicosídeos cardíacos em dois grupos: bufadienolídeos, que apresentam uma pirona (anel lactônico insaturado formado por seis membros) e cardenolídeos, que apresentam uma butirolactona (anel lactônico insaturado formado por cinco membros) (DE SOURAV, et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura geral e classificação dos glicosídeos cardíacos



Fonte: Adaptado de De et al. (2016).

Devido a ação ionotrópica, alguns membros dessa família têm estado em utilização clínica há muitos anos para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e arritmia atrial (NEWMAN et al., 2008), e o mecanismo farmacológico responsável por esse efeito está bem caracterizado (SMITH, 1989). Esse mecanismo se relaciona à capacidade dos digitálicos de se ligarem à superfície extra-celular da bomba Na⁺/K⁺ ATPase (HOFFMAN, 1966), principal proteína transportadora de íons na célula. Essa proteína, utiliza a energia obtida da hidrólise de moléculas de ATP para dirigir o transporte ativo dos íons potássio (para o interior da célula) e sódio (para

o exterior da célula) na proporção estequiométrica 2:3. Dessa forma, sua principal função fisiológica descrita é manter o gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, o que é essencial para o transporte secundário de diversos substratos orgânicos e inorgânicos (KAPLAN, 2002). Ao inibir a atividade dessa bomba, os digitálicos promovem o aumento dos níveis intracelulares de Na^+ . Como resultado, há alteração no gradiente estequiométrico do Na^+ e a atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ é reduzida, promovendo um acúmulo de Ca^{2+} no interior das células musculares cardíacas e conseqüentemente o aumento da força de contração (SMITH, 1989; JORGENSEN, HAKANSSON e STEVEN, 2003).

O uso médico dos glicosídeos cardíacos se iniciou em 1775 quando o médico inglês Willian Withering descobriu que extratos das plantas conhecidas popularmente como “dedaleiras” (plantas do gênero *Digitalis*) ajudavam na melhora clínica de pacientes que apresentavam grande acúmulo de líquido na região abdominal (PECK e WILKISON, 1950). Em 1930, a digoxina foi isolada da *Digitalis lanata* e assim, como outros derivados semelhantes, passou a ser utilizada para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (KELLY e SMITH, 1996). Outros glicosídeos cardíacos foram encontrados em venenos de determinadas espécies de sapos (MEYER e LINDE, 1971) e a presença de moléculas desse tipo em tecidos de mamíferos foi postulada com base em considerações teóricas e fisiológicas.

Evidências celulares e moleculares da presença de glicosídeos cardíacos endógenos em tecidos humanos foram obtidas inicialmente em estudos que demonstraram que extratos de tecido do cérebro (FISHMAN 1979; LICHTSTEIN e SAMUELOV, 180) e do hipotálamo (HAUPERT e SANCHO, 1979) inibem a atividade da Na^+/K^+ ATPase. A partir desta constatação, diversos estudos foram realizados e a presença de glicosídeos cardíacos em tecidos e na circulação de mamíferos superiores foi então confirmada.

O primeiro glicosídeo cardíaco a ser identificado no organismo humano foi a ouabaína (HAMLYN et al., 1991; MATHEWS et al., 1991; SCHNEIDER et al., 1998), seguido pela digoxina (GOTO et al., 1990b; QAZZAZ et al., 2004). Além destes, outros glicosídeos cardíacos foram identificados em órgãos como cérebro e glândulas supra-renais, e em fluídos como urina, plasma e líquido cefalorraquidiano (WEIDEMANN, 2005). A biossíntese desses hormônios tem como precursores o colesterol e a progesterona (HAMLYN et al., 2003; QUAZZAZ et al., 2004) e ocorre em sua maioria no córtex da glândula adrenal, sendo controlada por hormônios como angiotensina II,

endotelina e adrenalina (GOTO et al., 1990; LAEDO et al., 1994; LAREDO et al., 1997).

Os glicosídeos cardíacos endógenos, de maneira semelhante aos exógenos, se ligam e inibem a bomba Na^+/K^+ ATPase. Diversos estudos têm mostrado a Na^+/K^+ ATPase como um transdutor de sinal versátil, sugerindo que a ligação desses compostos a essa bomba leva a ativação de diversas vias de transdução de sinal, promovendo a regulação de diversos estados fisiológicos e patológicos (SCHONER, 2002; SCHONER e SCHEINER-BOBIS, 2007;). A capacidade de transdução de sinal desta proteína é uma propriedade independente de sua função de bombear íons (SEGALL, et al., 2003) e ocorre quando os glicosídeos cardíacos se ligam a ela promovendo alterações conformacionais que favorecem a sua interação com outras proteínas. Esse processo, depende das doses e concentrações dos glicosídeos cardíacos e essas vias, uma vez ativadas, regulam processos celulares como crescimento celular (LIU et al., 2004), motilidade celular (BARWE et al., 2005) e apoptose (WANG et al., 2003).

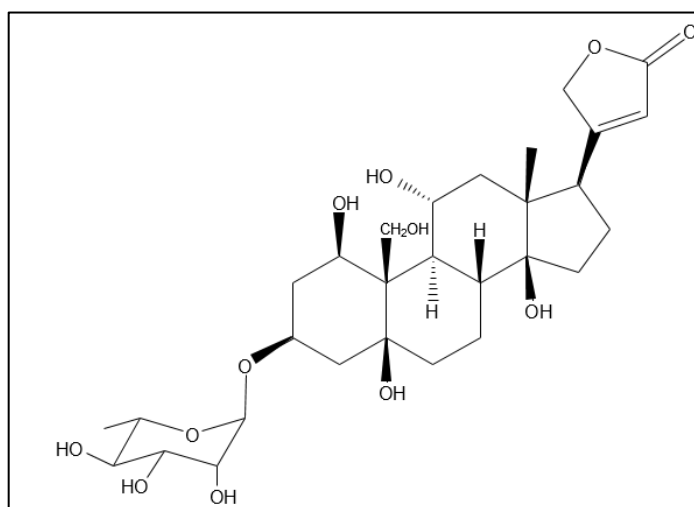
Foi constatado que vias de sinalização como a da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e a do fator de transcrição nuclear κB (NF- κB), que participam na regulação do crescimento e da sobrevivência do tumor, podem ser moduladas por glicosídeos cardíacos (PRASSAS e DIAMANDIS, 2008). Dessa forma, em adição aos efeitos cardíacos, os digitálicos vêm sendo utilizados na clínica para o tratamento de alguns tipos de neoplasias (HAUX et al., 2001).

Adicionalmente, alguns estudos demonstram que os glicosídeos cardíacos modulam negativamente a resposta inflamatória por interferir em parâmetros como a migração de leucócitos para o sítio inflamado, a expressão de moléculas de adesão e a produção de citocinas e quimiocinas. Nesse contexto, glicosídeos como a digoxina, digitoxina, oleandrina, e ouabaína, têm demonstrado efeitos promissores em diversos modelos de inflamação (ESPOSITO; POIRIER e CLARK, 1989; YANG et al., 2005; MANNA; SREENIVASAN e SARKAR, 2006; IHENETU et al., 2008; TAKADA et al., 2009; DE VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2012; LEITE, 2012; LEITE et al., 2015).

1.2 Ouabaína

A ouabaína é um glicosídeo cardíaco que foi obtido inicialmente da casca de ouabaio (*Acokanthera ouabaio*) e das sementes de estrofantó (*Strophantus gratus*), plantas digitálicas da família Apocynaceae, encontradas em regiões tropicais e subtropicais (BLAUSTEIN, 1993). Sua estrutura química compreende uma ouabagenina (porção esteroidal), uma ramnose (porção glicosídica) e uma lactona (figura 2) (ROBBERS et al., 1997). Essa molécula, foi o primeiro digitálico encontrado em mamíferos superiores, tendo sua produção endógena confirmada por Hamlyn e colaboradores em 1991, quando isolaram esse glicosídeo no plasma humano e mostraram que ele era quimicamente, biologicamente e imunologicamente igual a ouabaína obtida a partir de vegetais (HAMLYN et al., 1991; MATHEWS et al., 1991; FERRANDI et al., 1997; SCHONER, 2000).

Figura 2 - Estrutura química da ouabaína



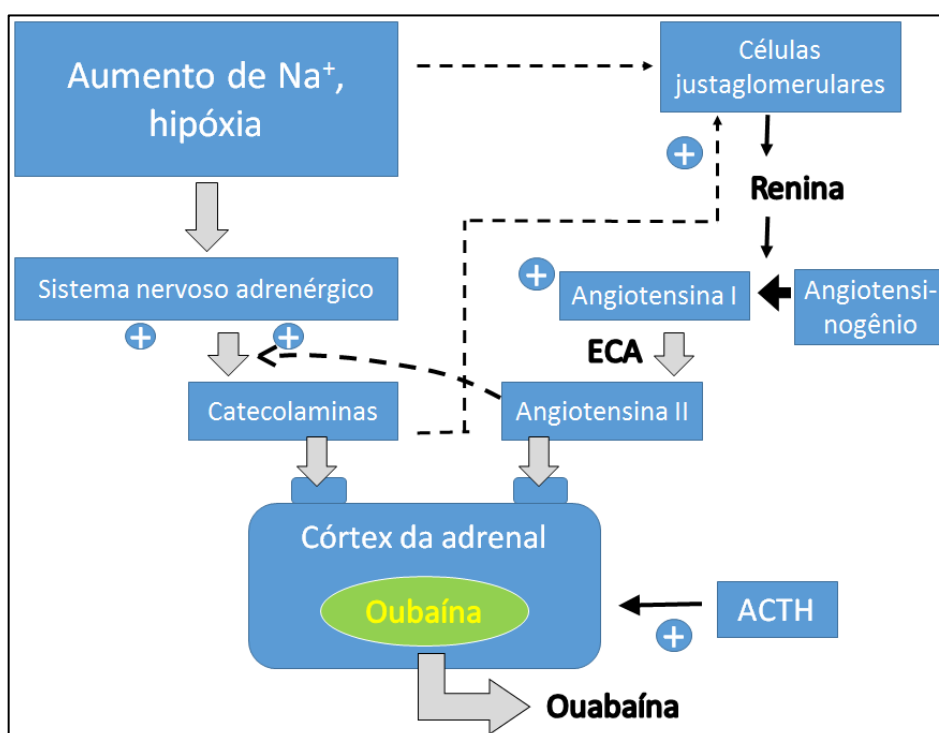
Fonte: Leite et al. (2012).

A ouabaína endógena foi encontrada em vários fluídos corporais e em quase todos os tecidos. As concentrações mais elevadas foram observadas na hipófise, no hipotálamo e na adrenal (HAMLYN et al., 1991; HAMLYN et al., 1998; LI et al., 1998).

A síntese de ouabaína pela adrenal foi estudada em experimentos com cultura de tecidos bovinos, foi demonstrado que ocorre na região cortical (QAZZAZ, EL-MASRI e VALDES, 2000; DORIS et al., 1996; LAREDO, HAMILTON e HAMLYN, 1994; PERRIN et al., 1997) e é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), pela Angiotensina II (ANG II) (LAREDO, HAMILTON e HAMLYN, 1995), pelo aumento da

concentração plasmática de sódio e do volume extracelular e por estados de hipóxia (BLAUSTEIN, 1993). Além disso, foi constatado que agonistas α -1 adrenérgicos também promovem estimulação da liberação de ouabaína, indicando que o sistema nervoso simpático está envolvido na regulação da liberação deste hormônio para a corrente sanguínea (Fig. 3) (LAREDO et al., 2000). Os precursores endógenos da ouabaína são a progesterona e a pregnolona, e a síntese é dependente de isoforma específica da enzima 11β -hidroxilase (HAMLYN et al., 2003).

Figura 3 - Esquema de liberação fisiológica da ouabaína



Fonte: Adaptado de Schoner (2002).

Após ter sua produção endógena confirmada, a ouabaína passou a ser largamente estudada e desde então várias constatações acerca de sua participação em mecanismos fisiológicos e patológicos vêm sendo realizadas (BAGROV e SHAPIRO, 2008; VARDAMAN e BUCKALEW, 2015; GROSS e HARRINGTON, 2016). Os níveis circulantes de ouabaína endógena variam de 0,5 a 2,0 nM (DVELA-LEVITTM et al., 2015a) e evidências demonstram que a liberação desse hormônio pode ser modificada de acordo com o estado fisiológico do organismo (SIMONIN et al., 2015), sendo maior em seres humanos hipertensos (MANUNTA et al., 1999), após o exercício físico agudo (BAUER et al., 2005) e durante a gravidez (DELVA et al.,

1989). Os níveis de ouabaína endógena também são maiores em pacientes com insuficiência renal (MANUNTA et al., 2011), em pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio (GOTO et al., 1996) e em pacientes que sofrem de insuficiência cardíaca congestiva (HAMLYN et al., 1991). Em adição aos seus efeitos hipertensivos, a ouabaína endógena modifica a função cardíaca e modula a proliferação e diferenciação celular no coração (AYDEMIR-KOKSOY et al., 2001) rim (LI et al., 2015), e músculo liso vascular (PADILHA et al., 2011). Além disso, também é capaz de aumentar o tônus vascular e reduzir o fluxo sanguíneo renal (MANUNTA et al., 2011).

A ouabaína participa da resposta do organismo ao estresse e sua participação na hipertensão neurogênica (GRASSI, 2004), que tem como um dos principais mecanismos desencadeadores a liberação de ANG II, vem sendo constatada (LAZARTIGUES, 2010). Por inibir a Na^+/K^+ -ATPase, a ouabaína diminui o potencial de membrana neuronal, promovendo exacerbação do efeito excitatório simpático desencadeado pela ANG II (PULINA et al., 2010). Adicionalmente, a ouabaína estimula o núcleo paraventricular e aumenta a liberação de ANG II (ZHANG et al., 2008). Esses efeitos, associados a diminuição da expressão da sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) (CAMPESE; YE; ZHONG, 2002) e ao aumento da expressão de receptores da angiotensina do tipo 1 (AT1) (LIU et al., 2008) promovem o aumento da atividade do sistema nervoso simpático contribuindo para a manutenção da hipertensão neurogênica (GABOR; LEENEN, 2009).

Alguns estudos indicam a ouabaína como um neuromodulador com diversas ações no sistema nervoso central em especial no hipotálamo. Foi constatado que esse glicosídeo cardíaco participa no desenvolvimento de doenças como o transtorno bipolar, manias e outros distúrbios comportamentais (ELMALLAKH et al., 1995; LI et al., 1997; LEHMANN et al., 2006; YU et al., 2010; YU et al., 2011; AMODEO., 2016). Além disso, foi demonstrado que concentrações elevadas de ouabaína (40 a 400 μM) promovem diminuição da recaptação de noradrenalina nas sinapses, aumentando a concentração deste neurotransmissor em células hipocámpais (VATTA et al., 2004). Adicionalmente, em 2005 Reinés e colaboradores mostraram que o tratamento com ouabaína promove ação neuroprotetora por regular negativamente a expressão dos receptores de glutamato NMDA, relacionados ao fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica, em modelos murinos de isquemia e reperfusão (REINÉS et al., 2005).

1.3 Efeito da ouabaína no sistema imune e no processo inflamatório

O sistema imunológico é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas, capaz de manter a homeostase do organismo (CRUVINAL et al., 2010). O processo inflamatório, pode ser definido como uma resposta protetora, desencadeada por qualquer tipo de injúria, promovendo a eliminação do agente lesivo com possível restauração total do tecido e com a atuação de diversos mediadores e tipos celulares (MARIOTTI, 2004). Embora seja uma resposta protetora, o processo inflamatório quando exacerbado ou desregulado pode causar danos aos tecidos e gerar uma série de doenças a exemplo das alergias, das doenças auto-imunes e da lesão pulmonar aguda, dentre outras (WILSON; TRUMPP, 2006).

A resposta imune pode ser modulada fisiologicamente ou farmacologicamente por substâncias ativas que reparam e reprimem as respostas indesejadas ou que estimulam o sistema imunitário (CHAUSSABEL; PASCUAL; BANCHEREAU, 2010).

A ouabaína é um glicosídeo capaz de regular células do sistema imune, alterar a expressão de proteínas e modular níveis de mediadores inflamatórios, interferindo em diversos aspectos da resposta imunológica (ECHEVARRIA-LIMA E RUMJANEK, 2006; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009). Assim como outros glicosídeos cardíacos, a ouabaína se liga à Na^+/K^+ ATPase afetando o transporte de íons e alterando a atividade desta bomba. Entretanto, foi constatado que concentrações de ordem de grandeza menores do que aquelas necessárias para causar inibição da Na^+/K^+ ATPase, são capazes de regular diversos parâmetros inflamatórios, indicando que alguns dos efeitos da ouabaína no sistema imune resultam de um mecanismo diferente da tradicional inibição da bomba (SAUNDERS e SCHEINER-BOBIS, 2004; SPIVAK et al., 1980).

Em relação a sua ação em células linfóides, foi constatado que ouabaína promove inibição da proliferação de linfócitos induzida por fitohemaglutinina (QUASTEL e KAPLAN, 1968) e por outros estímulos como éster de forbol (OLEJ et al., 1994; BRODIE et al., 1995), anti-CD3 (SZAMEL et al., 1995) ionóforo de cálcio (JENSEN et al., 1977) e interleucina 2 (IL-2) (REDONDO et al., 1986). Adicionalmente, em linfócitos maduros de sangue periférico a ouabaína induziu um aumento na expressão do proto-oncogen c-myc, levando parte dessa população à morte por apoptose (OLEJ et al., 1998).

Timócitos murinos expostos a ouabaína tiveram proliferação celular induzida pela concavalina-A inibida (SZAMEL; SCHNEIDER; RESCH, 1981), indução da expressão de CD69 por um mecanismo dependente do influxo de cálcio extracelular (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2003), apresentaram diminuição dos níveis do fator nuclear de ativação das células T c1 (NFATc) e redução da atividade da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008).

Alguns estudos demonstram ação sinérgica da ouabaína com glicocorticoides, tanto num modelo *in vivo*, onde a administração combinada de ouabaína com hidro cortisona promoveu atrofia tímica decorrente da diminuição da celularidade por aumento da apoptose (RODRIGUES-MASCARENHAS; DOS SANTOS e RUMJANEK, 2006), como num modelo *in vitro*, onde concentrações elevadas de ouabaína promoveram despolarização da membrana plasmática de timócitos e potencializou a morte dessas células induzida por glicocorticoide (MANN et al., 2001). Adicionalmente, o processo de maturação de linfócitos B (LB) foi modulado pela ouabaína e acredita-se que esse efeito seja decorrente do sinergismo desse glicosídeo com glicocorticoides, pois o mesmo resultado não foi evidenciado *in vitro* (DE PAIVA et al., 2011). Outros resultados indicam que a ouabaína regula a dinâmica de linfócitos B em órgãos periféricos, entretanto não altera a concentração de IgM e IgG total no plasma de animais tratados (SILVA et al., 2016).

Recentemente foi demonstrado que ouabaína modula o processo de maturação de células dendríticas, tendo em vista que a incubação com 100nM desse glicosídeo promoveu a abolição da expressão de CD83 e o aumento da expressão CD86 e HLA-DR (NASCIMENTO et al., 2014). Adicionalmente, a função de monócitos humanos também foi modulada. Nessa população celular a ouabaína aumentou os níveis de cálcio intracelular, induziu a expressão de moléculas de superfície como CD69, CD86 e CD80, aumentou a capacidade endocítica e estimulou a produção das citocinas IL-1 β e TNF- α (TEIXEIRA e RUMJANEK, 2014). Em adição, ouabaína regula negativamente a expressão de mCD14, uma molécula de superfície envolvida na resposta dos macrófagos contra patógenos bacterianos e fungicos e na fagocitose (VALENTE et al., 2009).

A ouabaína apresenta um papel modulador em diversos modelos de inflamação, por reduzir a migração de células inflamatórias para o sítio inflamado,

interferir na produção de citocinas e inibir a via de mediadores inflamatórios (TAKADA et al., 2009). Vem sendo constatado que esse glicosídeo é capaz de interferir em diversos aspectos da resposta inflamatória aguda induzida por distintos agentes flogísticos, a exemplo da carragenina e do composto 48/80 e que sua atividade antiedematogênica e antinociceptiva está relacionada à inibição da ação de mediadores como prostaglandina e bradicinina (DE VASCONCELOS et al., 2011). Em estudos utilizando um modelo de leishmaniose experimental *in vivo* foi constatado que a ouabaína interfere na resposta inflamatória desencadeada pela *Leishmania (L.) amazonenses*, em especial nos eventos iniciais, como a migração de neutrófilos e a produção das citocinas TNF- α e INF- γ (JACOB et al., 2012). Além disso, experimentos *in vitro* mostraram que ouabaína não afeta a capacidade endocítica de macrófagos e em um modelo de peritonite, ouabaína promoveu a redução da atividade do NF- κ B induzida pelo zimosan, reduzindo parâmetros relacionados a esse fator de transcrição (LEITE et al., 2015). Ouabaína tem também mostrado efeito imunomodulador em um modelo murino de inflamação alérgica pulmonar (dados ainda não publicados).

1.4 Lesão pulmonar aguda

A lesão pulmonar aguda (LPA) e sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) são doenças inflamatórias pulmonares, caracterizadas clinicamente pela ocorrência aguda (<7 dias) de hipoxemia grave e infiltrado pulmonar bilateral visível na radiografia do tórax (BUTT et al., 2016). Ambas, são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade em todo o mundo e há evidências de que muitos dos pacientes que sobrevivem a LPA ou a SDRA possuem qualidade e duração de vida diminuídas (RUBENFELD et al., 2005; DOWDY et al., 2006).

Segundo a Conferência de Consenso Européia-Americana, LPA e SDRA se diferenciam de acordo com a gravidade da hipoxemia. Onde, pacientes com LPA apresentam a relação entre a PaO_2 (pressão arterial parcial de oxigênio) e a FIO_2 (fração inspirada de oxigênio) ≤ 300 , e pacientes que evoluíram para a SDRA apresentam a relação $PaO_2 / FIO_2 \leq 200$ (PARKET et al., 2011).

A LPA foi inicialmente descrita por por Ashbaugh e Petty em 1967 (WALKEY et. al., 2012) e desde então é considerada uma síndrome frequente, complexa e com muitos fenótipos clínicos. Sua etiologia pode ser dividida em causas diretas, quando

a injúria acomete o pulmão, e em causas indiretas quando o pulmão é secundariamente afetado. Dentre as causas diretas podemos citar a broncopneumonia, aspiração do conteúdo gástrico, inalação de fumaça, contusão pulmonar, experiência de quase afogamento e embolia gordurosa. Nas causas indiretas temos os fatores clínicos predisponentes como sepse severa, bacteremia, múltiplas fraturas ósseas, pancreatite, trauma não pulmonar, overdose de drogas e transfusão de sangue (RANDHAWA e BELLINGAN, 2007; MACCALLUM e EVANS, 2004; WALKEY et. al., 2012).

Nos Estados Unidos cerca de 150 mil pacientes por ano recebem um diagnóstico de LPA e essa síndrome afeta um em cada dez pacientes em UTI, tendo uma taxa de mortalidade que varia de 22% a 58% dependendo da gravidade (MACKAY e AL-HADDAD, 2010; BUTT et al., 2016). Em alguns estudos foi constatado que fatores como idade e raça parecem estar relacionados com a mortalidade, tendo em vista que ela é mais significativa quanto maior for a idade do paciente (RUBENFELD et al., 2005; FLORI et al., 2005) e que afro-americanos tem taxa de mortalidade maior quando comparados a caucasianos (ERICKSON et al., 2009). Esse aumento do risco de morte é independente do sexo, da etiologia da lesão pulmonar ou de comorbidades.

Diversos modelos experimentais têm sido propostos para o estudo da LPA e a utilização de modelos animais para mimetizar a LPA em humanos tem se mostrado uma ferramenta bastante útil, tendo em vista que esses modelos são capazes de reproduzir os mecanismos e as consequências dessa enfermidade, incluindo as mudanças fisiológicas e patológicas que ocorrem. Para mimetizar a LPA direta em modelos animais, a administração de endotoxinas, como os lipopolissacarídeos (LPS) presente na parede de bactérias gram-negativas, tem ocorrido em grande medida e têm assim, uma longa história nesta área de pesquisa, sendo a LPA induzida por LPS o segundo modelo experimental mais realizado em pesquisas científicas nessa área (MATUTE- BELO et al., 2008).

O LPS é um potente ativador da resposta imune inata via receptor TLR4 e sua utilização fornece informações sobre os efeitos da resposta inflamatória no hospedeiro que sofre com a infecção bacteriana (MORRIS e LI, 2012). Adicionalmente, o LPS é facilmente administrado e sua administração nasal ou intratraqueal é acompanhada por um aumento de polimorfonucleares e de citocinas inflamatórias no espaço aéreo,

eventos que tendem a ser bem reproduzidos em experimentos (MATUTE-BELLO et al., 2008).

Apesar do grande número de estudos, atualmente a LPA ainda não possui tratamento específico, a terapia principal é a de apoio focada no tratamento da condição subjacente e nas técnicas de manejo do paciente, incluindo principalmente ventilação mecânica adequada (WHEELER e BERNARD, 2007; RAGHAVENDRAN et al., 2008; WALKEY et al., 2012). Pode-se dizer então, que a LPA é uma necessidade médica não atendida e que novas terapias devem ser desenvolvidas para melhorar os resultados clínicos e diminuir a mortalidade (JOHNSON e MATTHAY, 2010).

1.5 Fisiopatologia da LPA

A LPA é uma síndrome de etiologia multifatorial caracterizada inicialmente pelo rápido aparecimento de dispneia, hipoxemia, insuficiência respiratória, infiltrados celulares bilaterais e edema pulmonar (WARE e MATTHAY; 2000). O início rápido da insuficiência respiratória é resultado da hipoxemia arterial devido ao edema rico em proteínas na região alveolar, diminuição da complacência pulmonar e disfunção do surfactante (GREGORY et al., 1991; LEWIS e JOBE, 1993). Para o controle do rápido aparecimento da insuficiência respiratória geralmente há a necessidade de ventilação mecânica (NUCKTON et al., 2002).

Essa síndrome manifesta-se como uma lesão rigorosa, difusa e heterogênea dos lóbulos pulmonares levando a quebra da barreira alvéolo-capilar e comprometendo a função pulmonar (HUDSON e STEINBERG, 1999). Biópsias pulmonares de pacientes com LPA na fase aguda mostram uma lesão morfológica específica chamada de dano alveolar difuso (KATZENSTEIN et al., 1995) com edema pulmonar rico em proteínas, macrófagos, neutrófilos e eritrócitos nos espaços alveolares (PRATT et al, 1979). O epitélio alveolar é destruído e a membrana basal revestida por uma membrana hialina rica em fibrina (BACHOFEN e WEIBEL, 1977). Microtrombos podem ser encontrados nos capilares pulmonares e a presença de lesão no endotélio desses vasos podem ser visualizadas com o auxílio de microscopia eletrônica (BACHOFEN e WEIBEL, 1982).

A fase aguda da LPA pode ser resolvida sem sequelas, entretanto diversos pacientes progridem para uma fase mais prolongada, caracterizada por falha respiratória persistente, hipoxemia persistente, crescente diminuição da complacência pulmonar e por um quadro histológico conhecido como alveolite fibrosante, onde há fibrose, angiogênese e redução parcial do edema pulmonar (FUKUDA et al; 1987; ANDERSON e THIELEN, 1992; PRATT et al, 1979). Essa fase é complicada e geralmente provoca hipertensão pulmonar grave acompanhada de insuficiência ventricular direita (MATTHAY e BROADDUS, 1994). A alveolite fibrosante se desenvolve após muitos dias durante o curso da LPA, entretanto, o seu desenvolvimento ou não está relacionado aos eventos inflamatórios e a gravidade da lesão inicial (CHESNUTT et al., 1997; CLARK et al., 1995; OLMAN et al., 2002).

A LPA é, portanto, uma doença devastadora com estágios patológicos distintos. Onde a inflamação pulmonar é resultado da resposta imune do corpo a uma variedade de estímulos locais ou sistêmicos. Em pacientes que sobrevivem nas fases subsequentes inflamatórias e fibroproliferativas, a transição do prejuízo para a resolução e recuperação é um processo ativo que depende de uma série de eventos altamente coordenados e regulados pelo sistema imunológico (BUTT et al., 2016).

1.6 Imunologia da LPA

1.6.1 Papel dos macrófagos alveolares e dos TLRs

Os macrófagos são células essenciais para a imunidade inata e desempenham função de destaque no pulmão e nos espaços alveolares. Diversos estudos apoiam a importância dos macrófagos em iniciar e manter a resposta inflamatória, tendo papel crucial na iniciação e desenvolvimento da LPA (AGGARWAL et al., 2014). Adicionalmente, estudos tem sugerido a participação dessas células no processo de recuperação e reparação da doença (HEROLD e MAYER, 2011).

Macrófagos alveolares representam a primeira linha de defesa celular contra partículas e micróbios em suspensão. Essas células permanecem em exposição contínua com o mundo externo (LASKIN et al., 2001) e expressam diversos receptores de reconhecimento de padrão, a exemplos dos receptores do tipo toll (TLRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e preparam a

célula para iniciar uma resposta imunitária rápida e organizada (Figura 4 A) (GORDON e TAYLOR, 2005; TAYLOR et al., 2005).

Para iniciar a resposta imune, a ligação de moléculas patogênicas aos receptores de reconhecimento de padrão ativa os macrófagos alveolares. Uma vez ativadas essas células promovem a transcrição de fatores nucleares e liberam uma variedade de mediadores que promovem a potencialização da resposta imune inata e propagam o processo inflamatório no espaço alveolar (AGGARWAL et al., 2014) levando ao desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LEIKAUF et. al, 2014). Tais mediadores incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS), enzimas proteolíticas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária e citocinas (Figura 4 B) (MARSHALL et al, 2002; GROENEVELD, 2003).

Um dos conceitos emergentes em imunologia aplicada ao desenvolvimento da LPA é o papel dos receptores de reconhecimento de padrão em especial dos TLRs nesse processo (BUTT et al., 2016). Os TLRs são receptores presentes em células imunes, a exemplo dos macrófagos e neutrófilos, e em células não imunes, que reconhecem padrões moleculares presentes em patógenos microbianos não conservados em eucariotos e ativam o sistema imune, montando a resposta inata e organizando a resposta adaptativa (KAWAI e AKIRA, 2010; MEDZHITOV, 2001). Esses receptores reconhecem uma variedade de PAMPs a exemplos de RNA e DNA viral, β -glucana de fungos e LPS bacteriano (RIFKIN et al., 2005) e ativam as células que os expressam, dando início ao processo inflamatório.

Existem cerca de 10 TLRs funcionais em humanos (AKIRA e TAKEUCHI, 2006) e todos são receptores transmembranares que apresentam dois domínios distintos, um extracelular que interage com o agente patogênico e outro intracelular que está envolvido na sinalização (BROZ e MONACK, 2013).

Os TLRs compartilham diferentes vias de sinalização, a exemplo de vias que promovem ativação das MAP quinases JNK e p38, além da ativação do fator de transcrição NF- κ B (AKIRA et al., 2006). Tem sido relatado que a ativação do NF- κ B via TLR desempenha papel importante na patogênese de doenças pulmonares, em especial da LPA (PAHL, 1999; JIANG et al., 2005; CHAN et al., 2015), tendo em vista que a ativação desse fator é necessária para a transcrição das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (GOODMAN et al., 2003) consideradas mediadores chaves no desenvolvimento da doença (Figura 4 B).

1.6.2 Papel das citocinas e dos neutrófilos

A resposta inflamatória na LPA é iniciada, amplificada e modulada por uma rede complexa de citocinas produzidas por uma variedade de tipos celulares no pulmão, incluindo fibroblastos, células epiteliais e células inflamatórias (GOODMAN et al., 2003). O aumento de citocinas proinflamatórias ocorre como resposta direta a infecção ou injúria celular e níveis persistentemente elevados de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no fluído do lavado broncoalveolar (BALF) de pacientes com LPA são fortes indicativos de predisposição a mortalidade (MEDURI et al., 1995; MARSHALL et al, 2002; BUTT et al., 2016).

O TNF- α e a IL-1 β são as citocinas mais precoces da resposta inflamatória aguda e seus papeis na LPA já estão bem estabelecidos (GOODMAN et al., 2003). Essas citocinas são produzidas predominantemente pelos macrófagos alveolares em resposta a insultos pulmonares diretos ou indiretos e agem localmente promovendo potentes efeitos inflamatórios que incluem o aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão (EDER, 2009), aumento da permeabilidade vascular, estimulação de células epiteliais, ativação de células mononucleares e polimorfonucleares (figura 4 B) (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004), além de atuarem como fatores de crescimento para fibroblastos e promover a angiogênese (WITKAMP e MONSHOUWER, 2000). Adicionalmente, a IL-6 também é liberada e potencializa os eventos pró-inflamatórios iniciais no espaço alveolar (FIELDING, 2008).

A citocina IL-8 é uma quimiocina liberada por macrófagos alveolares e por células epiteliais que funciona como um potente fator atrativo para neutrófilos, direcionando a migração dessas células para o pulmão e favorecendo sua ativação (GOODMAN et al., 2003). Diversos estudos tem mostrado que a IL-8 desempenha um papel central no progresso da LPA (GROENEVELD, 2003), tendo em vista que em modelos experimentais específicos o bloqueio da ação desta quimiocina protege animais contra o desenvolvimento da doença (FOLKESSON et al, 1995).

O saldo de quimiocinas produzidas localmente pelos macrófagos alveolares é importante para a direção e migração dos neutrófilos que em resposta a esse gradiente químico atravessam o endotélio e migram para o espaço alveolar onde são

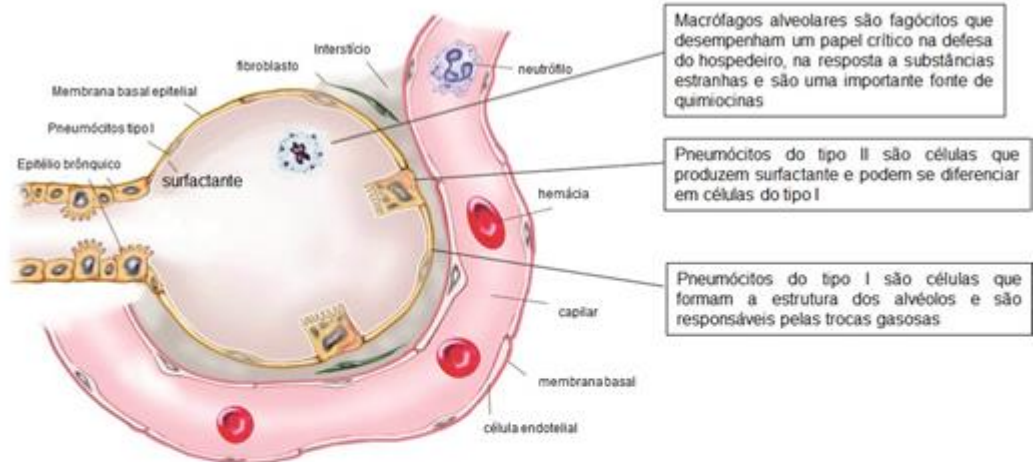
ativados (GARCÍA-RAMALLO et al, 2002). Uma vez ativados, os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas (PITTET et al., 1997), fator de ativação plaquetária, metabólitos do ácido araquidônico além de ROS e enzimas oxidativas como a mieloperoxidase (Figura 4 B) (KOTHARI et al, 2011), todos esses mediadores são considerados citotóxicos e intensificam o processo inflamatório levando as manifestações clínicas características da LPA (Figura 4 C) (GINZBERG et al., 2001; MORAES et al., 2006).

Os neutrófilos desempenham um papel essencial na LPA, sua migração e ativação é uma marca na progressão da doença. Apesar de sua atividade ser vital para a defesa do hospedeiro, o excesso de ativação provoca dano tecidual grave (GRAMMES e SOEHNLEIN, 2011). A prova da importância dos neutrófilos no desenvolvimento da LPA vem de dados clínicos e de estudos com modelos animais. Foi constatado que em pacientes com LPA, a concentração de neutrófilos no BALF se correlaciona com o avanço da doença, ao passo que a depleção de neutrófilos em camundongos reduz a sua gravidade (ABRAHAM et al, 2000).

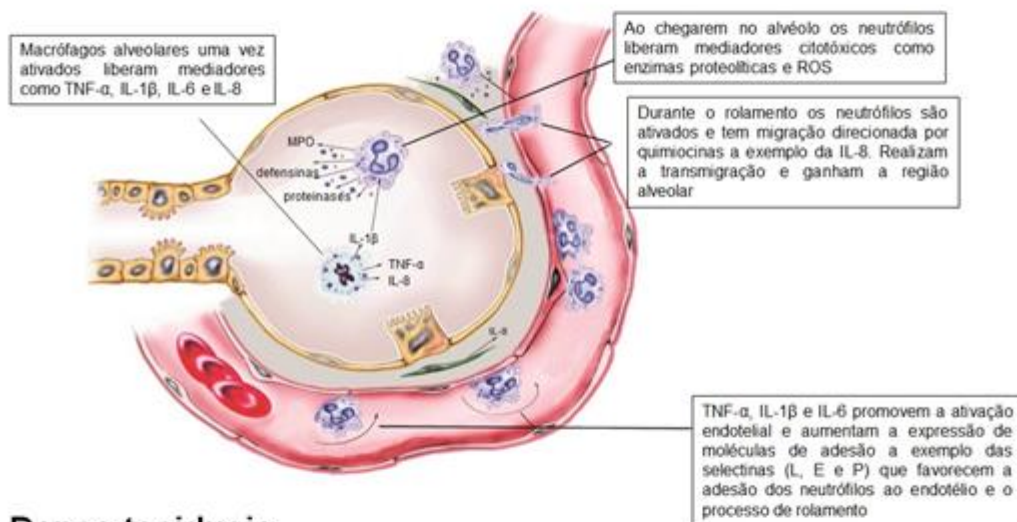
A inflamação mediada pelos neutrófilos é normalmente finalizada por sua apoptose, com subsequente eliminação dessas células do espaço aéreo por fagocitose pelos macrófagos alveolares (MATUTE-BELLO et al., 1997), entretanto durante a LPA a função dos neutrófilos se torna desregulada (FAN et al, 1998). Tem sido evidenciado que durante a LPA os neutrófilos têm meia-vida prolongada devido ao atraso da fagocitose, ou atraso da apoptose (FIALKOW et al, 2006) fornecendo a essas células uma vida útil mais longa e permitindo seu acúmulo no tecido pulmonar (CHOPRA et al, 2009).

Figura 4 - Imunologia da LPA

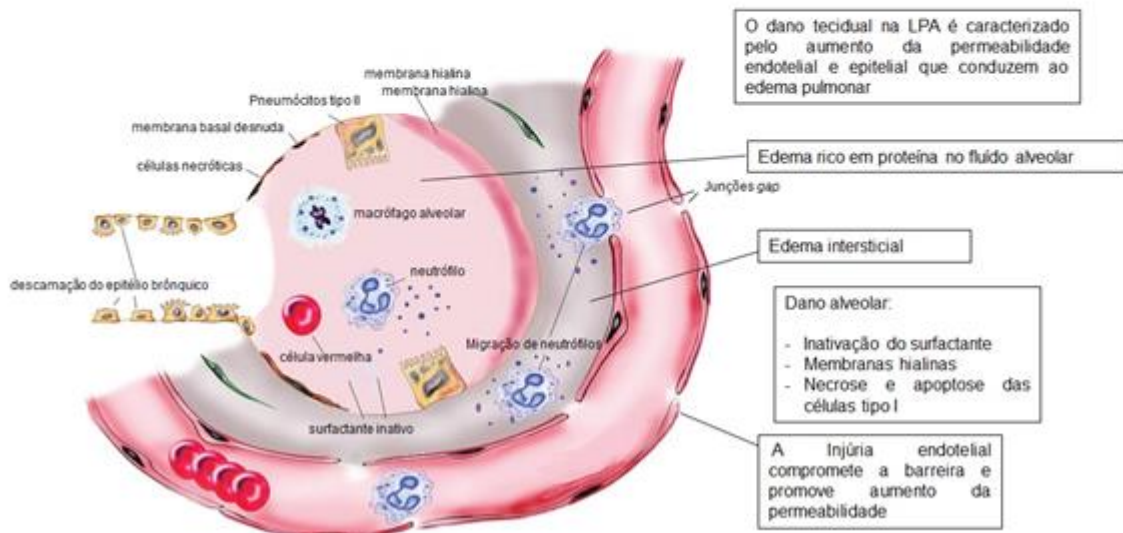
A. Alvéolo Normal



B. Recrutamento de neutrófilos para o pulmão



C. Danos teciduais



Macrófagos alveolares são ativados direta ou indiretamente via receptores de reconhecimento de padrão e liberaram mediadores inflamatórios como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-

6 e IL-8. Essas citocinas em conjunto promovem a ativação endotelial aumentando a expressão de moléculas de adesão, aumentam a permeabilidade vascular, estimulam a produção de proteínas de fase aguda, ativam os neutrófilos e promovem a quimiotaxia dessas células para o espaço alveolar. Ao ganharem o espaço alveolar os neutrófilos liberam diversos mediadores citotóxicos, como proteinases e espécies reativas de oxigênio que intensificam o processo inflamatório e causam danos teciduais graves. A injúria epitelial e endotelial na LPA resulta em comprometimento da barreira alvéolo capilar e tanto o endotélio capilar quanto o epitélio alveolar sofrem aumento de permeabilidade o que favorece o influxo de líquido rico em proteínas para o espaço alveolar culminando com edema intersticial e alveolar. Adicionalmente, a injúria epitelial promove a destruição dos pneumócitos tipo I e II, ocasionando a deposição de membrana hialina e diminuindo a produção do surfactante. Dessa forma, o edema intersticial e alveolar, o estreitamento da membrana alveolar, a diminuição da produção de surfactante e o acúmulo de neutrófilos no alvéolo leva a um quadro histológico característico da LPA conhecido como dano alveolar difuso, que clinicamente manifesta-se por hipóxia grave ($\text{PaO}_2 / \text{FIO}_2 \leq 300$), que pode evoluir para a SDRA ($\text{PaO}_2 / \text{FIO}_2 \leq 200$). Fonte: Adaptado de GROMMES e SOEHNLEIN (2011).

Considerando que a lesão pulmonar aguda é uma doença inflamatória com elevadas taxas de mortalidade e que a ouabaína é uma substância capaz de modular negativamente a resposta imune diminuindo o processo inflamatório em diferentes modelos de inflamação, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório da ouabaína frente a um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida pelo LPS e assim, contribuir para um melhor entendimento de suas ações no sistema imunológico.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel anti-inflamatório de ouabaína em um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzido por LPS.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a ação de ouabaína na migração de leucócitos totais e diferenciais (macrófagos e neutrófilos) no BALF dos animais com LPA experimental;
- ✓ Avaliar a ação de ouabaína na permeabilidade vascular pulmonar pela determinação do influxo de proteínas para o espaço bronco-alveolar dos animais com LPA experimental;
- ✓ Avaliar a ação de ouabaína no infiltrado celular no tecido pulmonar e na formação de edema pulmonar, parâmetros histopatológicos característicos da LPA;
- ✓ Avaliar a ação de ouabaína na produção das citocinas pró inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 na região bronco-alveolar dos animais com LPA experimental;
- ✓ Avaliar a ação de ouabaína na expressão do TLR4 nas células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar dos animais com LPA experimental;

MATERIAIS

MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Substâncias e sais

A lista das substâncias utilizadas encontra-se no apêndice A.

3.1.2 Aparelhos e equipamentos

A lista dos aparelhos utilizados encontra-se no apêndice B.

3.2 Métodos

3.2.1 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c machos com idade entre 6-8 semanas, pesando de 20 a 25g foram utilizados na metodologia experimental de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e de 18h00 as 6h00 escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* (PURINA) durante todo o período de experimentação. Cada grupo experimental foi constituído de 6 animais. Para avaliação da reprodutibilidade dos resultados foram realizadas três repetições de cada protocolo experimental. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia e a anestesia dos animais foram realizadas pela administração intra-muscular (i.m.) de solução anestésica contendo 29 mg/mL de cetamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9%). Os animais utilizados nesse trabalho foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM/UFPB. Os procedimentos experimentais desse trabalho foram analisados e aprovados pelo Comité de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob a certidão nº 029/2016 (ANEXO A).

3.2.2 Preparo da ouabaína

Para todos os experimentos a ouabaína foi preparada na dose de 0,56 mg/Kg. Para tanto, uma solução mãe de ouabaína foi preparada na concentração de 1 mg/mL em salina estéril, imediatamente antes do uso. A dose utilizada foi baseada em estudos prévios (DE VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2013; LEITE et al., 2015; DA SILVA, et al., 2016).

3.2.3 Protocolo experimental de LPA induzida por LPS

Para induzir a lesão pulmonar aguda, os animais foram previamente anestesiados como descrito anteriormente (item: 3.2.1 Animais) e receberam por instilação nasal, 40 µL de uma solução contendo LPS (LPS de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich®) na dose de 2,5 mg/Kg diluído em salina estéril e preparado imediatamente antes do uso (OLIVEIRA, 2014). O grupo controle recebeu a mesma quantidade do veículo estéril via intranasal. Os animais foram mantidos em condições normais e 24 horas após o desafio foram eutanasiados por overdose anestésica e o material biológico foi então coletado. Coletou-se o fluido do lavado broncoalveolar (BALF), para quantificação de citocinas e determinação do influxo de proteínas (sobrenadante), contagem de células e marcação celular (pellet); tecido pulmonar, para avaliação histopatológica (infiltrado celular e edema).

3.2.4 Tratamento dos animais

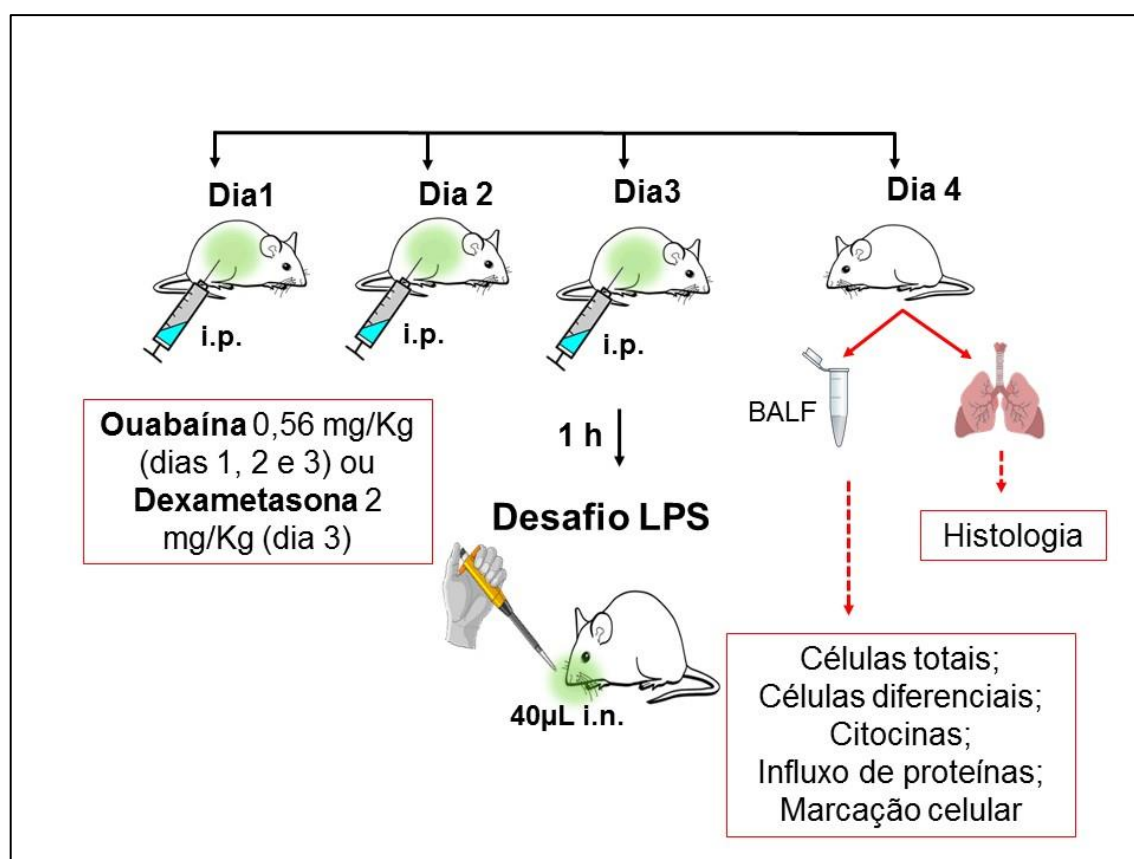
Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (BASAL, LPS, OUA, OUA+LPS e DEXA+LPS) todos constituídos por 6 animais. O grupo BASAL representa animais saudáveis (não desafiados com LPS), que expressam os níveis imunológicos basais; o grupo LPS (desafiados com LPS), representa animais doentes, que apresentam alterações imunológicas devido a um quadro patológico de inflamação pulmonar aguda; o grupo OUA representa animais saudáveis tratados com ouabaína; o grupo OUA+LPS representa os animais tratados com ouabaína e desafiados com LPS; por fim o grupo DEXA+LPS representa os animais tratados com dexametasona (DECADRON®) e desafiados com LPS. Os animais foram tratados

com ouabaína (0,56 mg/Kg) via intraperitoneal por três dias consecutivos antes do desafio ou tratados com dexametasona (2 mg/Kg) um único dia antes do desafio, o grupo BASAL recebeu apenas o veículo (salina estéril) durante os tratamentos. Após 1 hora do último tratamento com ouabaína e do tratamento com dexametasona os animais dos grupos LPS, LPS+OUA e LPS+DEXA foram desafiados com LPS. Para tanto, esses animais receberam via instilação nasal (i.n.) 40 µL de uma solução de LPS na dose de 2,5 mg/Kg que foi gotejada nas narinas até total absorção (OLIVEIRA, 2014). O esquema dos tratamentos e do protocolo de LPA podem ser visualizados na tabela 1 e na figura 5.

Tabela 1 - Esquema dos tratamentos na lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

GRUPOS	TRATAMENTOS	DESAFIO
BASAL	-	Salina (i.n.)
OUA	Ouabaína 0,56 mg/kg (i.p.)	Salina (i.n.)
LPS	-	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
LPS+OUA	Ouabaína 0,56 mg/kg (i.p.)	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
LPS+DEXA	Dexametasona 2,00 mg/kg (i.p.)	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)

Figura 5. – Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS



3.2.5 Determinação da migração de leucócitos totais e diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF)

Para quantificação do número total das células e do número de células diferenciais, 24 horas após o desafio com LPS, os animais foram eutanasiados, em seguida a traqueia foi exposta com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica, para maior visualização dessa estrutura os lobos da glândula tireoide foram retirados e então foi inserido um cateter periférico IV-18G de poliuretano (Descarpac) para a coleta do BALF. No cateter foi conectada uma seringa contendo 1 mL de HBSS-/- gelado, este foi administrado na traqueia e direcionado para o pulmão. Inicialmente foi injetado apenas 0,5 mL de HBSS-/- gelado, aguardou-se um tempo de 10 segundos e então foi aspirado o mesmo volume, finalizando a primeira lavagem, em seguida foi injetado todo o volume de HBSS-/- gelado contido na seringa de 1 mL, após 10 segundos foi aspirado, sendo realizado a segunda lavagem, o BALF coletado foi transferido para um tubo tipo eppendorf e armazenado no gelo, para preservar a viabilidade celular. Em seguida uma nova seringa foi conectada ao cateter e foi injetado mais 0,5 mL de HBSS-/- gelado, repetindo a espera de 10 segundos e aspirando todo o BALF contido no pulmão, realizando assim três lavagens, o BALF foi transferido para o mesmo tubo eppendorf, totalizando o BALF com 1,5 mL de HBSS-/- gelado.

Uma alíquota do BALF (10 μ L) foi retirada e adicionada, na proporção 1:4, a 30 μ L de solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), que lisa as hemácias e cora os leucócitos do BALF. Foi então retirado uma alíquota de 10 μ L da solução de Turk com BALF e levada a câmara hemocitométrica (Neubauer), sendo realizada a contagem das células totais no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS) (Figura 6). A equação 1 demonstra o cálculo que baseia os resultados das células totais, onde: C_T é o número de Células Totais do BALF, C_{CH} é o número de Campos da Câmara Hemocitométrica (CH), C_C é o número de Células Contadas na CH, e F_D é o Fator de Diluição do BALF.

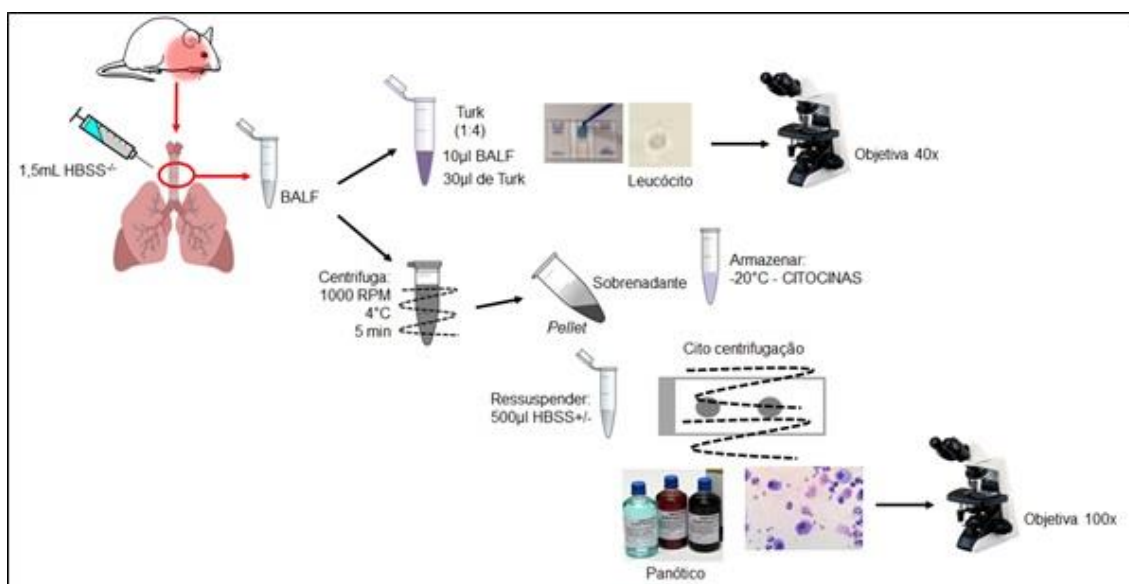
$$C_T = \frac{C_C}{C_{CH}} \cdot F_D = \frac{C_C}{4} \cdot 4 \cdot 10^4$$

Após a contagem das células totais ser realizada, o BALF foi centrifugado (centrífuga CR422, JONAM) em 1000 RPM a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e congelados à -20°C para posterior dosagem de citocinas.

As células do BALF foram ressuspensas em 500µL de HBSS^{-/-} gelado e homogeneizado, em seguida foi retirado 200 µL da suspensão celular que foi posteriormente centrifugado na citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab), o qual se baseia em três passos principais: a fixação das células na lâmina por ação de um fixador, um corante básico cora de azuis estruturas ácidas como o núcleo das células, e um corante ácido cora de rosa estruturas celulares básicas como o citoplasma, então esses contrastes de coloração celular proporcionam uma visualização e contagem diferencial de células realizada por microscopia óptica.

Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X), os leucócitos contados foram divididos em duas subpopulações: macrófagos e neutrófilos.

Figura 6 - Esquema representativo da contagem de células totais e diferenciais



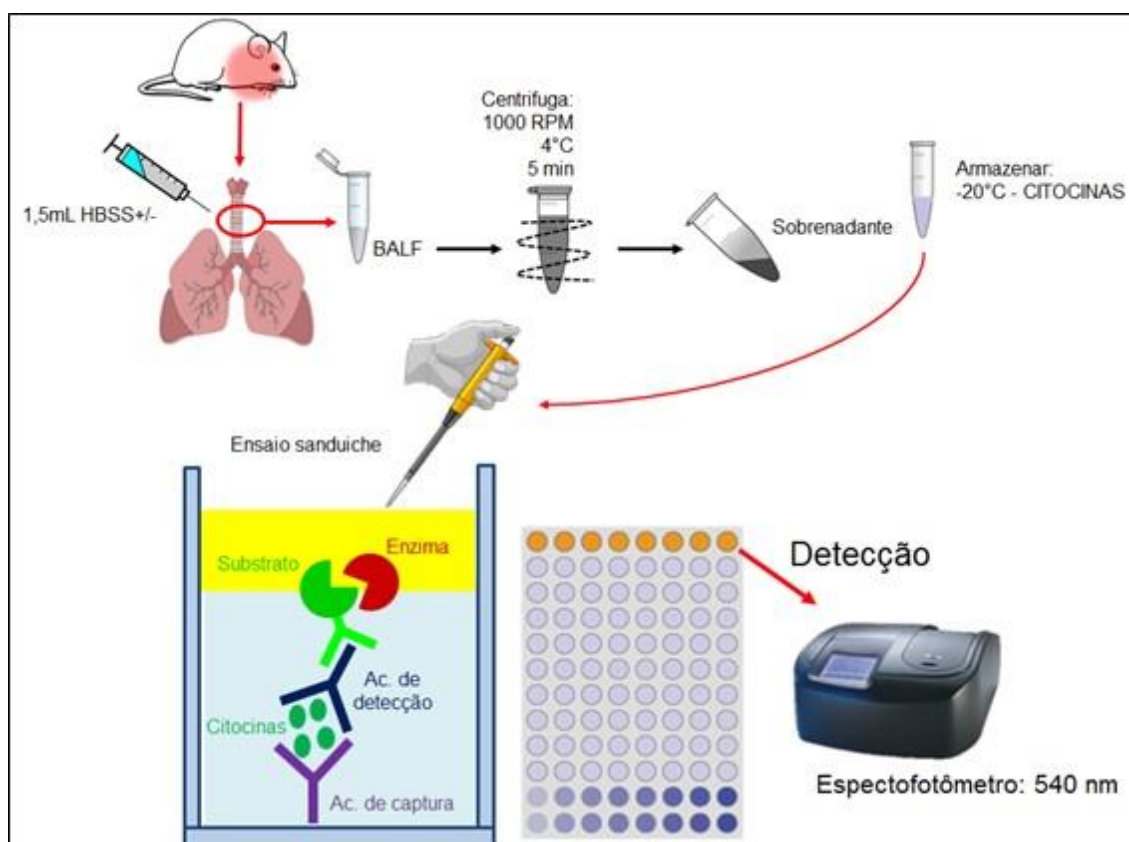
3.2.6 Quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α no BALF

O sobrenadante do BALF armazenado a -20°C foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α . Para isso, foi utilizado o Teste Imunoenzimático ELISA direto ou sanduíche, que se baseia nas interações antígeno-anticorpo. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante de cada citocina (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura específico para cada citocina, e incubadas por 18 h a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10 % de SFB) por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas e incubadas por uma hora. Posteriormente, foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionado. As placas foram incubadas por meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e a leitura realizada em leitor de microplaca (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

A figura 7 demonstra esquematicamente e de forma geral a quantificação das citocinas utilizando o ELISA sanduíche.

Figura 7 - Esquema representativo do ensaio imunoenzimático ELISA tipo sanduiche



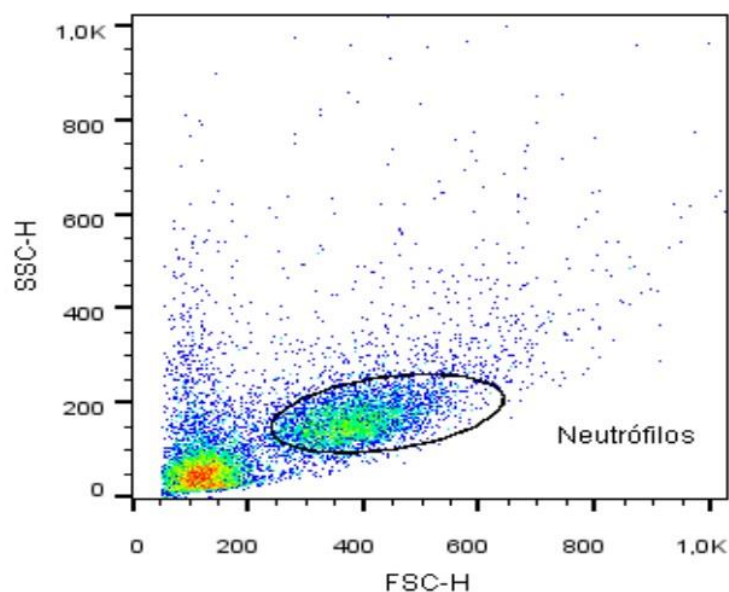
3.2.7 Avaliação do influxo de proteínas para a região broncoalveolar

A avaliação do influxo de proteínas foi realizada pela determinação dos níveis de proteínas totais no BALF. Para quantificar proteínas totais do lavado broncoalveolar foi utilizado o método do reativo do biureto que é uma solução de sulfato de cobre (CuSO_4) e tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$). Os íons cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino presentes no Reagente de Biureto reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura. De forma que quanto maior for a quantidade de proteínas no meio maior será a intensidade de cor da amostra. As amostras de BALF dos diferentes grupos experimentais foram colocadas na presença do reativo de biureto de acordo com as recomendações e procedimentos indicados pelo kit de determinação de proteínas totais da Biotécnica® e a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

3.2.8 Avaliação da expressão do TLR4

A avaliação da expressão do TLR4 foi realizada por citometria de fluxo, para tal as células obtidas a partir do fluído do lavado broncoalveolar foram ajustadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/tubo de citômetro. Em seguida, as células foram lavadas com PBS acrescido de soro fetal bovino (2%) por 12 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas. Posteriormente, as células foram incubadas, mediante as instruções do fabricante, com o anticorpo anti-TLR4. Após a incubação, as células foram lavadas e suspensas em PBS para leitura no citômetro. A medida da fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo, BD FACSCalibur™ com 4 cores, equipado com laser de íons de argônio de 15 mW em 488 nm e com laser diodo em 635 nm, resfriados a ar. A fluorescência foi detectada após passagem em filtro de 585 nm (FL2) e a população de neutrófilos foi selecionada para a geração do histograma para a expressão do TLR4 (figura 8). Os resultados obtidos foram analisados empregando-se o software Flowjo.

Figura 8 - Esquema de citometria de fluxo para análise da expressão do receptor TLR4



3.2.9 Avaliação da histopatologia pulmonar

Para avaliar as características histológicas pulmonar dos camundongos, ambos os lóbulos direito e esquerdo do pulmão de cada animal foram coletados 24 horas após o desafio com LPS. Para isso, após a eutanásia o tórax do animal foi aberto com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e então foi realizada uma perfusão cardíaca com administração de 20 mL de salina no coração, mais precisamente no ventrículo direito, no intuito de realizar uma lavagem do pulmão.

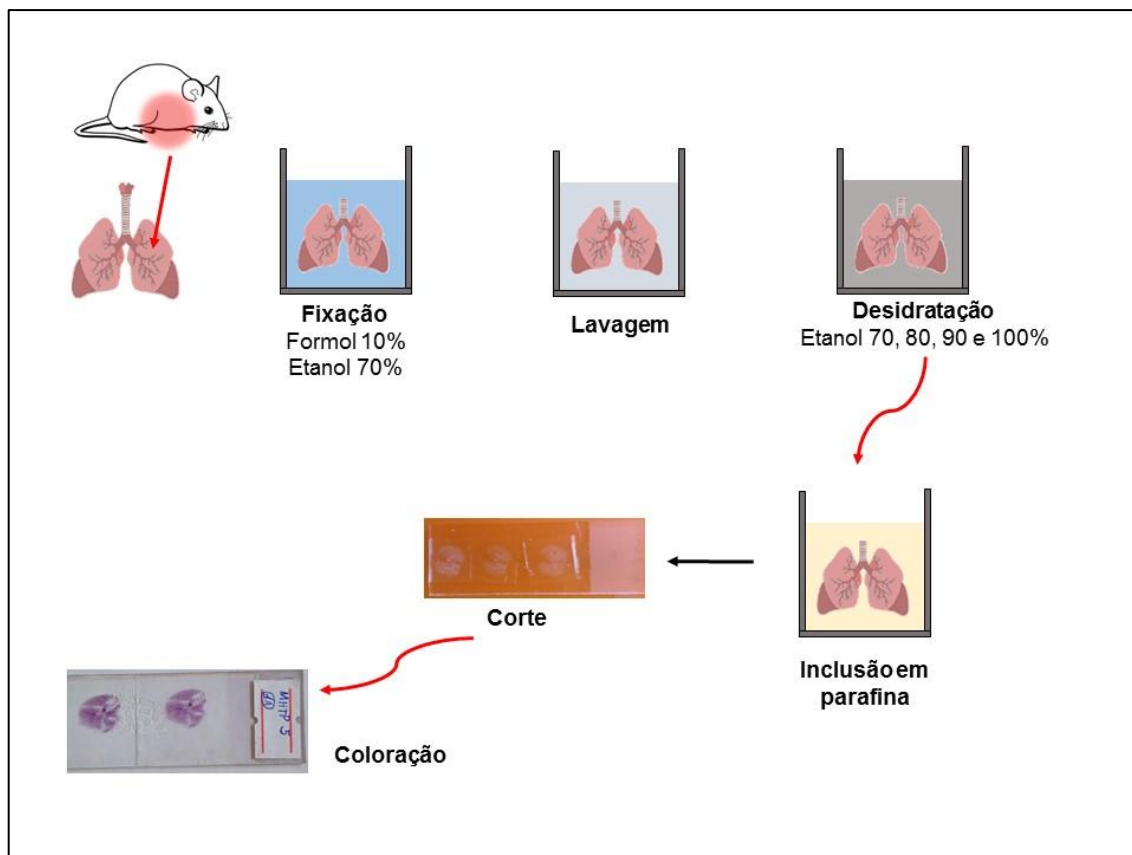
Para evitar a digestão do tecido por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por enzimas bacterianas, o órgão foi embebido em fixadores: formalina tamponada por 72 horas e logo após em álcool etílico 70% até o momento do corte histológico. Esse procedimento mantém a integridade do tecido, uma vez que os fixadores preservam a estrutura dos tecidos ao interagirem com os grupos amino das proteínas, por pontes de hidrogênio.

Os pulmões fixados foram inicialmente hidratados por imersões em água corrente durante 24 horas. Após esse procedimento as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%)

(1 hora em cada concentração). O processo de desidratação foi realizado porque a água presente nos tecidos não é miscível em substâncias apolares como a parafina utilizada para a inclusão, além disso, a graduação nas concentrações de álcool é imprescindível para que ocorra a desidratação homogênea dos tecidos, evitando que ocorram danos na estrutura tecidual durante o processamento da amostra.

Após a remoção do álcool, o tecido pulmonar passou duas horas imersos em xilol e em seguida em parafina líquida (parafina histológica- ERVIEGAS, São Paulo, SP), mantida nesse estado com o auxílio de dispensador de parafina a 56°C – ponto de fusão (CR422, JONAM) e posteriormente, o tecido foi transferido para o molde (fôrma histológica) contendo parafina líquida. Poucos minutos após ser colocada na fôrma, a parafina solidificou e obteve-se o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior. Os blocos de parafina assim formados, foram retirados das fôrmas e realizados cortes histológicos com espessura de 5µm, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300). Os cortes foram colocados em banho-maria (38 – 39°C), e depois retirados com o auxílio de lâminas que em seguida foram colocadas para secar a temperatura ambiente. Na Figura 8 está a representação simplificada e esquemática dos passos que foram realizados no processamento das amostras pulmonares.

Figura 9 - Esquema representativo do processamento histológico



3.2.9.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

Com os cortes aderidos às lâminas, estes foram então corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e depois foi realizado a montagem das lâminas, preparando-as para as análises histológicas. Como meio de montagem foi utilizado o bálsamo do Canadá. Cada grupo de animais teve seis lâminas coradas e analisadas.

A técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE) é clássica, básica e dicrômica possuindo dois corantes: hematoxilina, corante básico que cora componentes ácidos como os núcleos de todas as células, e eosina corante ácido que cora componentes básicos como o citoplasma de todas as células, proporcionando uma observação geral de todas as estruturas pulmonares. As lâminas foram inicialmente desparafinizadas por imersão no xilol durante 20 min. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de hidratação em álcool absoluto, durante 10 minutos.

As lâminas foram colocadas sucessivamente em álcool 90, 80 e 70% por 5 min e por fim, água destilada por 1 min. Então, foram imersas na hematoxilina por 30 segundos, mergulhadas rapidamente em água destilada, depois em água destilada novamente, com a finalidade de retirar o excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram colocadas no corante eosina, por 5 min, e em seguida desidratadas com álcool 80, 90% e absoluto 3 min em cada. O material histológico passou pelo banho em xilol por 10 min, onde o primeiro xilol foi por 5 min e o segundo xilol por mais 5 min. Após coloração foi colocado sobre o corte o bálsamo do Canadá e uma lamínula. Depois, com auxílio de uma pinça, foram retiradas as bolhas e a lamínula foi comprimida com firmeza sobre o corte para o espalhamento do bálsamo. Após 24h foram retirados os excessos de bálsamo para acabamento do preparo das lâminas. Nas lâminas coradas pela hematoxilina-eosina os núcleos das células são corados de azul escuro, os citoplasmas em rosa e em vermelho as hemácias.

Para análise morfológica dos cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE), foi criado um score histológico no qual uma pontuação de 0 – 4, foi atribuída de acordo com o grau das alterações histológicas evidenciadas. A pontuação foi estabelecida de acordo com os seguintes critérios:

- 0 – Ausência de alterações histológicas
- 1 – Grau leve: Alterações presentes em menos de 25% do campo microscópico
- 2 – Grau moderado: Alterações presentes em cerca de 25 a 49% do campo microscópico
- 3 – Grau acentuado: Alterações presentes em cerca de 50 a 75% do campo microscópico
- 4 – Grau muito acentuado: alterações presentes em mais 75% do campo microscópico

Os parâmetros analisados foram: infiltrado celular e edema intersticial (SU et al., 2004)

3.2.10 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o ANOVA “one-way” seguido do teste de Dunnett, onde foram considerados significativos os valores de $*p < 0.05$. Valores de $**p < 0.001$ e $***p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo Basal, e $#p < 0.05$; $##p < 0.001$ e $###p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo LPS.

Os dados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism© versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.) e os obtidos a partir de citometria de fluxo foram inicialmente processados pelo programa Flowing 2.5.1 e posteriormente também analisados pelo Graph Pad Prism.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

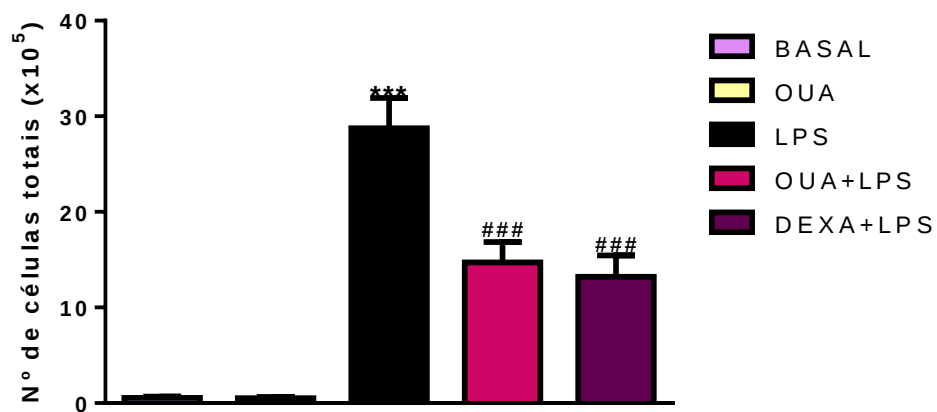
4.1 Efeito da ouabaína no número de células totais e diferenciais do BALF de camundongos com LPA experimental

Os animais do grupo LPS apresentaram aumento significativo ($p < 0,0001$) no número de leucócitos totais na região bronco-alveolar quando comparados aos animais do grupo BASAL, indicando que o desafio com LPS (i.n. 2,5 mg/Kg) promoveu a migração de células para essa região, confirmando a viabilidade do modelo experimental de lesão pulmonar aguda. O pré-tratamento via intraperitoneal com ouabaína na dose de 0,56 mg/Kg durante 3 dias consecutivos levou a redução de 48,84% dessa migração (Gráfico 1 A). Resultado semelhante foi observado no grupo tratado com dexametasona, onde o tratamento com essa droga padrão promoveu redução de 54,05% na migração celular induzida pela administração de LPS. Adicionalmente, os animais que foram tratados com ouabaína e não sofreram desafio com LPS (grupo OUA) demonstraram níveis celulares idênticos aos do grupo BASAL, indicando que ouabaína quando administrada na ausência de estímulo inflamatório não provoca alterações nesse parâmetro.

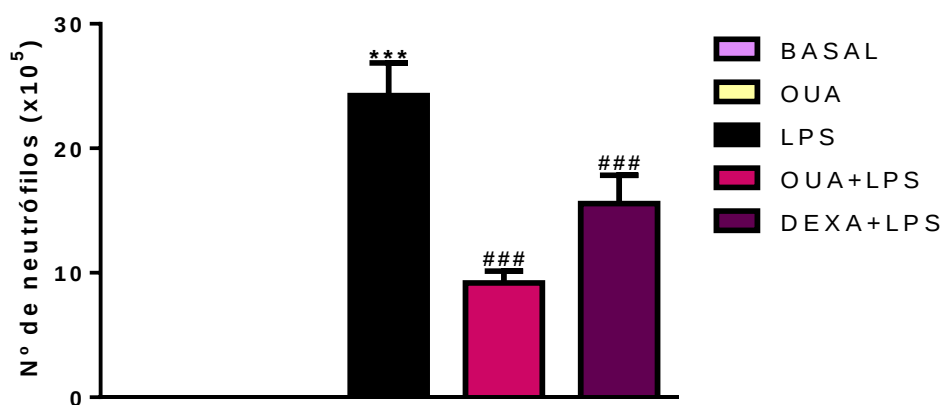
Em relação a análise das células diferenciais, foi observado que o número aumentado de leucócitos no BALF dos animais desafiados com LPS está relacionado à migração de monócitos ($p < 0,05$) e neutrófilos ($p < 0,0001$), e que a diminuição desse número após o tratamento com ouabaína é atribuída somente a inibição da migração de neutrófilos. Tendo em vista que, após o tratamento com ouabaína houve redução de 70,7 % ($p < 0,0001$) do número de neutrófilos no BALF dos animais (Gráfico 1 B), entretanto o número de macrófagos não foi alterado (Gráfico 1 C). Já o tratamento com dexametasona, promoveu a redução da migração celular de forma inespecífica, reduzindo tanto a migração de neutrófilos ($p < 0,0001$) como de monócitos ($p < 0,001$). O grupo OUA, que foi tratado com ouabaína e não foi desafiado com LPS apresentou níveis de macrófagos e neutrófilos iguais aos do grupo BASAL.

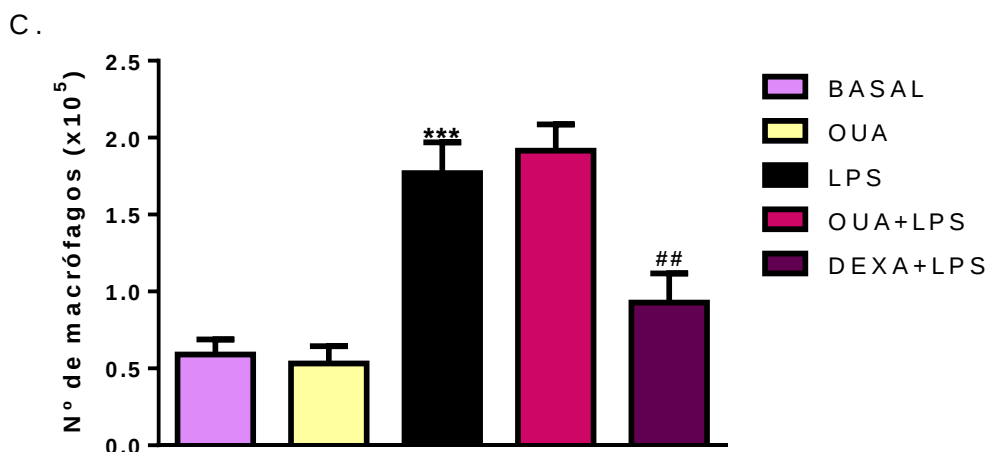
Gráfico 1 - Efeito do tratamento com ouabaína na migração de leucócitos totais e diferenciais para o espaço broncoalveolar na lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

A.



B.



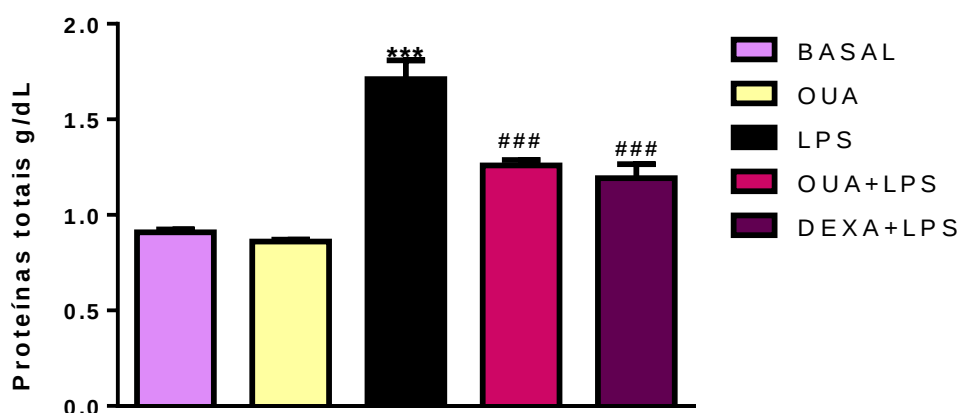


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Valores de $**p < 0.001$ e $***p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo Basal, e $\#p < 0.05$; $\##p < 0.001$ e $###p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prisma 5.0 e os gráficos são de um experimento representativo. (A) efeito do tratamento com ouabaína na migração de leucócitos totais para a região broncoalveolar. (B) efeito do tratamento com ouabaína na migração de neutrófilos para a região broncoalveolar. (C) efeito do tratamento com ouabaína na migração de macrófagos para a região broncoalveolar.

4.2 Efeito da ouabaína na permeabilidade vascular pulmonar

Para avaliar o efeito do tratamento com ouabaína sobre as alterações na permeabilidade vascular que ocorrem durante a LPA foi feita a determinação da concentração de proteínas totais no BALF dos animais dos diferentes grupos. Como demonstrado no gráfico 2, houve extravasamento significativo de proteínas para a região bronco-alveolar após a administração de LPS quando comparamos os animais desafiados com LPS aos não desafiados ($p < 0,0001$). Os tratamentos com ouabaína ou com dexametasona reduziram de forma eficaz ($p < 0,0001$) esse extravasamento proteico (redução de 26,32% e de 30,41%, respectivamente), indicando que houve considerável redução do edema pulmonar. Os animais do grupo OUA (tratados com ouabaína, mas não desafiados com LPS) demonstraram níveis proteicos basais.

Gráfico 2 - Efeito do tratamento com ouabaína no influxo de proteínas para a região bronco-alveolar e consequente formação do edema pulmonar



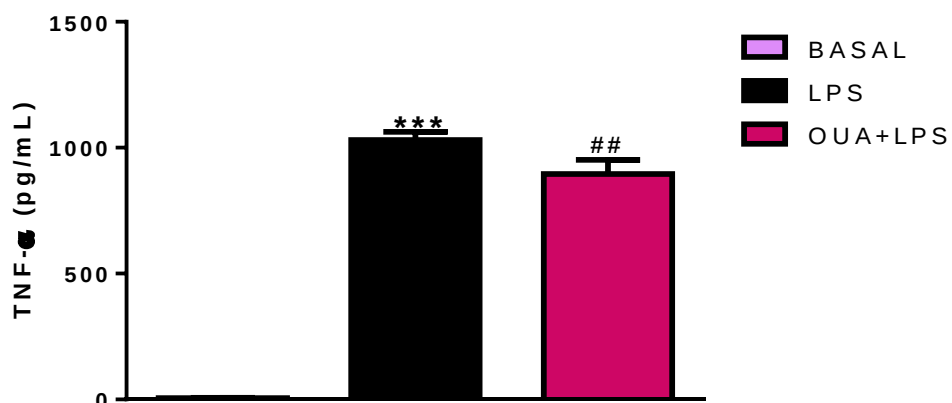
Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Valores de $**p < 0.001$ e $***p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo Basal, e $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.001$ e $^{\#\#\#}p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prisma 5.0 e os gráficos são de um experimento representativo.

4.2 Efeito da ouabaína na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6

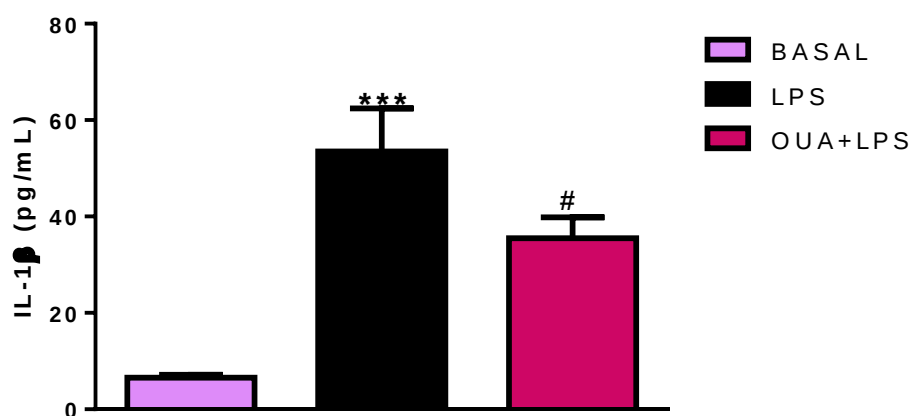
O grupo LPS apresentou níveis significativamente elevados ($p < 0,0001$) das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 no BALF, quando comparado ao grupo de animais saudáveis (BASAL). O tratamento com 0,56 mg/Kg de ouabaína por três dias consecutivos promoveu redução significativa (14,80%, 33,59% e 47,07% respectivamente) na produção desses mediadores inflamatórios induzida por LPS, como pode ser observado no gráfico 3 (A,B e C).

Gráfico 3 - Efeito do tratamento com ouabaína na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6

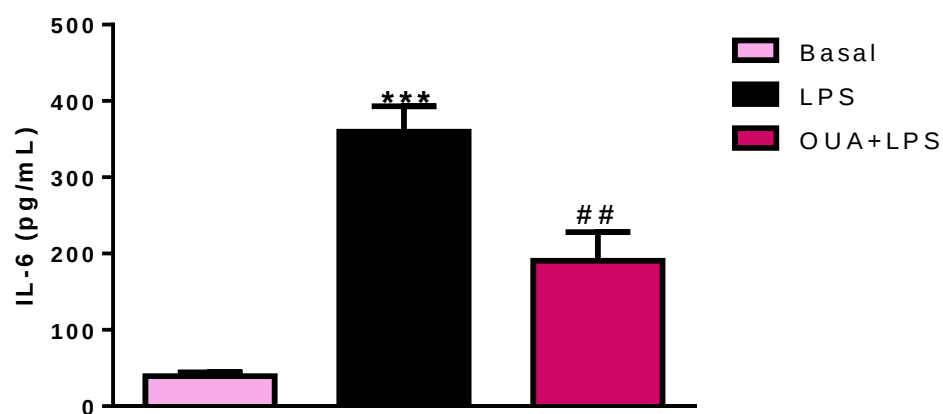
A.



B.



C.



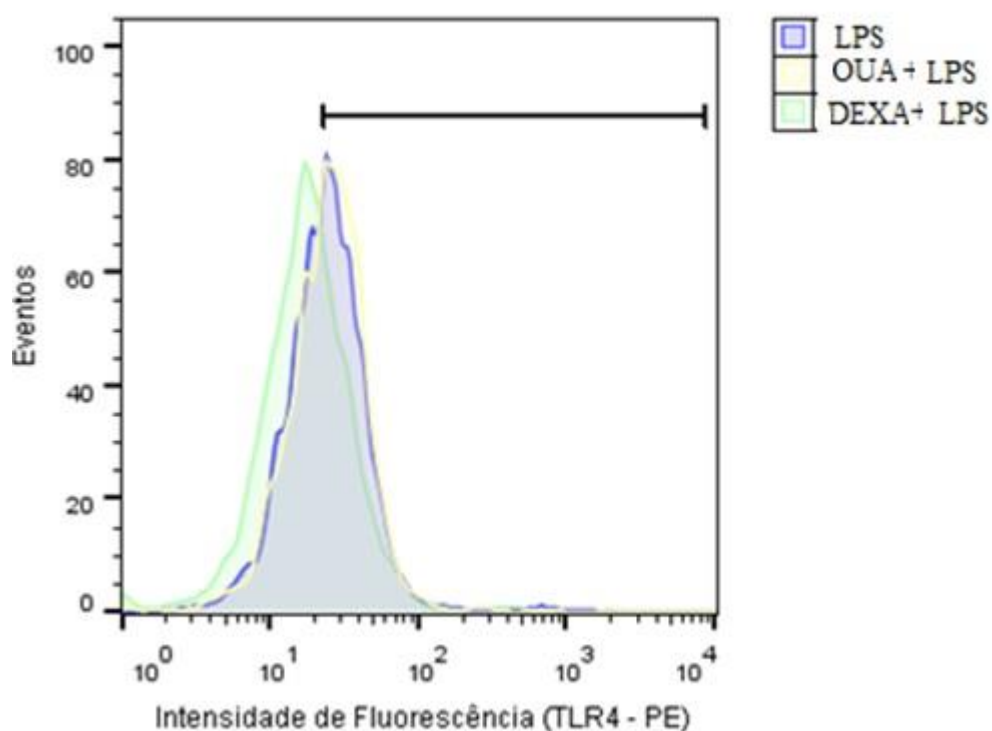
Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Valores de ** $p < 0.001$ e *** $p < 0.0001$ foram considerados significativos

quando comparados com o grupo Basal, e $^{\#}p < 0.05$; $^{##}p < 0.001$ e $^{###}p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prisma 5.0 e os gráficos são de um experimento representativo. A) efeito do tratamento com ouabaína na produção de TNF- α . (B) efeito do tratamento com ouabaína na produção de IL-1 β . (C) efeito do tratamento com ouabaína na produção de IL-6.

4.3 Efeito da ouabaína na expressão do TLR4

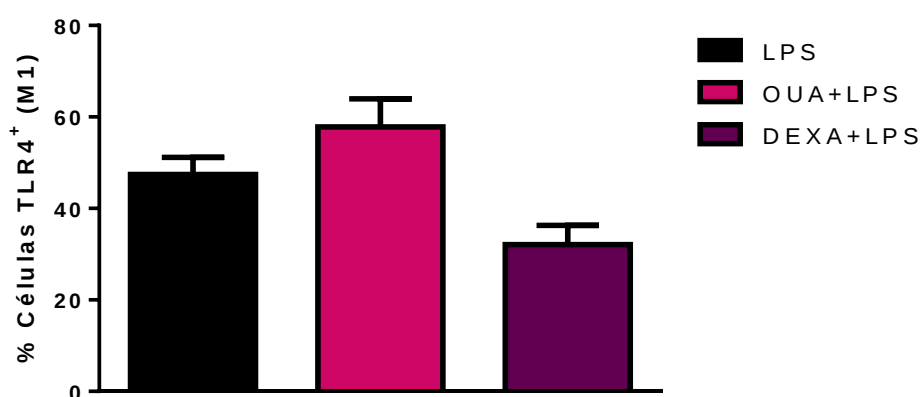
A fim de avaliar o mecanismo de ação pelo qual ouabaína diminui a resposta inflamatória na LPA experimental induzida por LPS, foi avaliado por citometria de fluxo o efeito do tratamento com ouabaína na expressão do receptor Toll- like 4. A figura 10 ilustra o histograma representativo utilizado para analisar a porcentagem da população de neutrófilos positivas para a expressão do TLR4. Os resultados representam a porcentagem de fluorescência da população de células dos animais tratados com ouabaína ou com dexametasona em relação as células dos animais não tratados. As porcentagens obtidas foram determinadas e como podemos observar no gráfico 4, o tratamento com ouabaína na dose de 0,56 mg/kg por 3 dias consecutivos ou com a droga padrão dexametasona (2 mg/Kg dose única) não alteraram a expressão deste receptor, indicando que o efeito de ouabaína é independente da regulação negativa do TLR4.

Figura 10 - Histograma representativo para a expressão do TLR4



O histograma representa o número de eventos em função da fluorescência do TLR4, as células analisadas são os neutrófilos. A região preenchida em cinza representa a autofluorescência das células; a região em azul representa as células dos animais desafiados com LPS; a região amarela representa as células dos animais tratados por três dias consecutivos com 0,56 mg/Kg de ouabaína e desafiados com LPS; a região verde representa as células dos animais tratados com dexametasona e desafiados com LPS. O histograma corresponde a um experimento representativo

Gráfico 4 - Efeito do tratamento com ouabaína na expressão do TLR4

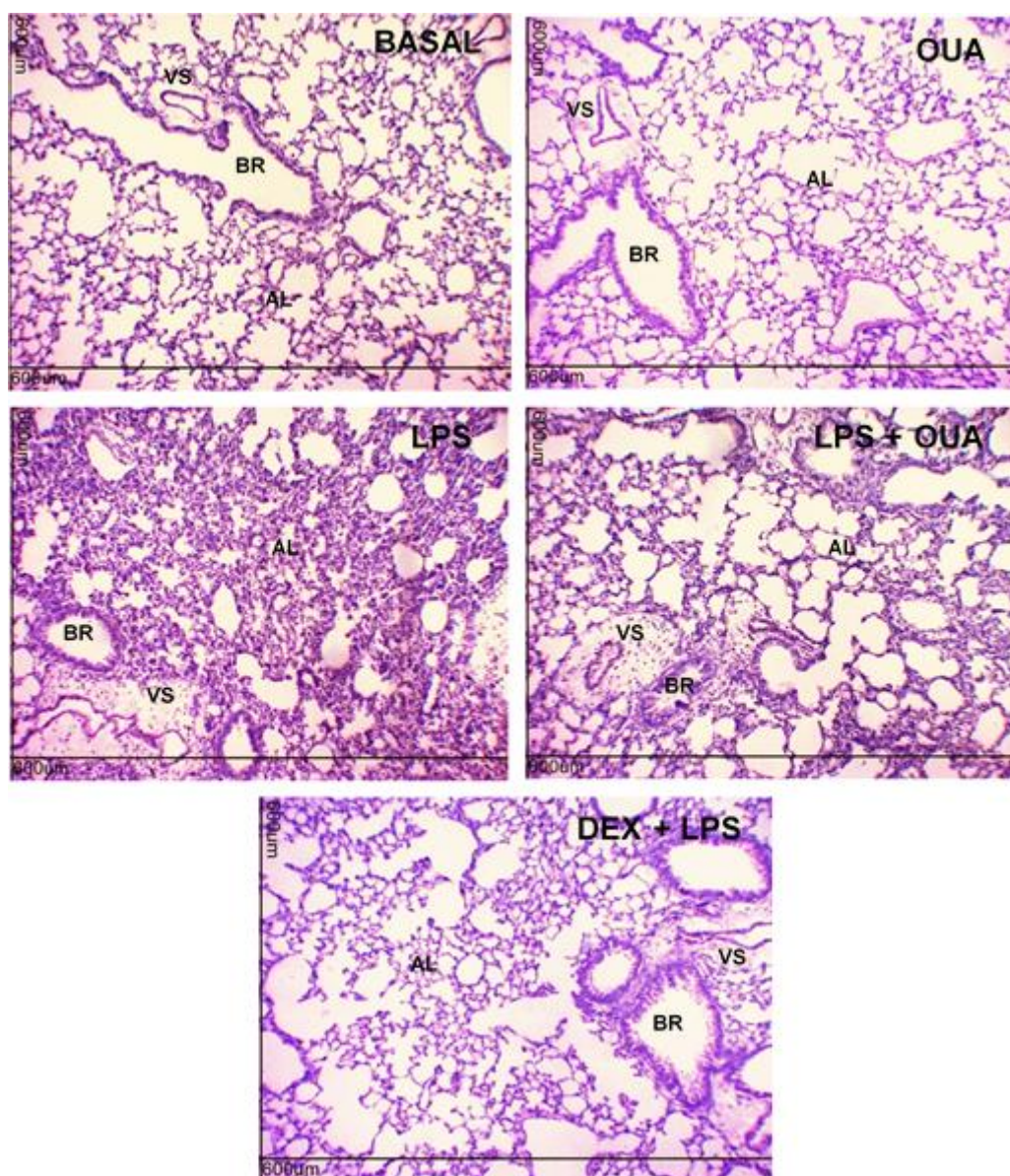


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Não foi observada diferença estatística entre os grupos.

4.4 Efeito da ouabaína na histopatologia pulmonar da lesão pulmonar aguda

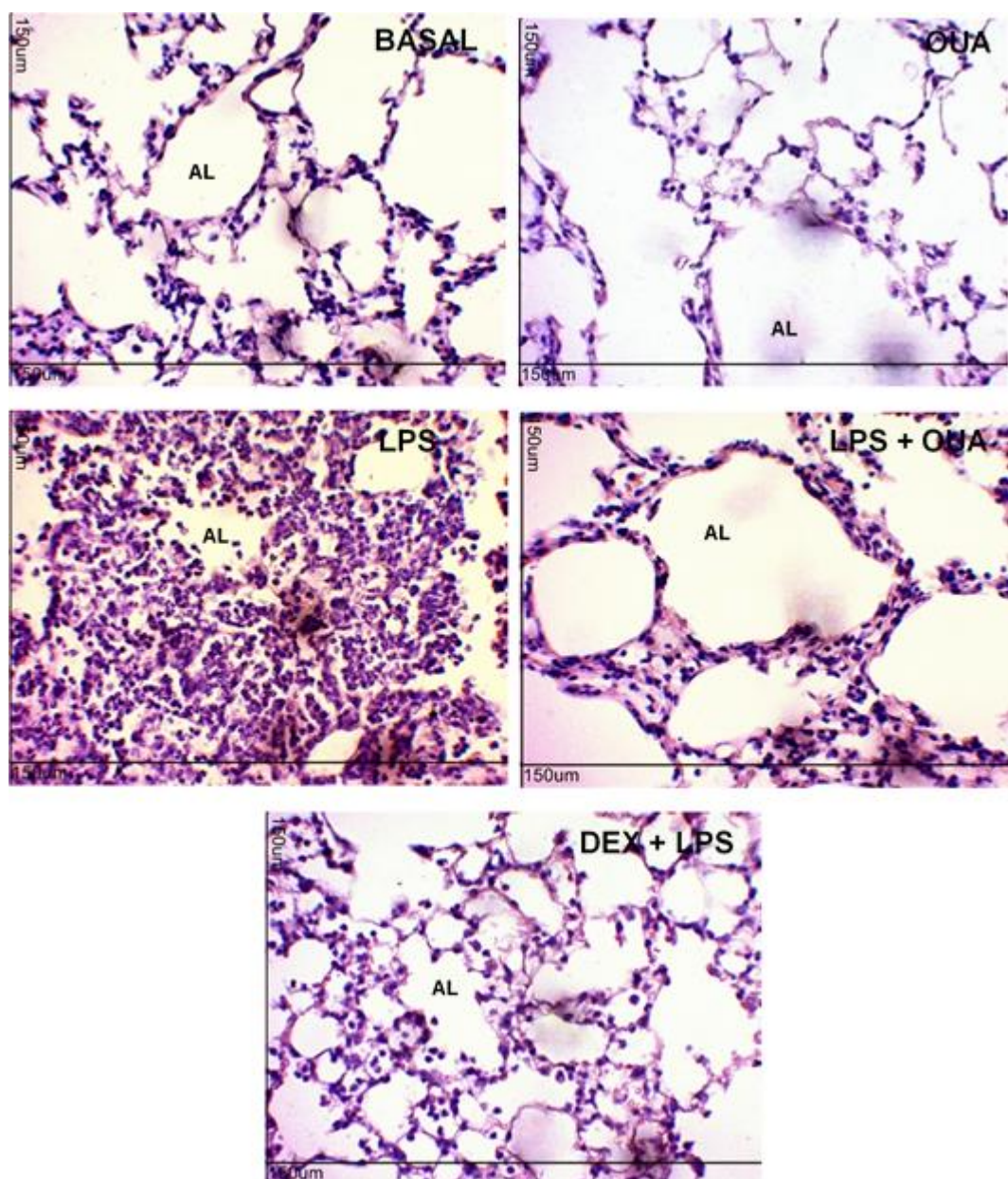
Para avaliar o papel da ouabaína nas alterações histopatológicas pulmonares da LPA induzida por LPS em camundongos, foi realizada a análise histológica de secções pulmonares obtidas a partir dos animais dos diferentes grupos experimentais. O gráfico 5 demonstra o “score” histológico realizado a partir das alterações morfológicas observadas nas figuras 11 e 12. Como pode ser observado, a avaliação histológica pulmonar mostrou intenso infiltrado de células polimorfonucleares e edema intersticial nos animais do grupo LPS em comparação aos animais do grupo BASAL, indicando que a administração intranasal de LPS desencadeou a lesão pulmonar aguda. A administração de ouabaína reduziu de forma significativa o infiltrado celular e o edema intersticial no espaço aéreo provocando uma melhora no aspecto histopatológico pulmonar dos animais tratados com ouabaína em comparação aos do grupo LPS. O tratamento com dexametasona promoveu redução eficaz de todos os parâmetros inflamatórios analisados e observados no grupo LPS. Adicionalmente o grupo OUA mostrou características histológicas idênticas ao grupo BASAL.

Figura 11 - Efeito do tratamento com ouabaína sobre as alterações morfológicas do pulmão de animais submetidos a LPA induzida por LPS (aumento 100x)



BASAL - apresenta aspecto histológico normal e histoarquitetura pulmonar preservada. OUA - o uso isolado de OUA não promoveu inflamação intersticial, infiltrado celular, formação de edema e nem espessamento da parede alveolar, indicando que o aspecto histológico normal foi mantido. LPS - dano alveolar difuso com aumento da permeabilidade da membrana alveolar observada por presença de inflamação intersticial, infiltrado celular, edema pulmonar e espessamento da parede alveolar promovendo colapso alveolar. LPS + OUA - promoveu diminuição da inflamação intersticial, do infiltrado celular, do edema pulmonar, regressão da espessura da parede alveolar promovendo diminuição do dano alveolar difuso e consequentemente do colapso alveolar. LPS+DEXA - promoveu diminuição da inflamação intersticial, do infiltrado celular, do edema pulmonar, regressão da espessura da parede alveolar promovendo diminuição do dano alveolar difuso e consequentemente do colapso alveolar. Coloração hematoxilina e eosina, ampliação 100x, barra de escala 50µm. **BR:** brônquio; **VS:** vaso sanguíneo; **AL:** alvéolo.

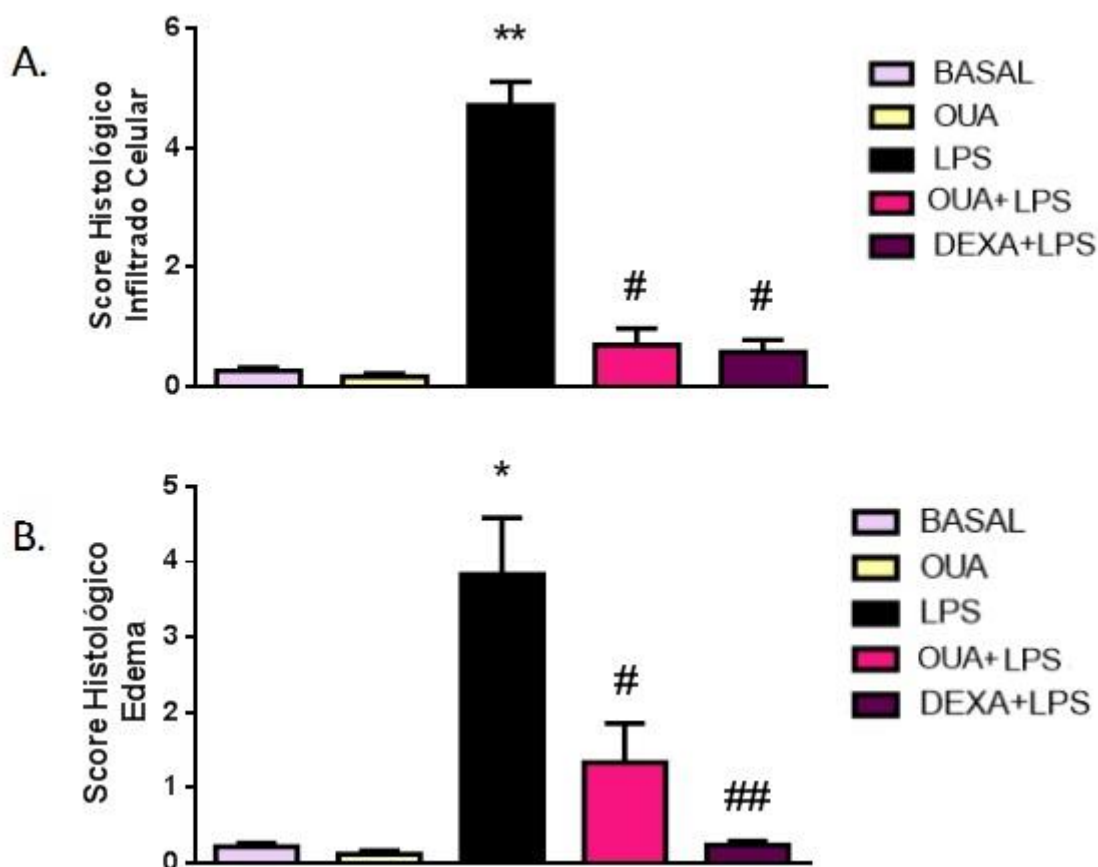
Figura 12 - Efeito do tratamento com ouabaína sobre as alterações morfológicas do pulmão de animais submetidos a LPA induzida por LPS (aumento 400x)



BASAL - apresenta aspecto histológico normal, histoarquitetura pulmonar preservada com compartimento epitelial, intersticial e endotelial preservados. OUA - o uso de OUA isolado não promove dano alveolar, infiltrado celular para o espaço intersticial e edema. LPS – dano alveolar difuso, aumento do fluxo de sangue nos capilares alveolares com vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular com aumento da migração de células já com presença de neutrófilos para o espaço intersticial e consequente instalação da inflamação intersticial, edema pulmonar e espessamento da parede alveolar promovendo colapso alveolar. LPS + OUA – promove redução do dano alveolar difuso pela diminuição da permeabilidade vascular ao reduzir o infiltrado celular com diminuição do número de neutrófilos para o espaço intersticial, diminuição do edema e consequente redução da inflamação intersticial promovendo a preservação dos compartimentos alveolares. DEX + LPS - promove redução do dano alveolar difuso pela diminuição da permeabilidade vascular ao reduzir o infiltrado celular com diminuição do número de neutrófilos para o espaço intersticial, diminuição do edema e consequente redução da inflamação intersticial promovendo a preservação dos

compartimentos alveolares. Coloração hematoxilina e eosina, ampliação 400x, barra de escala 150µm. **BR**: brônquio; **VS**: vaso sanguíneo; **AL**: alvéolo.

Gráfico 5 - Score histológico do efeito do tratamento com ouabaína sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Valores de $**p < 0.001$ e $***p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo Basal, e $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.001$ e $^{\#\#\#}p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prisma 5.0. (A) representa o score referente ao infiltrado celular e (B) representa o score referente ao edema pulmonar.



5. DISCUSSÃO

A ouabaína é um glicosídeo cardíaco endógeno que apresenta efeitos cardiológicos, hemodinâmicos e renais bem estabelecidos. Adicionalmente, seu papel no sistema imunológico vem sendo determinado (ECHEVARRIA-LIMA e RUMJANEK, 2006). Trabalhos do nosso grupo demonstram que o tratamento de animais com ouabaína na dose de 0,56 mg/Kg promove modulação de diversos parâmetros inflamatórios em vários modelos de inflamação (DE VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2012; LEITE et al., 2015)

A inflamação é um componente significativo de várias patologias a exemplo da lesão pulmonar aguda (LPA) que é uma doença inflamatória de incidência mundial e potencialmente fatal, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Há evidências de que a LPA cause cerca de 74.500 mortes por ano, acometendo principalmente pacientes em unidades de terapia intensiva (TSUSHIMA et al., 2009). Essa doença possui diversas etiologias e vários fatores predisponentes estão associados ao seu desenvolvimento (BUTT et al., 2016). A patogênese da LPA ainda não é bem estabelecida e atualmente não há tratamento farmacológico eficaz para a LPA por si só. (FLORI et al., 2005; WHEELER e BERNARD, 2007; RAGHAVENDRAN et al., 2008; WALKEY et al., 2012). Nesse contexto, a busca por substâncias capazes de modular o processo inflamatório durante LPA é bastante promissora e diversos modelos experimentais tem sido propostos para melhor compreender a patogênese da doença (MATUTE-BELO, 2008).

A administração de lipossacarídeo bacteriano (LPS) em murinos provoca sintomas que se assemelham a LPA em humanos, e tem se destacado como uma importante estratégia para explorar a patogênese e descobrir novas formas de tratamento para essa síndrome clínica (MATUTE-BELLO et al., 2008). Diante disso, o presente trabalho propõe avaliar a ação imunomoduladora de ouabaína em um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

Inicialmente foi avaliado o efeito da ouabaína na migração de leucócitos para o pulmão, tendo em vista que na LPA o recrutamento de leucócitos, em especial dos neutrófilos, desempenha papel crítico na patogênese e no desenvolvimento da doença. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas e sua ativação tem papel central no início de uma resposta inflamatória aguda. A liberação de

produtos tóxicos derivados de neutrófilos como ROS, proteases e metabólitos do ácido araquidônico são responsáveis pelos danos teciduais característicos da LPA e a persistência dessas células no pulmão tem sido associada a um prognóstico desfavorável (GROMMES e SOEHNLEIN, 2011).

Nesse estudo, constatamos que a administração de LPS por instilação nasal induziu extensa migração de células para a região bronco-alveolar e que o tratamento com ouabaína promoveu redução da migração dessas células inflamatórias, de forma mais específica, redução da migração de neutrófilos. Indicando possível ação protetora da ouabaína na LPA.

A inibição da migração de neutrófilos é um aspecto importante para o controle e resolução da LPA tendo em vista que essas células foram reconhecidas como efetores imunológicos responsáveis pelo desenvolvimento dessa patologia (ABRAHAM et al., 2000). Foi constatado que durante a lesão pulmonar aguda, neutrófilos pulmonares possuem ativação do fator de transcrição NF- κ B aumentada em relação a neutrófilos sanguíneos, o que está diretamente relacionado a produção exacerbada de diversos mediadores imunomoduladores que potencializam a resposta inflamatória no espaço bronco-alveolar (XING et al., 1994; CASSATELLA, 1995; ABRAHAM, et al, 1995; SHENKAR e ABRAHAM, 1999).

Diversos estudos demonstram que a inibição da migração de neutrófilos nos pulmões reduz a severidade da lesão pulmonar aguda em diferentes modelos experimentais (YOSHIOKA, 2010; CAMPANHOLLE, 2010; ZHAO et al., 2014). Adicionalmente, estudos com camundongos que sofreram neutropenia induzida por ciclofosfamida ou por anticorpos anti-neutrófilos indicam que a depleção de neutrófilos protege contra o desenvolvimento da lesão pulmonar aguda induzida por endotoxinas ou por outros insultos (ABRAHAM et al., 2000). A inibição da migração de neutrófilos, pela utilização de anticorpos anti-moléculas de adesão também tem demonstrado diminuir de forma significativa os eventos fisiopatológicos da LPA (KAMOCHI et al., 1999). Os benefícios das intervenções na migração dos neutrófilos para a resolução da LPA são inegáveis e têm sido atribuídos principalmente a inibição das suas funções efectoras, em especial a liberação de intermediários reativos de oxigênio e enzimas proteolíticas pelos quais os pulmões são diretamente danificados.

O efeito da ouabaína na redução da migração de leucócitos já foi documentado em trabalhos anteriores, corroborando os nossos resultados. Em modelo de peritonite induzida por zimosam, foi constatado que o tratamento com

ouabaína por três dias consecutivos, reduz a maciça migração de neutrófilos induzida pela administração desse agente flogístico e que esse evento é independente de morte celular (LEITE et al., 2015), o mesmo foi observado em modelos de peritonite induzida por Concanavalina A (LEITE et al., 2011) e por *Leishmania amazonensis*, onde o tratamento com ouabaína diminuiu a migração de neutrófilos nos períodos de 24 e 48 horas após a administração intraperitoneal de formas infectantes do protozoário (JACOB et al., 2013). Além disso, estudos preliminares *in vitro* utilizando um modelo de *transwell* indicam que células da cavidade peritoneal de camundongos tratados com ouabaína migram menos que células de animais que não receberam tratamento (LEITE et al., 2015).

Nos nossos resultados, foi também observado que o tratamento com ouabaína não altera a migração de monócitos, sugerindo que seu efeito na migração celular durante a LPA é específico para neutrófilos. Diferente da dexametasona, droga padrão usada nesse estudo, que reduz a migração de leucócitos de forma inespecífica inibindo tanto a migração de neutrófilos, como de monócitos. Esse resultado é promissor, tendo em vista que alguns estudos têm mostrado os macrófagos alveolares como células determinantes para o processo de resolução da inflamação pulmonar e reparação tecidual (AGGARWAL et al., 2014).

No pulmão e no espaço alveolar, a inflamação está intimamente ligada ao fenótipo e função de macrófagos, um processo bem descrito na fase inicial da LPA e que vem sendo cada vez mais reconhecido durante a resolução desta doença (HEROLD et al., 2011). Macrófagos M1 são células pró-inflamatórias, que durante a LPA são ativados por LPS, ou por outras moléculas, e produzem mediadores pró-inflamatórios a exemplo de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 que iniciam o processo inflamatório nos alvéolos pulmonares estimulando eventos vasculares e celulares que favorecem o recrutamento de neutrófilos. Dependendo das condições do microambiente esses macrófagos M1 se reprogramam em direção a um estado de ativação diferente do inicial e passam a ser chamados de M2. Essas células, em contraste as células M1, coordenam uma série de respostas a fim de regular a inflamação e favorecer a resolução e reparação dos danos pulmonares característicos da LPA. Essas respostas incluem a secreção de citocinas reguladoras e reparadoras, como IL-10 e TGF- β respectivamente. Processos chave mediados pelos macrófagos M2 são representados pela inibição do recrutamento de células inflamatórias, indução da apoptose de neutrófilos acumulados nos pulmões e secreção de fatores de

crescimento que promovem reparação do epitélio alveolar (LAWRENCE e NATOLI, 2011; HEROLD et al., 2011; MARTINEZ e GORDON, 2014; DA SILVA, M. D. et al., 2015).

Nesse contexto, a manutenção de macrófagos na região bronco-alveolar, embora essas células estejam relacionadas aos eventos iniciais da LPA, pode ser importante para o processo de resolução e reparação da doença (AGGARWAL et al., 2014). Estudos realizados utilizando o BALF de humanos com LPA demonstraram que o aumento do número de macrófagos alveolares de fenótipo celular maduro (M2) foram associados a resultados favoráveis, sendo células essenciais para o retorno do organismo a homeostase (STEINBERG et al., 1994; ROSSEAU et al., 2000).

De forma semelhante ao nosso resultado, em um modelo *in vivo* de peritonite induzida por zimosan a ouabaína também não alterou a migração de monócitos para o sítio inflamado, atuando especificamente na migração de neutrófilos (LEITE et al., 2011). Adicionalmente, vários estudos *in vitro* têm demonstrado diversas ações da ouabaína na modulação de monócitos e macrófagos. Nessas células, o tratamento com ouabaína induziu o aumento do cálcio intracelular, a expressão de moléculas de superfície como CD69, CD86 e CD80, além de aumentar a capacidade endocítica e estimular a produção de citocinas (TEIXEIRA e RUMJANEK, 2014). Além disso, ouabaína regulou negativamente a expressão de mCD14, uma molécula de superfície envolvida na fagocitose e na resposta dos macrófagos contra patógenos derivados de bactérias e de fungos (VALENTE et al., 2009) e inibiu a ativação de monócitos, impedindo o aumento de tamanho dessas células e a aparência da subpopulação pró-inflamatória de macrófagos (VALENTE et al., 2012).

A inflamação ocorrida durante a lesão pulmonar aguda provoca alterações no equilíbrio dos fluídos pulmonares, promovendo o aumento da permeabilidade e edema pulmonar grave, uma das principais características fisiopatológicas da LPA (WARE e MATTHAY, 2005). O edema pulmonar tem elevado teor de proteínas (BACHOFEN e WEIBE 1977), tendo em vista que a restrição da passagem de proteínas do plasma para o espaço bronco-alveolar é comprometida devido as lesões nas membranas dos capilares pulmonares e nos epitélios alveolares tornando-os mais permeáveis. Além disso, a lesão no epitélio alveolar compromete a capacidade desse epitélio de remover os fluídos dos espaços aéreos (PREWITT et al., 1981; WARE e MATTHAY., 2001).

Nesse estudo, a administração de LPS via intranasal promoveu extenso extravasamento proteico para a região bronco-alveolar e os animais tratados com

ouabaína tiveram concentração de proteínas no fluido do lavado bronco-alveolar diminuída de maneira semelhante aos animais tratados com dexametasona. Esses resultados indicam que o tratamento com ouabaína pode efetivamente atenuar o edema pulmonar na LPA.

A ação anti-edematogênica de ouabaína já foi demonstrada em modelos de inflamação aguda, onde a ouabaína promoveu redução do edema de pata induzida pela carragenina, pela prostaglandina E₂, pela bradicinina, e pelo composto 48/80 (VASCONCELOS, 2011). Além disso, foi demonstrado que ouabaína reverte as alterações na permeabilidade vascular induzidas por zymosam reduzindo o exsudato proteico no local inflamado (LEITE et al., 2011; LEITE et al., 2015).

Durante a LPA inúmeros mediadores inflamatórios são responsáveis por aumentar a permeabilidade vascular e manter sustentado o recrutamento de neutrófilos (YAMASAWA et al., 1999; GOODMAN et al., 2003; FANG et al., 2015). Evidências de vários estudos clínicos indicam que uma rede complexa de citocinas inflamatórias e quimiocinas desempenham um papel importante na geração, amplificação e perpetuação da lesão pulmonar aguda. Já é bem estabelecido que a IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α são mediadores chaves da destruição tecidual e da infiltração leucocitária no tecido pulmonar durante a LPA induzida por LPS, desempenhando papel crucial no desenvolvimento da doença (GOODMAN et al., 1996; ZHAO et al., 2014).

A IL-1 β tem ganhado posição de destaque na cascata inflamatória que desencadeia a LPA, tendo em vista que essa citocina além de outros efeitos, pode estimular a produção de uma variedade de mediadores quimiotáticos, tais como IL-8 (BAGGIOLINI et al., 1989), fator ativador neutrofílico derivado do epitélio (ENA-78) (WALZ et al., 1991) e peptídeo quimiotático de monócitos (MCP-1) (STANDIFORD et al., 1991). Além disso, diversos investigadores têm identificado a presença desta citocina no BALF de pacientes com LPA (SUTER et al., 1992; BUTT et al., 2016). O TNF- α também foi quantificado no BALF de pacientes com a doença e foi constatado que há relação direta entre a concentração desta citocina e o grau de hipoxemia (PARK et al., 2001). Adicionalmente, níveis persistentemente elevados dessas citocinas e da IL-6 em pacientes com LPA são fortes indicativos de predisposição a mortalidade (MEDURI et al., 1995; MARSHALL et al., 2002). Nesse contexto, a modulação negativa da produção dessas citocinas é um ponto importante no controle da LPA.

Nesse estudo, foi observado que a administração de LPS induziu aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no BALF dos animais, e o tratamento com ouabaína promoveu redução da secreção dessas citocinas pró-inflamatórias, indicando que o efeito protetor de ouabaína na lesão pulmonar aguda induzida por LPS pode ser atribuído a inibição dos eventos desencadeados por esses mediadores. Dessa forma, o mecanismo de ação da ouabaína na proteção contra a LPA pode estar relacionado com a redução na ativação de vias de transdução celular envolvidas na produção dessas citocinas.

O efeito protetor de ouabaína na LPA ainda não foi documentado em trabalhos anteriores, entretanto diversos estudos mostram as ações de ouabaína frente a produção de mediadores inflamatórios. Em 1997, Matsumori e colegas mostraram que células do sangue periférico (PBMC) quando tratadas com ouabaína tinham a produção de IL-1 β , TNF- α e IL-6 estimuladas. Entretanto, quando essas células eram submetidas a um estímulo inflamatório (LPS) a produção dessas citocinas era diminuída. Adicionalmente, no mesmo trabalho foi observado que *in vivo* o tratamento com ouabaína diminuía a letalidade provocada pela administração de LPS em animais e diminuía a produção de IL-6 e TNF- α corroborando os nossos resultados.

Em modelo de peritonite induzida por zimosan o tratamento com ouabaína diminuiu os níveis de TNF- α e de IL-1 β e não alterou a produção de IL-6 e de IL-10, citocina anti-inflamatória (LEITE et al., 2012). Resultado semelhante foi observado em modelo de leishmaniose experimental, onde o tratamento com ouabaína também foi capaz de diminuir a produção de TNF- α além de diminuir a produção de INF- γ , citocina responsável pela ativação clássica de macrófagos (JACOB et al., 2012). Em trabalho mais recente foi evidenciada a ação do tratamento com ouabaína em monócitos humanos, e foi constatado que essas células quando tratadas *in vitro* com ouabaína tem produção de IL-1 β , TNF- α e IL-10 estimuladas (TEIXEIRA e RUMJANEK, 2014).

O efeito de ouabaína na redução da produção de citocinas inflamatórias parece estar relacionado a modulação negativa de vias de transdução celular que quando ativadas culminam na produção desses mediadores, tendo em vista que, já foi relatado que digitálicos incluindo proscillaridina A, digitoxina, digoxina, lanatosideo C e ouabaína inibem a via de sinalização do NF- κ B, uma das principais vias relacionadas a produção de citocinas inflamatórias (SHAH et al., 2011; LEITE et al., 2015). Além disso, ouabaína também promove a redução da ativação da p38, uma

MAPK envolvida na cascata inflamatória (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008; LEITE et al., 2015).

Na LPA a migração de neutrófilos é iniciada por ativação de receptores de reconhecimento de padrões moleculares, que ao serem ativados desencadeiam cascatas de sinalização intracelular promovendo a produção de quimiocinas (IL-8/CXCL1), citocinas (IL-6, TNF- α , IL-1 β), aminas vasoativas e mediadores lipídicos, que em conjunto induzem alterações vasculares e celulares favorecendo a transmigração dessas células (CAMPBELL et al., 2014). Após o desafio com LPS, os receptores semelhantes a toll (TLRs) iniciam uma série de cascatas intracelulares que resultam na superprodução de mediadores importantes na manutenção da LPA (XIE et al., 2012). O efeito do LPS é mediado principalmente pela ativação do receptor TLR4 e a ativação desse receptor, faz com que o NF- κ B seja ativado permitindo a rápida produção de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de células inflamatórias para o parênquima pulmonar (ZHAO et al., 2014).

Diante disso, a fim de avaliar o mecanismo pelo qual ouabaína diminui a produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi investigado se o tratamento com esse glicosídeo altera a expressão do TLR4 e constatamos que o tratamento intraperitoneal com ouabaína na dose de 0,56 mg/kg por três dias consecutivos não altera a expressão desse receptor. O mesmo foi observado com a droga padrão dexametasona, indicando que o efeito protetor de ouabaína na LPA induzida por LPS é independente da modulação negativa da expressão de toll-like 4.

Por fim, avaliou-se o efeito de ouabaína nas alterações histopatológicas características da LPA, tendo em vista que a avaliação histopatológica é um ponto determinante para indicar a ação imunomoduladora de drogas na LPA induzida por LPS (MATUTE-BELO, 2008). Foi constatado que o tratamento com ouabaína reduz todo o processo de inflamação intersticial provocado pela administração de LPS, promovendo regressão da espessura da parede alveolar, do dano alveolar difuso e do colapso alveolar. O score inflamatório obtido mostra que a ouabaína foi capaz de reduzir de maneira marcante o infiltrado celular na região bronco-alveolar e o edema intersticial, corroborando com nossos resultados anteriores.

A redução dos parâmetros histopatológicos da LPA pela ouabaína pode ser atribuída a capacidade desse glicosídeo de modular negativamente a

liberação de mediadores inflamatórios essenciais para o processo de migração celular pela inibição de vias inflamatórias como a do NF- κ B. Além disso, seu efeito inibitório na transmigração de neutrófilos para o sítio inflamado pode estar relacionado a interferência na via de sinalização da IL-8, visto que já foi constatado que a ouabaína interfere no processo de reciclagem dos receptores dessa quimiocina (RAY; SAMANTA, 1997).

Diante disso, podemos sugerir que apesar da lesão pulmonar aguda ser um modelo de inflamação bastante agressivo, a ação imunomoduladora de ouabaína se estende a ele. Nesse modelo, ouabaína modula negativamente a resposta inflamatória induzida pelo LPS através da inibição da migração de neutrófilos para a região bronco-alveolar, diminuição do influxo de proteínas e do edema e diminuição da produção dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-6. Adicionalmente, ouabaína inibiu alterações histopatológicas características da LPA incluindo infiltrado neutrofílico e edema intersticial. Todos esses eventos se mostraram independentes da modulação da expressão do receptor do tipo toll 4.



6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo, demonstram que ouabaína modula negativamente o processo inflamatório característico da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

Essa atividade imunomoduladora independe da expressão de TLR4 e está relacionada a diminuição da migração de neutrófilos para a região bronco-alveolar e diminuição do exsudato proteico. Assim como, redução da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 e redução dos aspectos histopatológicos característicos da LPA.



REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Edward *et al.* Contribution of tumor necrosis factor-alpha to pulmonary cytokine expression and lung injury after hemorrhage and resuscitation. **Critical care medicine**, v. 23, n. 8, p. 1319-26, 1995. Disponível em: < http://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/1995/08000/Contribution_of_tumor_necrosis_factor_alpha_to.4.aspx >. Acesso em: 30 ago. 2016.

ABRAHAM, Edward *et al.* Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 6, p. L1137-45, 2000. Disponível em: < <http://ajplung.physiology.org/content/ajplung/279/6/L1137.full.pdf> >. Acesso em: 01 ago. 2016.

AGGARWAL, N. R.; KING, L. S.; D'ALESSIO, F. R. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 8, p. L709-25, 2014. Disponível em: < <http://ajplung.physiology.org/content/306/8/L709> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867406001905> >. Acesso em: 22 jul. 2016.

AMODEO, Dionisio A. *et al.* Cognitive flexibility impairment and reduced frontal cortex BDNF expression in the ouabain model of mania. **Neuroscience**, (no prelo) jun. 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.058> >. Acesso em: 4 set. 2016.

ANDERSON, W. R.; THIELEN, K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. **Ultrastructural pathology**, v. 16, n. 6, p. 615-28, 1992. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/01913129209023751> >. Acesso em: 21 ago. 2016.

AYDEMIR-KOKSOY, A.; ABRAMOWITZ, J.; ALLEN, J. C. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 46605-11, dez. 2001. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/276/49/46605.short> >. Acesso em: 4 set. 2016.

BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. **Clinics in chest medicine**, v. 3, n. 1, p. 35, 1982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7075161> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Alterations of the Gas Exchange Apparatus in Adult Respiratory Insufficiency Associated with Septicemia. **American Review of Respiratory Disease**, v. 116, n. 4, p. 589-615, 1977. Disponível em < <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/arrd.1977.116.4.589> >. Acesso em: 22 ago. 2016.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 4, p. 1045, 1989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC329758/> > Acesso em: 10 set. 2016.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. **Nature clinical practice Nephrology**, v. 4, n. 7, p. 378-92, jul. 2008. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrneph/journal/v4/n7/full/ncpneph0848.html> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

BARWE, Sonali P. *et al.* Novel role for Na, K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 3, p. 1082-94, mar. 2005. Disponível em: < <http://www.molbiolcell.org/content/16/3/1082.short> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

BAUER, Natali *et al.* Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs Effects of β -Blockade and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 1024-8, maio 2005. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/content/45/5/1024.short> >. Acesso em: 30 ago. 2016.

BLAUSTEIN, Mordecai P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 264, n. 6, p. C1367-87, jun. 1993. Disponível em: < <http://ajpcell.physiology.org/content/264/6/C1367.short> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

BRODIE, Chaya *et al.* Ouabain induces inhibition of the progression phase in human T-cell proliferation. **Journal of cellular physiology**, v. 165, n. 2, p. 246-53, nov. 1995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1041650205> >. Acesso em: 7 set. 2016.

BROZ, P.; MONACK, D. M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 8, p. 551-65, 2013. Disponível em: < <http://www.nature.com/nri/journal/v13/n8/abs/nri3479.html> >. Acesso em: 22 jul. 2016.

BUCKALEW, Vardaman M. Endogenous digitalis-like factors: an overview of the history. **Frontiers in endocrinology**, v. 6, art. 49, 9 p. abr. 2015. Disponível em: < <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2015.00049> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 140, n. 4, p. 345-50, 2016. Disponível em: < <http://www.archivesofpathology.org/doi/abs/10.5858/arpa.2015-0519-RA> >. Acesso em: 25 ago. 2016.

CAMPANHOLLE, G. *et al.* Lung inflammation is induced by renal ischemia and reperfusion injury as part of the systemic inflammatory syndrome. **Inflammation research**, v. 59, n. 10, p. 861-9, 2010. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00011-010-0198-0> > Acesso em: 10 set. 2016.

CAMPBELL, Eric L. *et al.* Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 66-77, 2014. Disponível em: < [http://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613\(13\)00562-1.pdf](http://www.cell.com/immunity/pdf/S1074-7613(13)00562-1.pdf) > Acesso em: 10 set. 2016.

CAMPESE, V. M.; YE, S.; ZHONG, H. Downregulation of neuronal nitric oxide synthase and interleukin-1 β mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 519-24, fev. 2002. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/content/39/2/519> >. Acesso em: 4 set. 2016.

CASSATELLA, Marco A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology today**, v. 16, n. 1, p. 21-6, 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167569995800662> >. Acesso em: 30 ago. 2016.

CHAUSSABEL, D.; PASCUAL, V.; BANCHEREAU, J. Assessing the human immune system through blood transcriptomics. **BMC biology**, v. 8, n. 84, p. 1-14, jul. 2010. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/84> >. Acesso em: 7 set. 2016.

CHEN, Da *et al.* Rapamycin reverses paraquat-induced acute lung injury in a rat model through inhibition of NF κ B activation. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 8, n. 5, p. 4627, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4503025/pdf/ijcep0008-4627.pdf> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

CHESNUTT, Asha N. *et al.* Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury: pathogenetic and prognostic significance. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 156, n. 3, p. 840-5, 1997. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.156.3.9701124#readcube-epdf> >. Acesso em: 19 ago. 2016.

CHOPRA, M.; REUBEN, J. S.; SHARMA, A. C. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. **Experimental biology and medicine**, v. 234, n. 4, p. 361-71, 2009. Disponível em: < <http://ebm.sagepub.com/content/234/4/361.full.pdf+html> >. Acesso em: 03 ago. 2016.

CLARK, Joan G. *et al.* Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome: association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. *Annals of internal medicine*, v. 122, n. 1, p. 17-23, 1995. Disponível em: < <http://annals.org/article.aspx?articleid=708308> >. Acesso em: 19 ago. 2016.

DA SILVA, Joyle Moreira Carvalho *et al.* Dynamics of murine B lymphocytes is modulated by in vivo treatment with steroid ouabain. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 368-76, fev. 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.09.020> >. Acesso em: 10 set. 2016.

DE PAIVA, Luciana S. *et al.* Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, n. 9, p. 1038-43, set. 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.03.002> >. Acesso em: 7 set. 2016.

DE VASCONCELOS, Danielle Ingrid Bezerra *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2011, ID 912925, 11 p. 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2011/912925> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

DE, Sourav *et al.* Review on cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 5391-400, 2016. Disponível em: < <http://www.scopemed.org/?jft=36&ft=36-1465117469> >. Acesso em: 20 ago. 2016.

DELVA, P. *et al.* High plasma levels of a ouabain-like factor in normal pregnancy and in pre-eclampsia. **European journal of clinical investigation**, v. 19, n. 1, p. 95-100, jan. 1989. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2362.1989.tb00202.x/abstract> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

DORIS, Peter A. *et al.* Ouabain production by cultured adrenal cells. **Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 533-9, 1996. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.137.2.8593799#sthash.aWcKzoc3.dpuf> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

DVELA-LEVITT, Moran *et al.* Reduction in maternal circulating ouabain impairs offspring growth and kidney development. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 5, p. 1103-14, maio 2015. Disponível em: < <http://jasn.asnjournals.org/content/26/5/1103.short> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

ECHEVARRIA-LIMA, J.; RUMJANEK, V. M. Effect of ouabain on the immune system. **Current Hypertension Reviews**, v. 2, n. 1, p. 83-95, fev. 2006.

EDER, C. Mechanisms of interleukin-1beta release. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 543-53, 2009. Disponível em: < www.immunobiology.com/34%pdf744556548631 >. Acesso em: 14 ago. 2016.

EL-MALLAKH, Rif S. *et al.* An animal model for mania: preliminary results. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 19, n. 5, p. 955-62, set. 1995. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0278-5846\(95\)00123-D](http://dx.doi.org/10.1016/0278-5846(95)00123-D) >. Acesso em: 4 set. 2016.

ERICKSON, Sara E. *et al.* Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. **Critical care medicine**, v. 37, n. 5, p. 1574, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2696257/pdf/nihms-112038.pdf> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

ESPOSITO, A. L.; POIRIER, W. J.; CLARK, C. A. The cardiac glycoside digoxin disrupts host defense in experimental pneumococcal pneumonia by impairing neutrophil mobilization. **American Review of Respiratory Disease**, v. 140, n. 6, p. 1590-4, dez. 1989. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/140.6.1590#.V9R1WvkrK00> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

FAN, Jie *et al.* Hemorrhagic shock primes for increased expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the lung: role in pulmonary inflammation following lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 1, p. 440-7, 1998. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/161/1/440.short> >. Acesso em 03 ago. 2016.

FERRANDI, Mara *et al.* Ouabain-like Factor Quantification in Mammalian Tissues and Plasma Comparison of Two Independent Assays. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 886-96, out. 1997. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/content/30/4/886.full#content-block> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

FIALKOW, Léa *et al.* Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. **Critical Care**, v. 10, n. 6, p. 1, 2006. Disponível em: < <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc5090> >. Acesso em: 03 ago. 2016.

FIELDING, Ceri A. *et al.* IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 2189-95, ago. 2008. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/181/3/2189.short> >. Acesso em: 03 ago. 2016.

FISHMAN, Mark C. Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4661-3, set. 1979. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/76/9/4661.full.pdf> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

FLORI, Heidi R. *et al.* Pediatric acute lung injury: prospective evaluation of risk factors associated with mortality. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 9, p. 995-1001, 2005. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200404-544OC#readcube-epdf> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

FOLKESSON, H. G. *et al.* Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 1, p. 107, jul. 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC185178/> > Acesso em: 10 ago. 2016.

FUKUDA, Yuh *et al.* The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. **The American journal of pathology**, v. 126, n. 1, p. 171, 1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1899540/pdf/amjpathol00148-0181.pdf> > Acesso em: 22 ago. 2016.

GABOR, A.; LEENEN, F. H. H. Mechanisms in the PVN mediating local and central sodium-induced hypertension in Wistar rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 3, p. R618-30, mar. 2009. Disponível em: < <http://ajpregu.physiology.org/content/296/3/R618.short> >. Acesso em: 4 set. 2016.

GARCÍA-RAMALLO, Eva *et al.* Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6467-73, dez. 2002. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/169/11/6467.short> >. Acesso em: 4 set. 2016.

GINZBERG, Hedy H. *et al.* Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 3, p. G705-17, 2001. Disponível em: < <http://ajpgi.physiology.org/content/281/3/G705> > Acesso em 24 ago. 2016.

GOODMAN, Richard B. *et al.* Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 14, n. 6, p. 523-35, 2003. Disponível em: < <file:///C:/Users/Ju/Desktop/LPA/LPA%20papers/citocinas%20na%20ALI.pdf> > Acesso em: 21 ago. 2016.

GOODMAN, Richard B. *et al.* Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 154, n. 3, p. 602-11, 1996. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.154.3.8810593#.V9Suo5grKUK> >. Disponível em: 10 set. 2016.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-64, 2005. Disponível em: < <http://www.nature.com/nri/journal/v5/n12/abs/nri1733.html> > Acesso em: 27 ago. 2016.

GOTO, Atsuo *et al.* Digitalis-like activity in human plasma: relation to blood pressure and sodium balance. **The American journal of medicine**, v. 89, n. 4, p. 420-6, out. 1990a. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000293439090369O> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

GOTO, Atsuo *et al.* Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 173, n. 3, p. 1093-101, dez.1990b. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X05808988> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

GOTO, Atsuo *et al.* Ouabainlike compound in hypertension associated with ectopic corticotropin syndrome. **Hypertension**, v. 28, n. 3, p. 421-5, set. 1996. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/content/28/3/421.short> >. Acesso em: 4 set. 2016.

GRAMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular medicine**, v. 17, n. 3, p. 293, 2011. Disponível em: <

https://www.researchgate.net/profile/Jochen_Grommes/publication/270276785_Contribution_of_Neutrophils_to_Acute_Lung_Injury/links/54a547eb0cf267bdb9081a35.pdf > Acesso em 28 ago. 2016.

GRASSI, Guido. Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 13, n. 5, p. 513-9, 2004. Disponível em: < http://journals.lww.com/co-nephrol/hypertens/Abstract/2004/09000/Counteracting_the_sympathetic_nervous_system_in.6.aspx >. Acesso em: 4 set. 2016.

GREGORY, T. J. *et al.* Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 6, p. 1976, 1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295781/pdf/jcinvest00065-0210.pdf> > Acesso em: 28 ago. 2016.

GROENEVELD, A. B. Johan. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Vascular pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 247-56, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537189103000132> > Acesso em: 25 ago. 2016.

GROSS, N. B.; HARRINGTON, M. G. Cerebroventricular sodium, regulated by Na, K, ATPase and endogenous ouabain, changes neuronal excitability in a rat migraine model. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1 Supplement, p. 935.7, 2016. Disponível em: < http://www.fasebj.org/content/30/1_Supplement/935.7.short > Acesso em: 10 set. 2016.

HAMLYN, John M. *et al.* 11-Hydroxylation in the Biosynthesis of Endogenous Ouabain: Multiple Implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, n. 1, p. 685-93, 2003. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07283.x/full> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

HAMLYN, John M. *et al.* Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 14, p. 6259-63, jul. 1991. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/88/14/6259.full.pdf> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

HAMLYN, John M. *et al.* Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. **Clinical and experimental hypertension**, v. 20, n. 5-6, p. 523-33, 1998. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10641969809053230> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

HAUPERT, G. T.; SANCHO, J. M. Sodium transport inhibitor from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4658-60, set. 1979. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/76/9/4658.full.pdf> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

HAUX, Johan *et al.* Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. **BMC cancer**, v. 1, n. 1, p. 11, ago. 2001. Disponível em: < <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-1-11> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

HEROLD, S.; MAYER, K.; LOHMEYER, Juergen. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. **Macrophages in inflammation and its resolution**, v. 2, n. 65, p. 82, 2011. Disponível em: < <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2011.00065/full> > Acesso em: 13 ago. 2016.

HEROLD, Susanne *et al.* Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 183, n. 10, p. 1380-90, 2011. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201009-1431OC#.V9Sg15grKUk> > Acesso em 10 set. 2016.

HOFFMAN, Joseph F. The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. **The American journal of medicine**, v. 41, n. 5, p. 666-80, nov. 1966. Disponível em: < [http://www.amjmed.com/article/0002-9343\(66\)90029-5/fulltext](http://www.amjmed.com/article/0002-9343(66)90029-5/fulltext) >. Acesso em: 20 ago. 2016.

HUDSON, L. D.; STEINBERG, K. P. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. **Chest Journal**, v. 116, n. suppl_1, p. 74S-82S, 1999. Disponível em: < <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1078422> > Acesso em: 28 ago. 2016.

IHENETU, K. *et al.* Digoxin and digoxin-like immunoreactive factors (DLIF) modulate the release of pro-inflammatory cytokines. **Inflammation Research**, v. 57, n. 11, p. 519-23, nov. 2008. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00011-008-7249-9> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

JACOB, P. L. *et al.* Immunomodulatory activity of ouabain in Leishmania leishmania amazonensis-infected Swiss mice. **Parasitology research**, v. 112, n. 3, p. 1313-21, mar. 2013. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-012-3146-9> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

JENSEN, Pamela *et al.* The mitogenic effect of A23187 in human peripheral lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 496, n. 2, p. 374-83, fev. 1977. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304416577903208> >. Acesso em: 7 set. 2016.

JIANG, Dianhua *et al.* Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. **Nature medicine**, v. 11, n. 11, p. 1173-9, 2005. Disponível em: < <http://www.nature.com/nm/journal/v11/n11/abs/nm1315.html> > Acesso em: 24 ago. 2016.

JOHNSON, E. R.; MATTHAY, M. A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 243-52, 2010. Disponível em: < <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/jamp.2009.0775> > Acesso em: 28 ago. 2016.

JORGENSEN, P. L.; HÅKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. D. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual review of physiology**, v. 65, p. 817-49, 2003. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558> >. Acesso em: 20 ago. 2016.

KAMOCHI, M. *et al.* P-selectin and ICAM-1 mediate endotoxin-induced neutrophil recruitment and injury to the lung and liver. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 277, n. 2, p. L310-9, 1999. Disponível em: < <http://ajplung.physiology.org/content/277/2/L310> > Acesso em: 10 set. 2016.

KAPLAN, Jack H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 511-35, 2002. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218> >. Acesso em: 20 ago. 2016.

KATZENSTEIN, A. L. A. Acute lung injury patterns: diffuse alveolar damage and bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia. **Katzenstein and Askin's surgical pathology of non-neoplastic lung disease**, p. 14-47, 1995. Disponível em: < <http://ci.nii.ac.jp/naid/10004934027/> > Acesso em: 26 ago. 2016.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-84, 2010. Disponível em: < <http://www.nature.com/nijournal/v11/n5/abs/ni.1863.html> > Acesso em: 28 ago. 2016.

KELLY, R. A.; SMITH, T. W. De modulatione cordis. **Circulation**, v. 94, n. 10, p. 2361-3, nov. 1996. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/94/10/2361.full> >. Acesso em: 20 ago. 2016.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015. Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(15\)00175-0.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(15)00175-0.pdf) >. Acesso em: 30 ago. 2016.

KOTHARI, Nikhil *et al.* Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis. **Journal of critical care**, v. 26, n. 4, p. 435-7, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883944110002625> > Acesso em: 03 ago. 2016.

LAREDO, J. *et al.* Alpha-1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells. In: EXCERPTA MEDICA INTERNATIONAL CONGRESS SERIES. Elsevier Ltd, 2000. p. 671-80.

LAREDO, J.; HAMILTON, B. P.; HAMLYN, J. M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 794-7, 1994. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.135.2.8033829> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

LAREDO, J.; HAMILTON, J. P.; HAMLYN, J. M. Secretion of endogenous ouabain from bovin adrenal cells. Role of zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 212, n. 2, p. 487-93, jul. 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X85719961> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

LAREDO, James *et al.* Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension**, v. 29, n. 1, pt. 2, p. 401-7, jan. 1997. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/content/29/1/401.short> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

LASKIN, D. L.; WEINBERGER, B.; LASKIN, J. D. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 2, p. 163-70, 2001. Disponível em: < <http://www.jleukbio.org/content/70/2/163.short> > Acesso em: 25 ago. 2016.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 750-61, 2011. Disponível em: < <http://www.nature.com/nri/journal/v11/n11/abs/nri3088.html> > Acesso em: 10 set. 2016.

LAZARTIGUES, Eric. Inflammation and Neurogenic Hypertension A New Role for the Circumventricular Organs?. **Circulation research**, v. 107, n. 2, p. 166-7, 2010. <http://circres.ahajournals.org/content/107/2/166> >. Acesso em: 4 set. 2016.

LEHMANN, Ingo T. *et al.* Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17644-51, jun. 2006. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/281/26/17644> >. Acesso em: 4 set. 2016.

LEIKAUF, George D. *et al.* Acute lung injury: functional genomics and genetic susceptibility. **CHEST Journal**, v. 121, n. 3_suppl, p. 70S-5S, 2002. Acesso em: < <http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21975/69S.pdf> > Disponível em: 05 ago. 2016.

LEITE, Jacqueline Alves *et al.* Ouabain modulates zymosan-induced peritonitis in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2015, ID 265798, 12 p. 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2015/265798> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

LEITE, Jacqueline Alves. **Atividade imunomoduladora da ouabaína no processo inflamatório agudo**. 2012. 131 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012. Disponível em: < <http://tede.biblioteca.ufpb.br:8080/handle/tede/6731> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

LEWIS, J. F.; JOBE, A. H. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, n. 1, p. 218-233, 1993. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm/147.1.218> > Acesso em: 28 ago. 2016.

LI, Juan *et al.* Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney. **Nature communications**, v. 1, n. 4, p. 42-7, jul. 2010. Disponível em: < <http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n4/full/ncomms1043.html> >. Acesso em: 4 set. 2016.

LI, Rena *et al.* Lithium prevents ouabain-induced behavioral changes. **Molecular and chemical neuropathology**, v. 31, n. 1, p. 65-72, maio 1997. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02815161> >. Acesso em: 4 set. 2016.

LI, Su-qin *et al.* Bovine adrenals and hypothalamus are a major source of proscillaridin A-and ouabain-immunoreactivities. **Life sciences**, v. 62, n. 11, p. 1023-33, fev. 1998. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002432059800023X> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

LICHTSTEIN, D.; SAMUELOV, S. Endogenous 'ouabain like' activity in rat brain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 96, n. 4, p. 1518-23, out. 1980. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X80913467> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

LIU, Dongmei *et al.* Role of oxidant stress on AT1 receptor expression in neurons of rabbits with heart failure and in cultured neurons. **Circulation research**, v. 103, n. 2, p. 186-93, jul. 2008. Disponível em: < <http://circres.ahajournals.org/content/103/2/186> >. Acesso em: 4 set. 2016.

LIU, Lijun *et al.* Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 5, p. H2173-82, nov. 2004. Disponível em: < <http://ajpheart.physiology.org/content/287/5/H2173.short> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

MACCALLUM, N.; EVANS, T. Acute lung injury. **Anaesthesia & intensive care medicine**. vol 5, p. 389-91, 2004. Disponível em: < [http://www.anaesthesiajournal.co.uk/article/S1472-0299\(07\)00216-0/abstract](http://www.anaesthesiajournal.co.uk/article/S1472-0299(07)00216-0/abstract) > Acesso em: 26 ago. 2016.

MACKAY, A.; AL-HADDAD, M. Acute lung injury. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. 487-9, 2010. Disponível em: < [http://www.anaesthesiajournal.co.uk/article/S1472-0299\(07\)00216-0/abstract](http://www.anaesthesiajournal.co.uk/article/S1472-0299(07)00216-0/abstract) > Acesso em: 27 ago.2016.

MANN, Cynthia L. *et al.* Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5059-68, dez. 2001. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.142.12.8516> >. Acesso em: 7 set. 2016.

MANNA, S. K.; SREENIVASAN, Y.; SARKAR, A. Cardiac glycoside inhibits IL-8-induced biological responses by downregulating IL-8 receptors through altering membrane fluidity. **Journal of cellular physiology**, v. 207, n. 1, p. 195-207, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.20555/full> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

MANUNTA, Paolo *et al.* Endogenous ouabain and the renin–angiotensin–aldosterone system: distinct effects on Na handling and blood pressure in human hypertension. **Journal of hypertension**, v. 29, n. 2, p. 349, 2011.

MANUNTA, Paolo *et al.* Left ventricular mass, stroke volume, and ouabain-like factor in essential hypertension. **Hypertension**, v. 34, n. 3, p. 450-6, set. 1999. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/content/34/3/450.short> >. Acesso em: 30 ago. 2016.

MARSHALL, Richard P. *et al.* Genetic polymorphisms associated with susceptibility and outcome in ARDS. **CHEST Journal**, v. 121, n. 3_suppl, p. 68S-9S, 2002. Disponível em: < <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1080459> > Acesso em: 21 ago. 2016.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, n. 13.10, p. 12703, 2014. Disponível em: < <http://www.medicinabiomolecular.com.br/sdi4/sdi4-arquivos/pdf/mb-0860.pdf> > Acesso em: 10 set. 2016.

MATHEWS, W. Rodney *et al.* Mass spectral characterization of an endogenous digitalislike factor from human plasma. **Hypertension**, v. 17, n. 6 pt. 2, p. 930-5, jun. 1991. Disponível em: < http://hyper.ahajournals.org/content/17/6_Pt_2/930.full.pdf+html >. Acesso em: 23 ago. 2016.

MATSUMORI, Akira *et al.* Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. **Circulation**, v. 96, n. 5, p. 1501-06, 1997. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/96/5/1501.short> > Acesso em: 10 set. 2016.

MATTHAY, M. A.; BROADDUS, V. C. Fluid and hemodynamic management in acute lung injury. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. 1994 by Thieme Medical Publishers, Inc., p. 271-88, 1994. Disponível em: < www.Fejournalspdf%2F10.1055%2Fs-2007-1006373.pdf > Acesso em: 22 ago. 2016.

MATUTE-BELLO, Gustavo *et al.* An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, n. 5, p. 725-38, 2011. Disponível em < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2009-0210ST#readcube-pdf> > Acesso em: 03 jul. 2016.

MATUTE-BELLO, Gustavo *et al.* Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. L379-99, 2008. Disponível em: < <http://ajplung.physiology.org/content/295/3/L379> > Acesso em: 29 ago. 2016.

MEDURI, G. Umberto *et al.* Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS: persistent elevation over time predicts poor outcome. **Chest**, v. 108, n. 5, p. 1303-14, 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012369216357087> > Acesso em: 21 ago. 2016.

MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-6, 2010. Disponível em: < [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(10\)00242-4.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(10)00242-4.pdf) >. Acesso em: 30 ago. 2016.

MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 1, n. 2, p. 135-45, 2001. Disponível em: < <http://www.nature.com/nri/journal/v1/n2/abs/nri1101-135a.html> > Acesso em: 15 jul. 2016.

MEYER, K.; LINDE, H. Collection of toad venoms and chemistry of toad venom steroids. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. **Venomous animals and their venoms: Venomous vertebrates**. Nova York: Academic Press, 1971. v. 2, cap. 40, p. 521-56.

MIJATOVIC, Tatjana *et al.* Cardiogenic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 32-57, set. 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X07000194> >. Acesso em: 20 ago. 2016.

MORAES, Theo J. *et al.* Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Current opinion in hematology**, v. 13, n. 1, p. 21-7, 2006. Disponível em: < http://journals.lww.com/_layouts/1033/oaks.journals > Acesso em 08 ago. 2016.

MORRIS, M; LI, L. Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 13-8, 2012. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00005-011-0155-9> > Acesso em: 29 ago. 2016.

NASCIMENTO, Clarissa Rodrigues *et al.* The influence of Ouabain on human dendritic cells maturation. **Mediators of inflammation**, v. 2014, ID 494956, 15 p. 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/494956> >. Acesso em: 10 set. 2016.

NEWMAN, Robert A. *et al.* Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Molecular Interventions**, v. 8, n. 1, p. 36-49, fev. 2008. Disponível em: <<https://triggered.clockss.org/ServeContent?url=http://molinterv.aspetjournals.org%2Fcontent%2F8%2F1%2F36.full>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

NUCKTON, Thomas J. *et al.* Pulmonary dead-space fraction as a risk factor for death in the acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 17, p. 1281-1286, 2002. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa012835>> Acesso em: 28. Ago. 2016

OLEJ, Beni *et al.* Effect of ouabain on lymphokine-activated killer cells. **International journal of immunopharmacology**, v. 16, n. 9, p. 769-74, set. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0192056194900973>>. Acesso em: 7 set. 2016.

OLEJ, Beni *et al.* Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. **Bioscience reports**, v. 18, n. 1, p. 1-7, fev. 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1022259832207>>. Acesso em: 7 set. 2016.

OLIVEIRA, Maria Talita Pacheco de *et al.* **Efeito anti-inflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahidroisoquilínico**. 2014. 113 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014. Disponível em: <<http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/handle/tede/3662>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

OLMAN, Mitchell A. *et al.* Microarray analysis indicates that pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury mediates inflammation, mitogen gene expression, and fibroblast proliferation through bioactive interleukin-1. **CHEST Journal**, v. 121, n. 3_suppl, p. 69S-70S, 2002. Disponível em: <<http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21975/69S.pdf>> Acesso em: 23 ago. 2016.

PADILHA, Alessandra Simão *et al.* Hypertensive effects of the *iv* administration of picomoles of ouabain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 933-8, set. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500103>>. Acesso em: 4 set. 2016.

PAHL, Heike L. Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, 1999. Disponível em: <<http://web.a.ebscohost.com/abstract>> Acesso em: 18 jul. 2016.

PAREKH, D.; DANCER, R. C.; THICKETT, D. R. Acute lung injury. **Clinical Medicine**, v. 11, n. 6, p. 615-8, 2011. Disponível em: <<http://www.clinmed.rcpjournals.org/content/11/6/615.full.pdf+html>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

PARK, William Y. *et al.* Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 10, p. 1896-903, 2001. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.164.10.2104013#.V9SyW5grKUk> > Acesso em: 10 set. 2016.

PECK, T. W.; WILKINSON, K. D. **William Withering of Birmingham, MD, FRS, FLS.** Bristol: John Wright, 1950.

PERRIN, A. *et al.* Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 7-15, jan. 1997. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207\(96\)03964-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0303-7207(96)03964-0) >. Acesso em: 28 ago. 2016.

PITTET, J. F. *et al.* Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 155, n. 4, p. 1187-205, 1997. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm.155.4.9105054> > Acesso em: 03 ago. 2016.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 11, p. 926-35, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrd/journal/v7/n11/abs/nrd2682.html>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

PRATT, P. C. *et al.* Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. I. Light microscopy. **The American journal of pathology**, v. 95, n. 1, p. 191, 1979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2042296/pdf/amjpathol00242-0203.pdf> > Acesso em: 28 ago. 2016.

PREWITT, R. M.; MCCARTHY, J.; WOOD, L. D. H. Treatment of acute low pressure pulmonary edema in dogs: relative effects of hydrostatic and oncotic pressure, nitroprusside, and positive end-expiratory pressure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 67, n. 2, p. 409, 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC370582/> > Acesso em: 10 set. 2016.

PULINA, Maria V. *et al.* Upregulation of Na⁺ and Ca²⁺ transporters in arterial smooth muscle from ouabain-induced hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 298, n. 1, p. H263-74, jan. 2010. Disponível em: < <http://ajpheart.physiology.org/content/298/1/H263.short> >. Acesso em: 4 set. 2016.

QAZZAZ, H. M. A. M.; EL-MASRI, M. A.; VALDES JR, R. Secretion of a Lactone-Hydrogenated Ouabain-Like Effector of Sodium, Potassium-Adenosine Triphosphatase Activity by Adrenal Cells 1. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3200-9, mar. 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.141.9.7664> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

QAZZAZ, Hassan M. A. M. *et al.* De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical chemistry**, v. 50, n. 3, p. 612-20, 2004. Disponível em: < <http://www.clinchem.org/content/50/3/612.full.pdf+html> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

QUASTEL, M. R.; KAPLAN, J. G. Inhibition by ouabain of human lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin in vitro. **Nature**, v. 219, n. 5150 p. 198-200, jul. 1968. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v219/n5150/abs/219198a0.html> >. Acesso em: 7 set. 2016.

RAGHAVENDRAN, Krishnan *et al.* Pharmacotherapy of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 19, p. 1911-1924, 2008. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect-com.ez15.periodicos.capes.gov.br/content/ben/cmc/2008/00000015/00000019/art00005> >. Acesso em: 30 ago. 2016

RANDHAWA, R.; BELLINGAN, G. Acute lung injury. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**. vol. 8, p. 477-80, 2007. Disponível em: < [http://www.anaesthesiajournal.co.uk/article/S1472-0299\(07\)00216-0/abstract](http://www.anaesthesiajournal.co.uk/article/S1472-0299(07)00216-0/abstract) > Acesso em: 28 ago. 2016.

RAY, E.; SAMANTA, A. K. Receptor-mediated endocytosis of IL-8: a fluorescent microscopic evidence and implication of the process in ligand-induced biological response in human neutrophils. **Cytokine**, v. 9, n. 8, p. 587-96, 1997. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466697902064> > Acesso em: 10 set. 2016.

REDONDO, J. M.; RIVAS, A. L.; FRESNO, M. Activation of the Na⁺/K⁺-ATPase by interleukin-2. **FEBS letters**, v. 206, n. 2, p. 199-202, out. 1986. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80980-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(86)80980-2) >. Acesso em: 7 set. 2016.

REINÉS, A. *et al.* Endobain E, a brain endogenous factor, is present and modulates NMDA receptor in ischemic conditions. **Life sciences**, v. 78, n. 3, p. 245-52, dez. 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.046> >. Acesso em: 4 set. 2016.

RIFKIN, Ian R. *et al.* Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunological reviews*, v. 204, n. 1, p. 27-42, 2005. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0105-2896.2005.00239.x/full> > Acesso em: 23 jul. 2016.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DOS SANTOS, N. F.; RUMJANEK, V. M. Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy. **Bioscience reports**, v. 26, n. 2, p. 159-69, abr. 2006. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s10540-006-9012-1> >. Acesso em: 7 set. 2016.

RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra *et al.* CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life sciences**, v. 73, n. 8, p. 1037-51, jul. 2003. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00377-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00377-1) >. Acesso em: 7 set. 2016.

RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra *et al.* Modulation of the immune system by ouabain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, n. 1, p. 153-63, fev. 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03969.x> >. Acesso em: 7 set. 2016.

RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra *et al.* Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell biology international**, v. 32, n. 10, p. 1323-8, out. 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.07.012> >. Acesso em: 7 set. 2016.

ROSSEAU, Simone *et al.* Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 1, p. L25-35, 2000. Disponível em: < <http://ajplung.physiology.org/content/279/1/L25> > Acesso em: 10 set. 2016.

RUBENFELD, Gordon D. *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685-93, 2005. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa050333> >. Acesso em: 19 jun. 2016.

SAUNDERS, R.; SCHEINER-BOBIS, G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 5, p. 1054-62, mar. 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04012.x> >. Acesso em: 7 set. 2016.

SCHNEIDER, Ralf *et al.* Proscillaridin A immunoreactivity: its purification, transport in blood by a specific binding protein and its correlation with blood pressure. **Clinical and experimental hypertension**, v. 20, n. 5-6, p. 593-9, 1998. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10641969809053237> >. Acesso em: 23 ago. 2016.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. **American journal of cardiovascular drugs**, v. 7, n. 3, p. 173-89, maio 2007. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.2165/00129784-200707030-00004> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. C509-36, ago. 2007. Disponível em: < <http://ajpcell.physiology.org/content/293/2/C509.short> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

SCHONER, Wilhelm. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 10, p. 2440-8, maio 2002. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1033.2002.02911.x/full> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

SCHONER, Wilhelm. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes**, v. 108, n. 07, p. 449-54, 2000. Disponível em: < <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2000-8140> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

SEGALL, Laura *et al.* Structural basis for $\alpha 1$ versus $\alpha 2$ isoform-distinct behavior of the Na, K-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9027-34, mar. 2003. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/278/11/9027.short> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

SHAH, V. O. *et al.* Cardiac glycosides inhibit LPS-induced activation of pro-inflammatory cytokines in whole blood through an NF- κ B-dependent mechanism. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 4, n. 1, p. 11-9, 2011. Disponível em: < <http://www.ijarnp.org/index.php/ijarnp/article/view/11> > Acesso em: 10 set. 2016.

SHENKAR, R.; ABRAHAM, E. Mechanisms of lung neutrophil activation after hemorrhage or endotoxemia: roles of reactive oxygen intermediates, NF- κ B, and cyclic AMP response element binding protein. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 2, p. 954-62, 1999. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/163/2/954.full.pdf+html> >. Acesso em: 30 ago. 2016.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521689603001162> > Acesso em: 28 ago. 2016.

SIMONINI, Marco *et al.* Endogenous Ouabain: An Old Cardiotonic Steroid as a New Biomarker of Heart Failure and a Predictor of Mortality after Cardiac Surgery. **BioMed research international**, v. 2015, ID 714793, 10 p. 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2015/714793> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

SMITH, T. W. The fundamental mechanism of inotropic action of digitalis. **Therapie**, v. 44, n. 6, p. 431-5, 1989.

SPIVAK, Jerry L. *et al.* Suppression and potentiation of mouse hematopoietic progenitor cell. **Blood**, v. 56, n. 2, p. 315-7, ago. 1980. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/56/2/315> >. Acesso em: 7 set. 2016.

STANDIFORD, Theodore J. *et al.* Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9912-8, 1991. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/266/15/9912.short> >. Acesso em: 10 set. 2016.

STEINBERG, Kenneth P. *et al.* Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 150, n. 1, p. 113-22, 1994. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.150.1.8025736#.V9SIIJgrKUk> >. Acesso em: 10 set. 2016.

SU, Xiao *et al.* Inhibition of inflammatory responses by ambroxol, a mucolytic agent, in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **Intensive care medicine**, v. 30, n. 1, p. 133-40, 2004. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00134-003-2001-y> >. Acesso em: 29 ago. 2016.

SUTER, Peter M. *et al.* High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 145, n. 5, p. 1016-22, 1992. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/145.5.1016#.V9Sx8ZgrKUk> >. Acesso em: 10 set. 2016.

SZAMEL, M.; SCHNEIDER, S.; RESCH, K. Functional interrelationship between (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen-stimulated rabbit thymocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 17, p. 9198-204, set. 1981. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/256/17/9198.full.pdf> >. Acesso em: 7 set. 2016.

SZAMEL, Marta *et al.* Differential signal transduction pathways regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1235, n. 1, p. 33-42, abr. 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005273694002973> >. Acesso em: 7 set. 2016.

TAKADA, Yohei *et al.* Odoroside A and ouabain inhibit Na⁺/K⁺-ATPase and prevent NF-κB-inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 9, p. 1157-66, nov. 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000629520900495X> >. Acesso em: 28 ago. 2016.

TAYLOR, Philip R. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 901-44, 2005. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816> > Acesso em: 28 ago. 2016.

TEIXEIRA, M. P.; RUMJANEK, V. M. Ouabain affects the expression of activation markers, cytokine production, and endocytosis of human monocytes. **Mediators of inflammation**, v. 2014, ID 760368, 10 p. 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/760368> >. Acesso em: 10 set. 2016.

TSUSHIMA, Kenji *et al.* Acute lung injury review. **Internal Medicine**, v. 48, n. 9, p. 621-30, 2009. Disponível em: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/48/9/48_9_621/_pdf >. Acesso em: 30 ago. 2016.

VALENTE, Raphael C. *et al.* mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of epithelial growth factor receptor and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 4, p. 228-36, maio 2009. Disponível em: < <http://www.karger.com/Article/Abstract/212383> >. Acesso em: 10 set. 2016.

VALENTE, R. C.; ARAUJO, E. G.; RUMJANEK, Vivian M. Ouabain inhibits monocyte activation in vitro: prevention of the proinflammatory mCD14+/CD16+ subset appearance and cell-size progression. **Journal of experimental pharmacology**, v. 4, p. 125, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863552/> > Acesso em: 10 set. 2016.

VATTA, Marcelo *et al.* Endobain E, a brain Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor, decreases norepinephrine uptake in rat hypothalamus. **Life sciences**, v. 76, n. 4, p. 359-65, dez. 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.004> >. Acesso em: 4 set. 2016.

WALKEY, Allan J. *et al.* Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches. **Clinical epidemiology**, v. 4, p. 159, 2012. Disponível em: < <http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC3410685/> > Acesso em: 28 ago. 2016.

WALZ, Alfred *et al.* Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 6, p. 1355-62, 1991. Disponível em: < <http://jem.rupress.org/content/174/6/1355.abstract> > Acesso em: 10 set. 2016.

WANG, Xue Qing *et al.* Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 10, p. 2099-110, jan. 2003. Disponível em: < <http://jcs.biologists.org/content/116/10/2099.short> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 6, p. 1376-83, 2001. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.163.6.2004035#.V9SropgrKUK> > Acesso em: 10 set. 2016.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1334-49, 2000. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm200005043421806> > Acesso em: 28 ago. 2016.

WARE, Lorraine B. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. In: Seminars in respiratory and critical care medicine. Copyright© 2006 by **Thieme Medical Publishers**, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., 2006. p. 337-49. Disponível em: < [www.20papers/Pathophys%20of%20ARDS%20\(1\).pdf](http://www.20papers/Pathophys%20of%20ARDS%20(1).pdf) > Acesso em: 10 set. 2016.

WEIDEMANN, Heidrun. Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development—a hypothesis. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 2165-76, set. 2005. Disponível em: < <http://www.bioscience.org/2005/v10/af/1688/fulltext.php?bframe=PDFII> > Acesso em: 23 ago. 2016.

WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **The Lancet**. 369: 1553–65, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607606047> > Acesso em: 28 ago. 2016.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93-106, fev. 2006. Disponível em: < <http://www.nature.com/nri/journal/v6/n2/abs/nri1779.html> >. Acesso em: 5 set. 2016.

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-6, 2000. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.2000.9695016> > Acesso em: 08 ago. 2016

XIE, Guanghong *et al.* p-Cymene protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting inflammatory cell activation. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8159-73, 2012. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/7/8159> > Acesso em: 10 set. 2016.

XING, Zhou *et al.* Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 10, n. 2, p. 148-53, 1994. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.10.2.8110470#.V8XC1pgrLIU> >. Acesso em: 30 ago. 2016.

YANG, Qingfeng *et al.* Cardiac glycosides inhibit TNF- α /NF- κ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9631-6, jul. 2005. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/102/27/9631.short> >. Acesso em: 24 ago. 2016.

YU, Hyun-Sook *et al.* Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: a rat model for mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 888-94, ago. 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.04.010> >. Acesso em: 4 set. 2016.

YU, Hyun-Sook *et al.* Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates tyrosine hydroxylase through extracellular signal-regulated kinase in rat striatum. **Neurochemistry international**, v. 59, n. 6, p. 779-86, nov. 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2011.08.011> >. Acesso em: 4 set. 2016.

ZHANG, Zhi-Hua *et al.* Aldosterone acts centrally to increase brain renin-angiotensin system activity and oxidative stress in normal rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 2, p. H1067-74, fev. 2008. Disponível em: < <http://ajpheart.physiology.org/content/294/2/H1067.short> >. Acesso em: 4 set. 2016.

ZHAO, Chunzhen *et al.* 1,8-cineol attenuates LPS-induced acute pulmonary inflammation in mice. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 566-72, 2014. Disponível em: < <http://link.springer.com/article> > Acesso em: 10 set. 2016.

APÊNDICE A - Substâncias e sais

Ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) – VETEC
Ácido clorídrico (HCl) – VETEC
Ácido fosfotungstístico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) – VETEC
Ácido periódico (HIO_4) – VETEC
Álcool metílico (CH_3OH) – VETEC
Aldeído fórmico (CH_2O) – MERCK
Alúmen de potássio ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) – MERCK
Bissulfito de sódio (NaHSO_3) – MERCK
Carvão ativado – VETEC
Cloral hidratado – VETEC
Cloreto de potássio (KCl) – MERCK
Cloreto de sódio (NaCl) – SIGMA
Cloridrato de ketamina – VETBRANDS
Clorofórmio (CHCl_3) – LTF
Corante eosina azul de metileno segundo Giemsa – VETEC
Corante eosina azul de metileno segundo May-Grünwald – VETEC
Corante eosina Y – VETEC
Corante floxina- β – VETEC
Corante fucsina básica – VETEC
Corante hematoxilina – VETEC
Corante Panótico – NEWPROV
Corante test-green F.C.F. – VETEC
Corante violeta de genciana – VETEC
Dexametasona – Achê®
D-glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) – SIGMA
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) – LTF
Fosfato de potássio (KH_2PO_4) – REAGEN
Fosfato de sódio anidro (Na_2HPO_4) – MERCK 111

Formaldeído – MERCK

Glicerina ($C_3H_3(OH)_3$) – VETEC

Hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) – VETEC

Hidróxido de sódio ($NaOH$) – REAGEN

Lipossacarídeo bacteriano (*Scherichia coli*)- SIGMA

Metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$) – MERCK

Ouabaína – SIGMA

Óxido de mercúrio amarelo (Hg_2O) – LAFAN

Parafina para Histologia – COAL

Timol ($C_{10}H_{14}O$) – VETEC

Xilol ($C_6H_4(CH_3)_2$) – VETEC 112

APÊNDICE B – Aparelhos e equipamentos

Aagitador Vortex – VWR – ScientificProducts

Autoinclusor – Leica EG 120

Balança analítica – Sartorius

Banho histológico – ANCAP

Centrífuga refrigerada - Centra MP4R – InternationalEquipementCompany (IEC)

Citômetro – FACS Callibur

Estufa – ICAMO – modelo 3

Histotécnico processador automático de tecidos – OMA – DM – 40

Microscópio óptico – Nikon

Micrótomo – Leica RM 2125 – RT

ANEXO I - Certidão do CEUA



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito imunomodulador de ouabaína em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS", protocolo nº 029/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2014 - 2016
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> Balb/C
Número de animais	125
Idade/peso	6-8 semanas / 25 – 30 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador CEUA-UFPB