



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

JÚLIA ONDRUSCH DE MORAES COSTA

**MECANISMOS DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA
OUABAÍNA: ASPECTOS FUNCIONAIS DA MIGRAÇÃO DE
NEUTRÓFILOS *IN VITRO***

**JOÃO PESSOA - PB
2018**

JÚLIA ONDRUSCH DE MORAES COSTA

**MECANISMOS DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DA
OUABAÍNA: ASPECTOS FUNCIONAIS DA MIGRAÇÃO DE
NEUTRÓFILOS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia desta instituição.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a
Sandra Rodrigues Mascarenhas

**JOÃO PESSOA - PB
2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C838m Costa, Júlia Ondrusch de Moraes.

Mecanismos de ação anti-inflamatória da ouabaína :
aspectos funcionais da migração de neutrófilos in vitro
/ Júlia Ondrusch de Moraes Costa. - João Pessoa, 2018.
49 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Ouabaína. 2. Neutrófilos. 3. Migração celular. I.
Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Título.

UFPB/BC



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos quatro dias do mês de junho de 2018, às 14:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (CBIOTEC/UFPB); 2. Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (CBIOTEC/UFPB), a discente Julia Ondrusch de Moraes Costa, matrícula 11325208, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Mecanismos de ação anti-inflamatória da ouabaína: aspectos funcionais da migração de neutrófilos**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Sandra Rodrigues Mascarenhas, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Sandra Rodrigues Mascarenhas Presidente da Banca Examinadora
Enéas Ricardo de Moraes Gomes Avaliador 1

Julia Ondrusch de Moraes Costa Discente
Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente Avaliador 2

Dedico este trabalho aos meus pais e à
minha irmã, que são minha base e meu
porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos primeiramente a **Deus** por Ele ter me guiado e sustentado até aqui. A Ele, toda honra e glória por mais uma etapa vencida.

À minha mãe, **Eloá**, que sempre me ensinou a não desistir dos meus objetivos. Obrigada mãe, pelo amor e carinho, pelo apoio, pelo estímulo, pelos investimentos e por sempre acreditar em mim.

Ao meu pai, **Adarildo**, que mesmo não estando mais presente conosco, o tenho como exemplo em muitas áreas da vida. Pai, obrigada pelos ensinamentos deixados, por ter me estimulado nos estudos, por ter investido em mim. Te amarei para sempre!

À minha irmã, **Marina**, pela paciência, pelos ensinamentos, por sempre estar perto para tirar dúvidas, por ter me ouvido inúmeras vezes ensaiando seminário e apresentações anuais de iniciação científica, pelo companheirismo no dia-a-dia e por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Te amo, Mari!

À minha cachorrinha **Kiara**, por sempre me trazer alegria e por me fazer companhia.

Aos meus amigos da graduação e da vida, **Paloma Silva** e **Rafael Dourado** por todos os nossos momentos, tanto os descontraídos quanto os mais sérios. Vocês tornaram esses quatro anos mais leves.

A todos os meus amigos por todo incentivo, por estarem ao meu lado, por todas as palavras de apoio, por me acalmarem em momentos estressantes, muito obrigada. Agradeço especialmente à **Carol Garcia, Mariana Pacheco e Mariana Zilio**.

À minha professora e orientadora, **Sandra Rodrigues Mascarenhas** pela orientação ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e por sempre me aconselhar quando precisei. Obrigada por tudo, por ter feito eu me apaixonar pela Imunologia, por me permitir crescer

profissionalmente e pelas risadas proporcionadas em nossas reuniões. Muito obrigada!

Ao **Luiz Henrique Agra**, por toda paciência, por todos os protocolos ensinados, por sempre sanar minhas dúvidas, enfim, por todos os ensinamentos. Obrigada pelos chocolates e momentos de risadas. Você foi essencial para o meu aprendizado ao longo desses anos e para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunobiologia, em especial **Deyse Carvalho e Éssia Almeida**, por contribuírem com meu aprendizado, por terem me ajudado sempre que precisei e por terem acreditado em mim. Obrigada por tornarem mais leves as horas de experimentos. Vocês foram muito importantes nessa caminhada.

Ao Professor Doutor **Enéas Ricardo de Moraes Gomes** por aceitar integrar a banca examinadora, pelos ensinamentos prestados durante as aulas estimulantes e agradáveis da graduação.

À Professora Doutora **Tatjana Keesen de Souza Lima** por aceitar tão prontamente o convite para participar da banca examinadora e contribuir com o enriquecimento deste trabalho. A você, por quem tenho um grande carinho, o meu agradecimento especial por ter sido a minha primeira professora da graduação em Biotecnologia, por todos os ensinamentos ao longo desses 4 anos e por sempre me ajudar quando precisei.

A todo corpo docente do Centro de Biotecnologia pelos ensinamentos repassados e pela dedicação. Cada um teve sua importância e colaboração na minha formação profissional. Em especial à Professora Doutora **Flávia de Oliveira Paulino** e à Professora Doutora **Sildivane Valcácia Silva**, o meu carinho.

Ao **CNPq**, por todo apoio financeiro.

Minha gratidão!

“Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apóie em seu próprio entendimento; reconheça o Senhor em todos os seus caminhos, e ele endireitará as suas veredas.”

Provérbios 3:5-6.

RESUMO

A ouabaína, um potente inibidor da Na⁺/K⁺ ATPase, membro da classe dos glicosídeos cardiotônicos é um hormônio presente no plasma humano, porém, pouco se sabe sobre o seu papel fisiológico. Nosso grupo vem evidenciando o papel modulador da ouabaína na resposta imunológica, pela descrição e caracterização de seu efeito anti-inflamatório. A inflamação é desencadeada por diversos estímulos, entre eles a invasão microbiana e/ou agressão tecidual e é uma resposta fisiológica que pode gerar o retorno da homeostasia perdida. Um dos principais eventos que compõe a resposta fisiológica da inflamação é a migração celular. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem, porém, essas células ao serem ativadas liberam espécies reativas de oxigênio e proteases que são responsáveis por promoverem lesão tecidual, o que é prejudicial para a homeostase do organismo. Assim, a inibição da migração dos neutrófilos e de seus mediadores se torna alvo para regulação da resposta inflamatória. Nesse sentido, o presente estudo objetivou padronizar e implantar o método de migração celular *in vitro* (*transwell*) no Laboratório de Imunobiologia/UFPA, avaliar o papel da ouabaína na migração de neutrófilos *in vitro*, além de investigar o papel da ouabaína na molécula de adesão CD18. Para isso, foram utilizados neutrófilos obtidos de camundongos *Swiss* que foram tratados com ouabaína nas concentrações de 1µM, 100 nM, 10nM, 1nM. O número de neutrófilos foi determinado através da técnica de microscopia ótica, foi realizado o ensaio de migração *in vitro* e a viabilidade celular foi obtida pela técnica de azul de tripan. Ao observar o número de células constatou-se um aumento de três vezes na migração celular induzida pelo agente quimioatraente N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (FMLP) comparado ao grupo controle. Ademais, foi possível observar que a ouabaína foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos *in vitro* em aproximadamente 57% nas diferentes concentrações quando comparada com as células que foram estimuladas pelo quimioatraente FMLP, assim como reduziu a expressão da molécula de adesão CD18 na concentração de 1nM. Os resultados obtidos corroboram os resultados já existentes na literatura, mostrando que a ouabaína possui um efeito anti-inflamatório em diversos modelos de inflamação em camundongos.

Palavras chaves: ouabaína; inflamação; neutrófilos; migração celular.

ABSTRACT

Ouabain, a potent Na⁺ / K⁺ ATPase inhibitor, a member of the class of cardiotonic glycosides is a hormone present in human plasma, but little is known about its physiological role. Our group has been demonstrating the role of ouabain in the immune response by describing and characterizing its anti-inflammatory effect. The inflammation is triggered by several stimuli, including microbial invasion and / or tissue aggression and is a physiological response that can generate the return of lost homeostasis. One of the main events that compose the physiological response of inflammation is cell migration. Neutrophils are the first cells to migrate, however, when activated, they release reactive oxygen species and proteases that are responsible for promoting tissue damage, which is detrimental to the body's homeostasis. Thus, inhibition of the migration of neutrophils and their mediators becomes a target for regulation of the inflammatory response. In this sense, the present study aimed to standardize and implant the *in vitro* cell migration method (transwell) in the Laboratory of Immunobiotechnology / UFPB, to evaluate the role of ouabain in the migration of neutrophils *in vitro*, besides investigating the role of ouabain in the adhesion molecule CD18. For this, neutrophils obtained from Swiss mice that were treated with ouabain at concentrations of 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM were used. The number of neutrophils was determined using the optical microscopy technique, the *in vitro* migration assay was performed and cell viability was obtained by the trypan blue technique. A three-fold increase in cell migration induced by the chemoattractant agent N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (FMLP) was observed when compared to the control group. In addition, it was possible to observe that ouabain was able to decrease the migration of neutrophils *in vitro* by approximately 57% in the different concentrations when compared to the cells that were stimulated with the chemoattractant FMLP, as well as the expression of the CD18 adhesion molecule in the concentration of 1nM. The results obtained corroborate the results already existent in the literature, showing that ouabain has an anti-inflammatory effect in several models of inflammation in mice.

Keywords: ouabain; inflammation; neutrophils; cell migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recrutamento de Leucócitos.....	16
Figura 2. Estrutura química da ouabaína	18
Figura 3. Esquema do transwell	26
Figura 4. Porcentagem de células do lavado peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato.....	30
Figura 5. Análise do efeito da ouabaína sobre a migração de neutrófilos induzidos pelo N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (FMLP) in vitro	31
Figura 6. Dotplot representativo do grupo FMLP	32
Figura 7. Efeito da ouabaína sobre expressão da molécula de adesão CD18 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
CD	“cluster of differentiation”
CD62E	E-selectina
CD62P	P-selectina
ConA	Concanavalina A
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
e.p.m	Erro padrão da média
FMLP	N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
HBSS	Solução balanceada de sais de Hanks
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
i.p	Intraperitoneal
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
OVA	Ovalbumina
PGE2	Prostaglandina E2
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio de cultura do inglês “Roswell Park Memorial”
SFB	Soro fetal bovino
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Inflamação	13
1.2 Migração celular e moléculas de adesão	14
1.3 Efeito da ouabaína na inflamação	18
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Animais	25
3.2 Isolamento de neutrófilos para ensaio de migração <i>in vitro</i>	25
3.3 Avaliação do efeito da ouabaína no ensaio de migração <i>in vitro</i>	25
3.4 Obtenção de neutrófilos para analisar CD18	26
3.5 Análise da expressão de CD18 em neutrófilos por citometria de fluxo ...	27
3.6 Análise Estatística	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Avaliação da porcentagem de células no lavado peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato	30
4.2 Análise do efeito da ouabaína sobre a migração de neutrófilos induzidos por FMLP <i>in vitro</i>	31
4.3 Efeito da ouabaína sobre a expressão da molécula de adesão CD18....	32
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	39
7 REFERÊNCIAS	41
ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	49

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

O sistema imunológico mantém ou reestabelece a homeostasia através de interações celulares e moleculares entre seus componentes. Para manter ou restabelecer a homeostase do organismo, o sistema imunológico possui vários mecanismos efetores, dentre eles, a inflamação. O processo inflamatório é uma resposta fisiológica que pode ser desencadeada, dentre outros estímulos, pela invasão microbiana e/ou agressão tecidual, sendo considerada fundamental para o retorno à homeostasia (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008). O processo inflamatório pode também ser compreendido como uma resposta de adaptação ao mau funcionamento de tecidos ou desequilíbrio homeostático, estando envolvida no desenvolvimento de diversas doenças como: artrite reumatoide, asma, câncer, hipertensão e obesidade (NATHAN; DING, 2010).

A inflamação é comumente dividida em dois estágios: a fase aguda (mais precoce) e a fase crônica. Fenômenos vasculares e celulares que ocorrem durante o desenvolvimento da fase aguda levam ao surgimento dos quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, tumor e dor, descritos por Cornelius Celsus em 50 a.C (LUENGO, 2005). O quinto sinal cardinal foi adicionado em 1858 por Rudolph Virchow que foi perturbação da função (*functio laesa*). Assim, atualmente os sinais clínicos da inflamação resultam da vasodilatação (calor e rubor); da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (dor); do acúmulo de leucócitos e do aumento do fluido intersticial (tumor ou edema) e perda de função (ALLER et al., 2007; SCOTT et al., 2004). Esses eventos são coordenados por mediadores que são liberados por células residentes ou células que migram para o local da inflamação. Dentre esses mediadores, destacam-se a histamina e a bradicinina, que exercem ações sobre as células musculares lisas e células endoteliais, provocando essas alterações vasculares descritas (NATHAN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Além destes, prostanoídes também são liberados, como a prostaglandina E2 (PGE2), que

exerce um papel fundamental nos eventos vasculares, na indução da febre e na sensibilização das fibras nociceptivas (CHIZZOLINI; BREMBILLA, 2009).

A inflamação aguda, caracterizada principalmente pela vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e migração de células para o local da injúria, é fisiologicamente importante tanto na defesa do hospedeiro, quanto na reparação tecidual, porém, se esse processo for persistente, pode evoluir para um processo crônico (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Na fase crônica, ocorrem alterações na composição dos leucócitos infiltrantes, que passam de neutrófilos para uma mistura de células mononucleares, principalmente linfócitos e macrófagos (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Adicionalmente, a inflamação crônica é caracterizada por possuir maior duração (semanas, meses e/ou anos) e está associada à proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese), fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004). Entretanto, essa é apenas uma divisão didática, visto que a evolução da resposta acontece de forma progressiva, combinando elementos presentes nas duas fases mencionadas.

1.2 Migração celular e moléculas de adesão

As respostas imunológicas eficientes são dependentes da capacidade leucocitária de migrar do sangue para o tecido inflamado (STEEBER; TEDDER, 2000). A migração é um processo dependente de diferentes moléculas de adesão e é um processo fundamental durante o processo inflamatório. Na inflamação aguda, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio inflamatório e formam a primeira linha de defesa do sistema imunológico contra infecções e essa migração é dependente de várias etapas (NATHAN, 2006). O processo de recrutamento dos neutrófilos é iniciado por mudanças na superfície do endotélio devido ao estímulo por mediadores inflamatórios, como a histamina e citocinas que são liberados pelos leucócitos quando entram em contato com patógenos (KOLACZKOWSKA, KUBES, 2013).

Inicialmente, a fase de rolamento ocorre devido uma interação leucócito-endotélio, mediada por membros da família de moléculas de adesão de

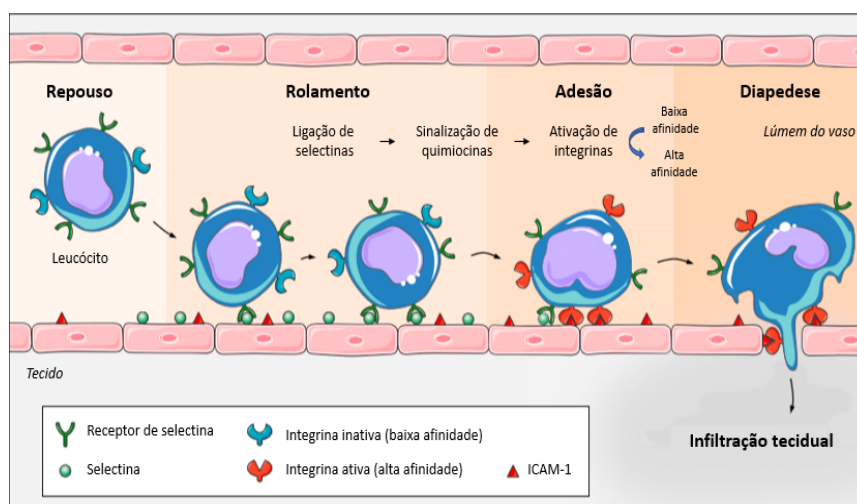
selectinas. A família das selectinas é composta por três moléculas diferentes nomeadas por sua distribuição específica nas células: a E-selectina e P-selectina que são expressas principalmente no endotélio e a L-selectina que é expressa na superfície dos leucócitos e todas elas interagem com moléculas de carboidratos, promovendo a primeira fase da migração celular (KANSAS, 1996), pois a interação é de baixa afinidade e é facilmente rompida pela força de cisalhamento do sangue fluente. Além da histamina, as células residentes secretam TNF- α , que induzem a expressão endotelial de E-selectina (CD62E) e P-selectina (CD62P).

Outra classe de moléculas de adesão fundamental para a migração celular são as integrinas, as quais estão em um estado de baixa afinidade e, por isso, promovem a fase de adesão do processo migratório. Contudo, essa afinidade é aumentada pela sinalização de quimiocinas, passando de um estado de baixa para alta afinidade. As integrinas CD11, CD18, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1) são importantes para a adesão firme seguida do processo de diapedese das células (VON ANDRIAN et al., 1992). A LFA-1 (antígeno-1 associado à função leucocitária), também conhecida como CD11a/CD18, é uma glicoproteína heterodimérica com 2 subunidades, as subunidade alfa e beta. A subunidade alfa também é conhecida como CD11a e a beta é componente das outras integrinas como a CD18. Essa glicoproteína é uma das integrinas expressas nos neutrófilos. Essas moléculas medeiam a fase de firme adesão do leucócito no endotélio ao interagirem com ICAM-1 e VCAM-1 que são seus principais ligantes (SIGAL et al., 2000). Posteriormente ocorre a diapedese, ou seja, a migração para o sítio inflamado promovida pela diminuição da velocidade de rolamento de leucócitos (JUNG et al, 1998) (Figura 1).

A expressão dessas moléculas é regulada por vários mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e proteínas do complemento (MOMMSEN et al., 2011). Esses mediadores permitem a interação dos leucócitos na superfície apical do endotélio e, posteriormente, a transmigração intercelular. A cascata de extravasamento dessas células é um processo complexo de múltiplas etapas que requer a ativação de várias vias de sinalização, como a via de ativação da GTPase, tanto nos leucócitos como nas células endoteliais (SCHNOOR, 2015).

Uma classe de moléculas envolvidas na migração celular são as quimiocinas. São conhecidos mais de 40 tipos e cada uma dessas tem afinidade por diferentes receptores na membrana dos leucócitos, ou seja, elas favorecem a migração de diferentes subtipos celulares (SALLUSTO, BAGGLIONI, 2008; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000). As duas famílias principais de quimiocinas são a CXC e CC. Em relação à ativação de neutrófilos e quimiotaxia, as quimiocinas CXC têm um papel crucial (SADIK, 2011; SANZ, 2012). As quimiocinas CXC incluem CXCL8 em seres humanos e seus análogos em camundongos: CXCL-1, CXCL-2 e CXCL-5. Durante a inflamação aguda, a migração de neutrófilos ocorre em função do gradiente de concentração dessas quimiocinas (FILIPPO et al., 2008), estas, por sua vez, ligam-se ao seu receptor CXCR2 na membrana de neutrófilos para ativá-los e, posteriormente, promover sua adesão ao endotélio (WILLIAMS et. al. 2011; PRUENSTER et. al 2009). Quando as quimiocinas se ligam ao seu receptor CXCR2 na membrana dessas células promovem alterações no citoesqueleto, resultando em aumento da motilidade celular (ROT, ANDRIAN, 2004).

Figura 1. Recrutamento de Leucócitos



Fonte:LAGARRIGUE; KIM; GINSBERG, (2016). Durante a resposta inflamatória, os leucócitos sofrem processo de rolamento, adesão e diapedese. Inicialmente, essas células se aderem transitariamente e rolam ao longo do endotélio por meio da ligação das selectinas. Através da ação das quimiocinas, as integrinas passam de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade, o qual confere forte adesão ao endotélio, seguindo assim, a transmigração dos leucócitos para o endotélio.

As interações leucocitárias endoteliais são processos dinâmicos com transmissão de informações consideráveis durante as interações transitórias que caracterizam o rolamento de leucócitos (STEEBER, 2000). Dessa forma, a expressão adequada, ativação e regulação das moléculas de adesão são necessárias para uma ótima migração de leucócitos e por consequência, para a geração de respostas inflamatórias e imunes rápidas e eficientes (STEEBER, 2000).

Quando chegam no sítio inflamado, os neutrófilos possuem diversas funções efetoras, como por exemplo, a liberação de enzimas líticas presentes em seus grânulos (os quais possuem um grande potencial antimicrobiano) e a capacidade de atuar como fagócitos. A capacidade fagocítica dos neutrófilos é facilitada pelas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que são compostas por um elemento de DNA ao qual são anexadas histonas, proteínas como catepsinas e enzimas como a elastase, que são liberadas a partir de grânulos de neutrófilos, imobilizando, dessa forma, os agentes patogênicos. Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos apresentam um tempo curto de meia vida (entre 10 a 12 horas), embora sua sobrevivência possa ser controlada pela liberação de citocinas, quimiocinas e produtos microbianos (BORREGAARD, 2010; NATHAN, 2006).

No entanto, os produtos da ativação dos neutrófilos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases (elastase neutrofilica, metaloproteinases e catepsina G), promovem lesão tecidual (NATHAN, 2006). Nesse contexto, a inibição da migração de neutrófilos e/ou dos mediadores da inflamação consiste em alvos importantes para regulação da resposta inflamatória (NATHAN, 2002).

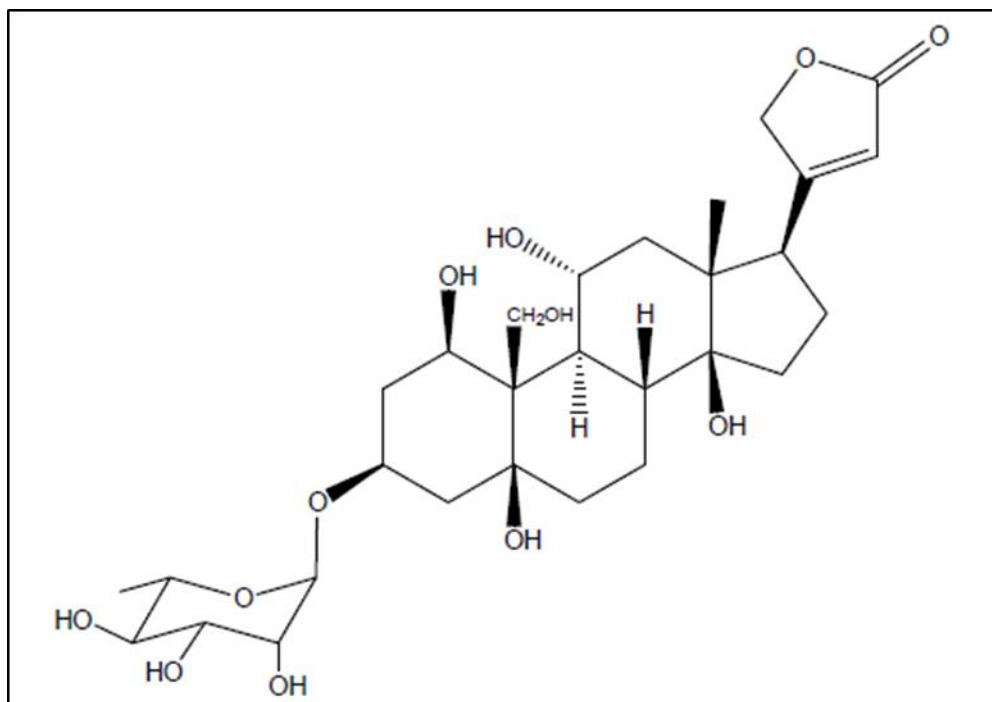
Sendo a migração celular uma característica chave de células vivas e crítica para o desenvolvimento normal, resposta imunológica e processos de doenças como o câncer, os métodos para examiná-la são muito úteis e importantes para uma ampla gama de pesquisas. Um desses métodos, o ensaio de *transwell*, pode ser usado para analisar a capacidade das células responderem de forma direta a quimioatraentes como quimiocinas, fatores de crescimento, lipídios ou componentes do sistema complemento. Além disso, também pode-se avaliar a capacidade migratória devido à expressão de receptores. Este ensaio pode ser usado para identificar e caracterizar os principais reguladores da migração celular (como a família Rho de pequenas

GTPases), sendo sua principal vantagem a sensibilidade de detecção (JUSTUS, 2014).

1.3 Efeito da ouabaína na inflamação

A ouabaína foi inicialmente descrita como metabólito secundário isolado das cascas do ouabaio (*Acocanthera ouabaio*) e de sementes de plantas do gênero *Strophanthus* (*S. gratus* e *S. kombé*), ambas pertencentes à família Apocynaceae, que podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais. Membro da classe dos glicosídeos cardiotônicos, sua estrutura química é composta por um núcleo esteroide com uma lactona (ouabagenina) associada a um açúcar (ramnose) (SCHONER, 2002) como demonstrada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química da ouabaína



Fonte: KAWAMURA et al., 1999.

Em 1991, Hamlyn e colaboradores identificaram uma substância endógena no plasma de mamíferos, estruturalmente e biologicamente

semelhante à ouabaína isolada das plantas. Estudos posteriores mostraram que a ouabaína pode ser produzida pela glândula adrenal, hipotálamo e pela hipófise, sendo considerada um hormônio (FERRANDI et al., 1997; HAMLIN et al., 1991; PAMNANI et al., 1981) e que pode ser secretada em resposta a diversos estímulos, como o aumento da concentração plasmática de sódio seguido por expansão aguda de volume (BLAUSTEIN, 1993; YAMADA et al., 1997), estimulação adrenérgica e ação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e da angiotensina II (LAREDO et al., 1994; LAREDO et al., 1995; SHAH et al., 1999; BAUER et al., 2005).

Alguns estudos evidenciaram o papel imunomodulador da ouabaína tanto em células da imunidade inata como da imunidade adaptativa (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003, RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009; PAIVA et al., 2011; TEIXEIRA; RUMJANEK, 2014). Além disso, nosso grupo vem demonstrando que ouabaína apresenta efeito anti-inflamatório em diversos modelos de inflamação aguda em camundongos (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). O tratamento com ouabaína (0,56 mg/kg, i.p.) reduz o edema de pata induzido por zimosan, carragenina, PGE₂, bradicinina e pelo composto 48/80 (degranulador de mastócitos), mas não por histamina (VASCONCELOS et al., 2011). Este efeito pode estar relacionado, em parte, à redução da permeabilidade vascular (LEITE, 2015). Além disso, a ouabaína interfere na migração celular induzida tanto por concanavalina A quanto por zimosan, com redução significativa do número de neutrófilos em ambos os modelos (LEITE, 2015; VASCONCELOS et al., 2011). Vale ressaltar que este efeito não está relacionado com apoptose celular (LEITE, 2015). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que a ouabaína reduz a resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos (JACOB et al., 2013).

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

Adicionalmente, foi demonstrado que a ouabaína atenua a inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA), diminuindo a migração de células para o fluido do lavado broncoalveolar, principalmente granulócitos, diminuindo os níveis das citocinas IL-4 e IL-13 e o título de soro de IgE específico para OVA, além de promover alterações histológicas pulmonares, como redução da produção de muco nos bronquíolos (GALVÃO et al., 2017).

Foi demonstrado que a ouabaína prejudica a migração *in vitro* de neutrófilos humanos, interferindo com a reciclagem de receptores de IL-8 (RAY E SAMANTA (1997). Além disso, outros estudos demonstraram que a ouabaína também diminui a migração de células de câncer de pulmão (LIU et al., 2013), possivelmente reduzindo a expressão de moléculas relacionadas à adesão celular (por exemplo, integrinas e ICAM) (TAKADA et al., 2009; Ninsontia e Chanvorachote, 2014) e migração celular (por exemplo, Src, Akt e FAK) (PONGRAKHANANON et al., 2013; SHIN et al., 2015). No entanto, o efeito inibitório da ouabaína na migração celular parece depender da presença de um estímulo inflamatório prévio, uma vez que a ouabaína própria por inalação (FENG et al., 2011) ou intratraquealmente (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014) provoca inflamação pulmonar aguda com aumento da migração de neutrófilos (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). Este efeito proinflamatório foi seguido pelos níveis elevados de LTB4 e PGE2, ambos mediadores lipídicos associados à migração celular. Além disso, demonstrou-se que ouabaína em altas concentrações induz a expressão de VCAM-1 (uma molécula de adesão) em células endoteliais murinas (BERETA et al., 1995). A inibição de Na⁺ / K⁺ - ATPase pode ser, pelo menos parcialmente, responsável por este efeito de ouabaína (LACROIX-LAMANDÉ et al., 2012; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014), mas a ativação dependente de Na⁺ / K⁺ - ATPase cascatas de sinalização (por exemplo, ERK e p38 MAPK) não podem ser descartadas (BERETA et al., 1995; FENG et al., 2011).

A dor é um dos sinais flogísticos da inflamação modulados pela ouabaína. DE VASCONCELOS et al. (2011) demonstrou que a administração intraperitoneal de ouabaína reduz o comportamento nociceptivo no modelo de dor inflamatória de camundongos. A modulação da dor por ouabaína depende da dose e da via de administração utilizada e, sugere que ela pode modular

eventos no sistema nervoso central, como a neuroinflamação (CAVALCANTE-SILVA ET. AL, 2017).

Baseado nessas premissas, este trabalho visa elucidar os mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da ouabaína, especialmente na migração de neutrófilos presente na fisiopatologia da inflamação, tendo como hipótese de que essa molécula iniba a migração de neutrófilos, visto que já foi demonstrado que em diversos modelos de inflamação a ouabaína desempenha essa atividade.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos anti-inflamatórios que a ouabaína exerce na migração de neutrófilos *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar e implantar a técnica de migração celular *in vitro* (método *transwell*) no Laboratório de Imunobiologia/UFPB;
- Investigar o efeito da ouabaína sobre a migração de neutrófilos de camundongo *in vitro*;
- Avaliar o efeito da ouabaína sobre a expressão de CD18 em neutrófilos de camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho, todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) com registro no. 039/2015 (ANEXO A). Camundongos Swiss fêmeas com peso entre 25 e 30 g foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 24 ± 1 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração do tipo pellets. Os animais utilizados foram fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do IPeFarM/UFPB.

3.2 Isolamento de neutrófilos para ensaio de migração *in vitro*

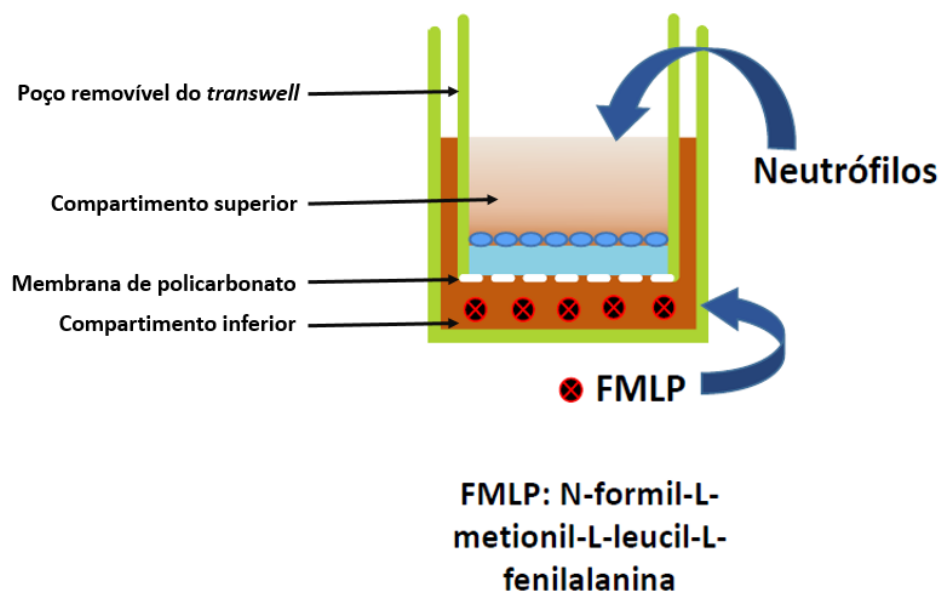
Para obtenção de um exsudato rico em neutrófilos, os camundongos (n=3) foram estimulados com uma solução de tioglicolato 4% (1 mL, i.p.) (Sigma-Aldrich) e, três horas, depois foi realizada a coleta do lavado peritoneal. Este método proporciona um exsudato com mais 75% de neutrófilos. A viabilidade dos neutrófilos foi avaliada através do método de coloração de exclusão de azul de tripan.

3.3 Avaliação do efeito da ouabaína no ensaio de migração *in vitro*

A quimiotaxia foi realizada em placas de 24 poços (transwell) com membrana de policarbonato (filtro de policarbonato 5 μ m). Existem dois compartimentos nesse tipo de placa, um superior e outro inferior (Figura 3). Os neutrófilos isolados do peritônio de camundongos ($1,5 \times 10^6$ células) foram tratados com ouabaína nas concentrações de 1 μ M, 100 nM, 10nM, 1nM *in vitro* por 4 horas. Posteriormente, foram colocados na parte superior e a migração foi induzida pela adição de um agente quimioatraente chamado N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (FMPL) na concentração de 100 ng/mL no compartimento inferior. Como controle negativo, o meio RPMI foi utilizado acrescido de soro fetal bovino a 0,05%. Depois de quatro horas de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, as células contidas no compartimento inferior foram contadas em

microscópio óptico e levadas para análise da presença de neutrófilos por citometria de fluxo.

Figura 3. Esquema do *transwell*



Fonte: Autor, 2018. Adaptado de (<https://openclipart.org/detail/179242/transwell>)

3.4 Obtenção de neutrófilos para analisar CD18

Os neutrófilos foram obtidos da medula óssea de camundongos de acordo com Mócsai et al., 2003. Após a eutanásia dos animais, os fêmures foram removidos e colocados em solução balanceada de sais de Hanks (HBSS) sem Ca^{2+} e Mg^{2+} suplementados com 20 nM de ácido 2-[4-(2-hidroxietil-piperazin-1-il)]-etanossulfônico (HEPES) e com 0,5% de soro fetal bovino (SFB). Esta solução será chamada a partir de agora de HBSS – Prep. Em seguida, as extremidades do fêmur foram seccionadas e as células da medula óssea obtidas através da lavagem com 10 mL de HBSS – Prep utilizando uma seringa de 26 G. As células foram, então, centrifugadas a 400 g por 5 min a 24 °C.

O *pellet* de células obtido foi ressuspenso em 10 mL de solução salina 0,2% para lisar as hemácias. Após 40 s, a osmolaridade foi restabelecida

adicionando-se 10 mL de solução salina 1,6%. Novamente as células foram centrifugadas (400 g, 5 min a 24 °C) e ressuspensas em 5 mL de HBSS – Prep e, posteriormente, colocadas cuidadosamente sobre 5 mL de uma solução de Percoll 62,5%. Após 30 min de centrifugação a 1000 g (24 °C, sem freio), foram obtidas 4 camadas, a saber: a primeira camada de solução HBSS – Prep, uma camada intermediária de células não granulocíticas e células imaturas, uma terceira camada da solução de Percoll 62,5% e a última camada de neutrófilos. Após a remoção das camadas superiores, o *pellet* de neutrófilos foi ressuspensado em 10 mL de meio RPMI e centrifugado (400 g, 5 min a 24 °C). Esse procedimento foi realizado duas vezes.

Por fim, os neutrófilos foram ressuspensos em 1 mL de meio RPMI. Foram utilizados neutrófilos com viabilidade celular igual ou superior a 90% determinada por contagem celular em solução de azul de tripano 0,4%. A frequência dos neutrófilos de aproximadamente 70% foi determinada por citometria de fluxo, utilizando os parâmetros de tamanho e granulosidade (*forward/side scatter*), bem como marcação com anticorpo anti-Gr1.

3.5 Análise da expressão de CD18 em neutrófilos por citometria de fluxo

As células coletadas dos fêmures dos animais foram ajustadas na concentração de 1×10^6 células/tubo de citômetro. Em seguida, as células foram lavadas e bloqueadas com solução de PBS com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) por 20 minutos no gelo para bloqueio das ligações inespecíficas. Posteriormente, as células foram incubadas separadamente, mediante as instruções de cada fabricante, com os anticorpos anti-CD18 marcado com FITC (isotiocianato de fluoresceína). Ademais, essas células também foram marcadas com anticorpos anti-Gr1 conjugados com PerCP (complexo de proteína clorofilada peridina) para identificar neutrófilos. Após a incubação, as células foram lavadas e suspensas em PBS para leitura em citômetro de fluxo FACS Calibur. Os dados obtidos da técnica de citometria de fluxo foram analisados pelo programa de análise Flowjo versão 10.

3. 6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) *one way* seguido do pós-teste de Dunnet, descartando-se a hipótese nula quando $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 7.0 (San Diego, CA, USA).

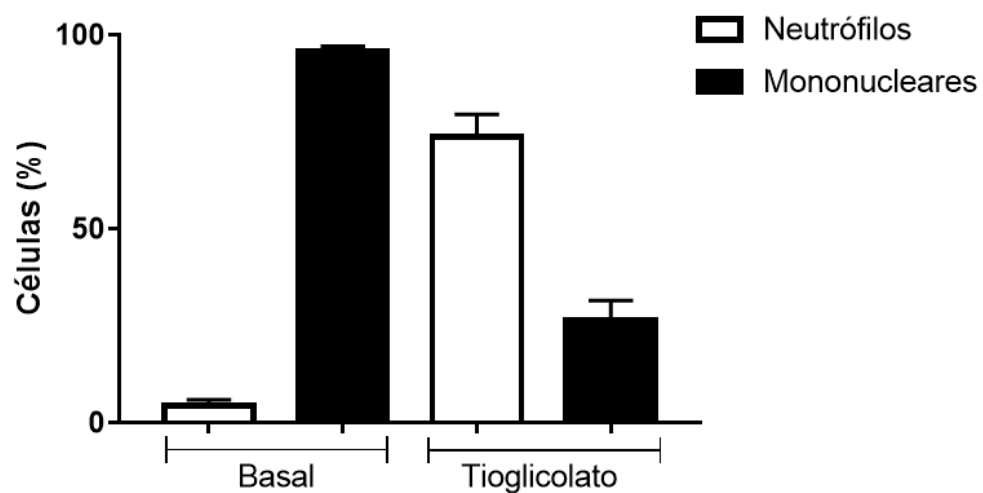
RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da porcentagem de células no lavado peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato

Os animais estimulados com tioglicolato (4%) foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi obtido após 4 horas para realização de contagem de células. Após a contagem celular, observou-se uma porcentagem maior de neutrófilos em relação aos animais que não foram tratados como mostrado na figura 4.

Figura 4. Porcentagem de células do lavado peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato.

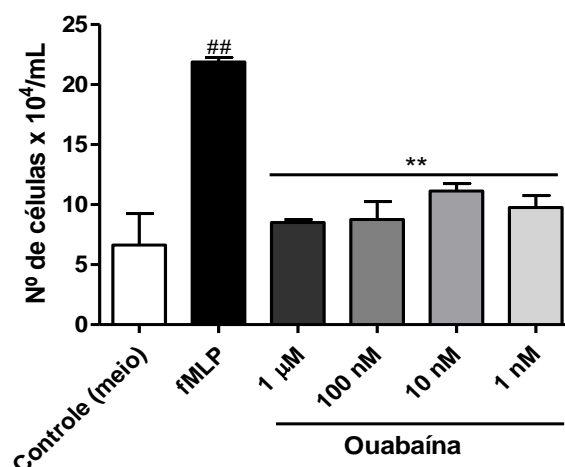


O gráfico representa a porcentagem celular de neutrófilos e células mononucleares encontrada no lavado peritoneal de camundongos tratados e não tratados.

4.2 Análise do efeito da ouabaína sobre a migração de neutrófilos induzidos por FMLP *in vitro*

As células coletadas do lavado peritoneal dos animais estimulados com tioglicolato foram utilizadas para analisar o efeito da migração celular *in vitro* pelo método de *transwell*. De acordo com os nossos dados, o quimioatraente FMLP foi capaz de estimular a migração de células em 3 vezes quando comparada ao grupo de células que não receberam estímulo, o grupo controle (Figura 5). Para demonstrar que as células que realmente migraram em função do estímulo do quimioatraente eram neutrófilos, foi realizada a técnica de citometria de fluxo utilizando os parâmetros de tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H). A partir da citometria, observamos, como esperado, que a maioria das células que migraram realmente eram neutrófilos. Esse dado pode ser observado no dotplot representativo (Figura 6) da migração de neutrófilos do grupo FMLP. O aumento na migração demonstrado pelo FMLP mostrou que o ensaio é funcional uma vez que os neutrófilos migraram para o compartimento inferior da placa de *transwell*. Além disso, como podemos observar na figura 5, o tratamento com a ouabaína nas concentrações de 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos estimulada pelo quimioatraente FMLP em 62%, 60%, 50% e 55%, respectivamente.

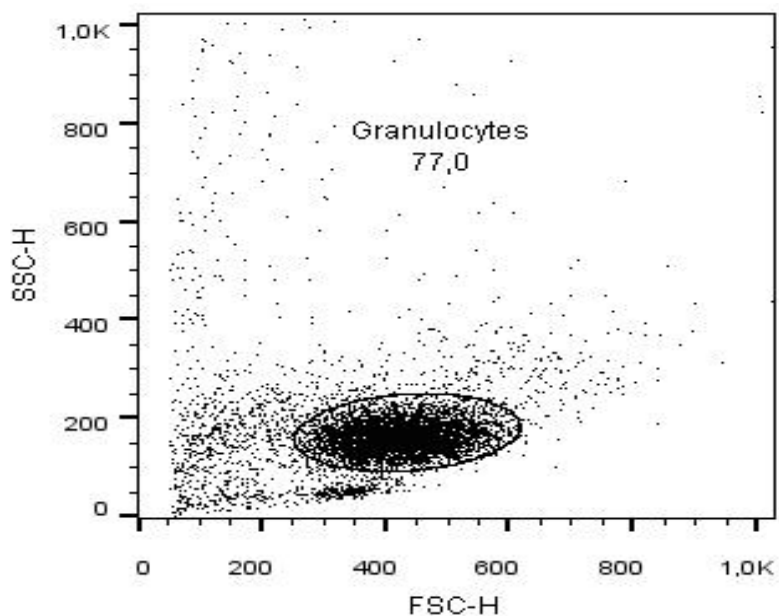
Figura 5. Análise do efeito da ouabaína sobre a migração de neutrófilos induzidos pelo N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (FMLP) *in vitro*



Os neutrófilos foram tratados com a ouabaína em diferentes concentrações (1 μ M, 100 nM, 10 nM e 1 nM) na presença do quimioatraente FMLP durante 4 horas. Após o tratamento, os neutrófilos foram colocados na placa de *transwell* para análise da migração. O gráfico representa o número de células e as concentrações de ouabaína que foram tratadas. Os dados obtidos

foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Dunnett. FMLP: N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina.

Figura 6. Dotplot representativo do grupo FMLP

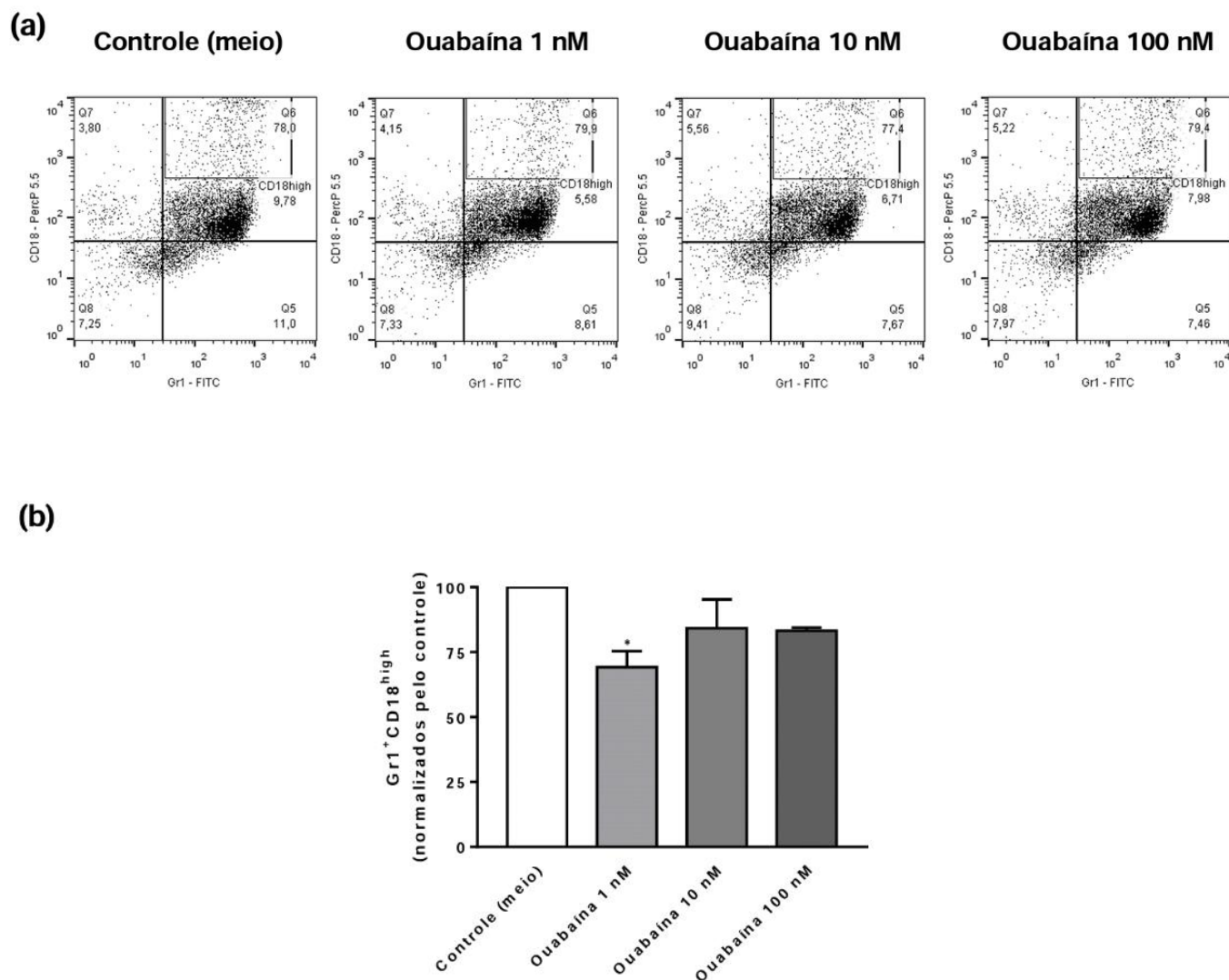


A presença de neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando os parâmetros de tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H) através do dotplot representativo do grupo do quimioatraente FMLP.

4.3 Efeito da ouabaína sobre a expressão da molécula de adesão CD18

O tratamento com ouabaína (10 e 100 nM) por 2 h não reduziu a expressão da molécula de adesão CD18 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos quando comparado com o grupo controle. No entanto, na concentração de 1nM, a ouabaína reduziu cerca de 30% a expressão dessa molécula, quando se analisa células com alta intensidade da expressão de CD18 (CD18^{high}), destacada no gate 6 (Figura 7a e 7b).

Figura 7. Efeito da ouabaína sobre expressão da molécula de adesão CD18 em neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos



A expressão de CD18 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-CD18 e anti-Gr1 para identificação dos neutrófilos. Dot plot representativo das células marcadas com anti-Gr1 e anti-CD18 (a). O gate em Q6 representa a população Gr1⁺ com alta expressão de CD18. As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m, respectivamente, da porcentagem de neutrófilos Gr1⁺ que expressam CD18 (b). ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Dunnet (n=3).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Devido ao seu uso na clínica, o papel da ouabaína foi mais estudado em células cardíacas. No entanto, vários trabalhos demonstram o papel imunomodulador da ouabaína (ECHEVARRIA-LIMA e RUMJANEK, 2006; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2009; CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). Durante o processo inflamatório, ocorre o recrutamento de várias células, como os neutrófilos e os monócitos, do sangue para a região da inflamação. Estas células podem liberar moléculas inflamatórias, como citocinas, quimiocinas, ROS, enzimas proteolíticas, que podem causar danos teciduais (SERHAN; SAVILL, 2005). Assim, a regulação do recrutamento destas células e sua depuração são processos críticos na regulação da inflamação (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006).

Em outros modelos de inflamação induzida por zimosan (um componente polissacarídeo presente na parede de fungos *Saccharomyces cerevisiae*, composto principalmente por β -glucana em combinação com as proteínas quitina, manana e lipídios) *in vivo* foi observado que o tratamento com ouabaína reduziu a migração de neutrófilos para a região da inflamação, indicando, portanto sua atividade anti-inflamatória. Ademais, o tratamento apenas com ouabaína não interferiu no número de neutrófilos, o que indica, que no modelo de peritonite a ouabaína sozinha não age como substância inflamatória (LEITE, 2015). Estes dados corroboram DE VASCONCELOS et. al (2011), onde também foi evidenciado que o tratamento com ouabaína inibiu a migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por Concanavalina A (ConA), e que o tratamento apenas com ouabaína não interfere na transmigração destas células.

Estudos preliminares *in vitro* utilizando o modelo de *transwell* indicam que células da cavidade peritoneal, como macrófagos e linfócitos de camundongos tratados com ouabaína migram menos que células de animais que não receberam tratamento (LEITE, 2015). Estes dados corroboram os nossos resultados, mostrando a atividade anti-inflamatória da ouabaína, pois foi visto que a ouabaína em diferentes concentrações foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos estimulados pelo quimioatraente FMLP.

É sabido que a ouabaína é capaz de modular diversos aspectos do processo inflamatório (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). O processo de

migração dos leucócitos é dinâmico e envolve várias etapas em cascata acarretando na adesão. Essas etapas devem ser precisamente orquestradas para garantir uma resposta rápida, como o mínimo de dano ao tecido saudável (ERRANTE, 2011).

Resultados do nosso grupo evidenciaram a capacidade da ouabaína em reduzir o número de neutrófilos em vários modelos de inflamação como, peritonite e inflamação das vias aéreas (DE VASCONCELOS et al., 2011; GALVÃO et al., 2017; LEITE et al., 2015). Adicionalmente, a ouabaína reduz a migração de neutrófilos na lesão pulmonar aguda (LPA) e esse evento é um aspecto importante para o controle e resolução da LPA (SILVA, 2016). No entanto, não se conhecia o mecanismo no qual a ouabaína atuava para reduzir essa migração. Dentro desse contexto, uma das possibilidades seria a modulação da expressão da molécula de adesão CD18. A integrina CD18 pertence a subfamília $\beta 2$ (beta-2-integrina) e são encontradas em leucócitos podendo atuar como mediadoras da união dos leucócitos as células endoteliais por meio de ligações heterotípicas com moléculas da superfamília de imunoglobulinas (KIM, 2005). Nossos resultados evidenciaram que a ouabaína na concentração de 1nM foi capaz de reduzir a expressão da molécula de adesão CD18, o que pode estar associada com a capacidade da ouabaína de inibir a migração de neutrófilos para o sítio inflamado.

Os eventos de migração celular são mediados por citocinas, como a CXCL-8 em humanos e CXCL-1/2 em camundongos, que são quimiocinas pertencentes à família CXC, sendo um dos fatores quimiotáticos mais importantes para neutrófilos. A CXCL-8 apresenta alta afinidade para os receptores CXCR1 e CXCR2, que são co-expressos na membrana dos neutrófilos. Dessa forma, a ligação da CXCL-8 nos receptores CXCR1/2 é um elemento importante na migração destas células para o foco inflamatório, além de induzir degranulação e liberação de ROS favorecendo as atividades microbicidas destas células (MURPHY, 1997; PHAM, 2006; STILLIE et al., 2009).

De acordo com Stillie e colaboradores (2009), a CXCL-8 ao se ligar em seus receptores CXCR1/2, faz com que estes sejam rapidamente internalizados, por um processo de endocitose, onde o receptor é reciclado retornando a superfície da célula, este processo cíclico de reciclagem do receptor para CXCL-

8 é importante na via de sinalização desenvolvida por esta citocina em eventos inflamatórios.

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

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que a ouabaína possui um efeito anti-inflamatório devido sua ação inibitória na migração de neutrófilos, o que corrobora com os dados presentes na literatura. Ademais, a partir da implementação do método de *transwell* no laboratório de imunobiotecnologia, pode-se estudar melhor o efeito da ouabaína migração de neutrófilos ou outras células, bem como outras moléculas que podem ser estudadas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Na investigação do efeito imunomodulador da ouabaína na migração de neutrófilos, pode-se concluir que o método implantado se mostrou funcional, uma vez que houve migração de neutrófilos e que a ouabaína foi capaz de reduzir a migração dessas células. Ademais, através dos dados obtidos podemos estudar a migração celular e que o efeito inibitório da ouabaína na migração de neutrófilos pode ser relacionado com a redução da expressão da integrina CD18.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**. 68(1):202-9, 2007.

BAUER N, MULLER-EHMSSEN J, KRAMER U, HAMBARCHIAN N, ZOBEL C, SCHWINGER RH, NEU H, KIRCH U, GRUNBAUM EG, SCHONER W. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition, **Hypertension**, v. 45, n.5, p. 1024-8, 2005.

BERETA, J., COHEN, M. C., AND BERETA, M. Stimulatory effect of ouabain on VCAM-1 and iNOS expression in murine endothelial cells: involvement of NF-kB. **FEBS Letters**. 377, 21–25. 1995.

BLAUSTEIN, M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. C1367- C1387, 1993.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

CAVALCANTE-SILVA LHA, LIMA ÉA, CARVALHO DCM, SALES-NETO JM, ALVES AKA, GALVÃO JGFM, SILVA JSF AND RODRIGUES-MASCARENHAS S Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. **Frontiers in Physiology**. 8:895. 2017.

CHIZZOLINI, C.; BREMBILLA, N. C. Prostaglandin E2: igniting the fire. **Immunology & Cell Biology**., v. 87, p. 510–511. 2009.

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

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

ERRANTE, P.R; FRAZÃO, J.B; CONDINO-NETO, A; Deficiência da adesão leucocitária tipo 1. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. Vol. 34. N° 6. 2011.

FENG, S., CHEN, W., CAO, D., BIAN, J., AND GONG, F. Y., CHENG., W., Involvement of Na(+), K (+)-ATPase and its inhibitors in HuR-mediated cytokine mRNA stabilization in lung epithelial cells. **Cellular and Molecular Life Science**. 68, 109–124, 2011.

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

FILIPPO, K.; HENDERSON, R. B.; LASCHINGER, M.; HOGG, N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. **The Journal of Immunology**, v.180, p. 4308-15, 2008.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets - Inflammation and allergy**. v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GALVÃO, J. G. F. M., CAVALCANTE-SILVA, L. H. A., CARVALHO, D. C. M., FERREIRA, L. K. D. P., MONTEIRO, T. M., ALVES, A. F., ET AL. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation**. Res. 66, 1117–1130. 2017.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F., Burth, P., Silva, A. R., deMoraes, I.M., Oliveira, F. M., Santelli, R. E., et al. Murine lung injury caused by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein, a specific Na/K-ATPase inhibitor. **Respiration** Res.15:93. 2014.

HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; DUCHARME, D. W.; HARRIS, D. W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; LUDENS, J. H.. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 6259-63, 1991.

JACOB, P. L.; LEITE, J. A.; ALVES, A. K.; RODRIGUES, Y. K.; AMORIM, F. M.; NÉRIS, P. L.; OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania amazonensis*-infected Swiss mice. **Parasitology Research**., v. 112, p. 1313-21, 2013

JUNG U, NORMAN KE, SCHARFFETTER- KOCHANNEK K, BEAUDET AL, LEY K: Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. **Journal of Clinical Investigation** v.102, p.1526–1533.1998.

JUSTUS, C.R. *et al.* In vitro Cell Migration and Invasion Assays **Journal of Visualized Experiments**, 2014.

KANSAS, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood**. v. 88, p. 3259-3287., 1996.

KIM CH. The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. **Current Opinion in Hematology**. 12:298-304. 2005.

LACROIX-LAMANDÉ, S., D'ANDON, M. F., MICHEL, E., RATET, G., PHILPOTT, D. J., GIRARDIN, S. E., *et al.* Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. **The Journal of Immunology**. 188, 2805–2814. 2012.

LAGARRIGUE, F.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. **Blood**, v. 128, n. 4, p. 479–488, 2017.

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

LAREDO, J; HAMILTON, BP; HAMLIN, JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zone glomerulosa and zona fasciculata. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 212, n. 2 p. 487-493, 1995.

LEITE, J. A., ALVES, A. K., GALVÃO, J. G., TEIXEIRA, M. P., CAVALCANTE-SILVA, L. H., SCAVONE, C. *et al.* Ouabain modulates zymosan-induced peritonitis in mice. **Mediators of Inflammation**. 2015:265798, 2015.

LIU, N., LI, Y., SU, S., WANG, N., WANG, H., AND LI, J. Inhibition of cell migration by ouabain in the A549 human lung cancer cell line. **Oncology Letters** 6, 475–479. 2013.

LUENGO, M. B. A. historical revision of the main immunological events and pharmacology in these arch of the understanding and treatment of inflammatory diseases. **Revista Eletrônica de Farmácia**; Vol 2 (2), p.64-72, 2005.

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.

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

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

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

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

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

NINSONTIA, C., AND CHANVORACHOTE, P. Ouabain mediates integrin switch in human lung cancer cells. **Anticancer Research**. 34, 5495–5502. 2014.

PAIVA, L. S. et al. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, p. 1038-43, 2011.

PAMNANI, M. B.; BUGGY, J.; HUOT, S. J.; HADDY, F. J. Studies on the role of a humoral sodium-transport inhibitor and the anteroventral third ventricle (AV3V) in experimental low-renin hypertension. **Clinical Science**, v. 61, 57s-60s, 1981.

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

PONGRAKHANANON, V., CHUNHACHA, P., AND CHANVORACHOTE, P. Ouabain suppresses the migratory behavior of lung cancer cells. **PLOS ONE** 8:e68623. 2013.

PRUENSTER, M. et al. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. **Nature Immunol.** v.10, p.101–108. 2009.

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

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. et al. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life Sciences** v. 73, p. 1037-51, 2003

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. et al. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell Biology International**., v. 32, p. 1323-8, 2008.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. et al. Modulation of the immune system by ouabain. **Annals of the New York Academy of Sciences**., v. 1153, p. 153-63, 2009

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. **Annual Review of Immunology**., v. 22, p. 891-928, 2004.

SADIK, C. D., KIM, N. D. & LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**. v. 32, p. 452–460. 2011.

SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature Immunology**., v. 9, p. 949-52, 2008.

SANZ, M. J. & KUBES, P. Neutrophil-active chemokines in *in vivo* imaging of neutrophil trafficking. **European Journal of Immunology**. v. 42, p. 278–283. 2012.

SCOTT, A. *et al.* What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? **British Journal of Sports Medicine**. 38(3): 248–249., 2004.

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

SCHNOOR, M. Endothelial Actin-Binding Proteins and Actin Dynamics in Leukocyte Transendothelial Migration. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3535–3541, 2015.

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

SHAH, JR; LAREDO, J; HAMILTON, BP; HAMLYN, JM. Different signaling pathways mediates stimulated secretion of endogenous ouabain and aldosterone from bovine adrenocortical cells. **Hypertension**, v. 31p, 463-468, 1999.

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

SHIN, H. K., Ryu, B. J., Choi, S.-W., Kim, S. H., and Lee, K. Inactivation of Src-to-ezrin pathway: a possible mechanism in the ouabainmediated inhibition of A549 cell migration. **Biomed Research International** 2015:537136, 2015.

SIGAL, A.; BLEIJS, D. A.; GRABOVSKY, V.; van VLIET, S. J.; DWIR, O., FIGDOR, C. G.; van KOOYK, Y.; ALON, R. The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 442–452, 2000.

SILVA, J. S. F. **Efeito anti-inflamatório de ouabaína em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por Ips**. Dissertação.(Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. 2016.

STEEBER DA, CAMPBELL MA, BASIT A, LEY K, TEDDER TF: Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.7562–7567, 1998.

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

TAKADA, Y., MATSUO, K., OGURA, H., BAI, L., TOKI, A., WANG, L., et al. Odoroside A and ouabain inhibit Na⁺/K⁺-ATPase and prevent NFkappaB inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport. **Biochemical Pharmacology**. 78, 1157–1166, 2009.

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, p. 1-10, 2014.

VALENTE, R. C.; NASCIMENTO, C. R.; ARAUJO, E. G.; RUMJANEK, V. M. mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of epithelial growth factor receptor and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 4, p. 228-36, 2009.

VASCONCELOS, D. I.; LEITE, J. A.; CARNEIRO, L. T.; PIUVEZAM, M. R.; LIMA, M. R.; MORAIS, L. C.; RUMJANEK, V. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

WILLIAMS, M. R., AZCUTIA, V., NEWTON, G., ALCAIDE, P. & LUSCINSKAS, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends Immunology**, v. 32, p. 461–469, 2011.

YAMADA, K.; GOTO, A.; NAGOSHI, H.; TERANO, Y.; OMATA, M. Elevation of ouabain like compound levels with hypertonic sodium chloride load in rat plasma and tissues. **Hypertension**, v. 30, p. 94-98, 1997.

ZLOTNIK, A., YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, p. 121-7, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



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



CERTIFICADO (2ª VIA)

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo do mecanismo de ação envolvido no efeito anti-inflamatório da ouabaína" protocolo nº 039/2015 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB). Com aprovação de Adendo em reunião de 05/10/2017.

Vigência do Projeto	2015 - 2020
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	351 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas/ 25 - 30 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB