



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OUABAÍNA NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO PULMONAR ALÉRGICO**

**JOÃO PESSOA - PB
2016**

DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OUABAÍNA NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO PULMONAR ALÉRGICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

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

**JOÃO PESSOA - PB
2016**

C331d Carvalho, Deyse Cristina Madruga.
Avaliação do efeito da ouabaína no processo inflamatório pulmonar alérgico / Deyse Cristina Madruga Carvalho.- João Pessoa, 2016.
50f. : il.
Orientadora: Sandra Rodrigues Mascarenhas
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Esteróide cardiotônico. 3. IgE.
4. Citocinas.

UFPB/BC

CDU: 60(043.2)

DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OUABAÍNA NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO PULMONAR ALÉRGICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Orientadora)**

**Profa. Dra. Fabíola da Cruz Nunes
(Examinadora)**

**Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos
(Examinador)**

*Dedico com muito carinho aos meus pais,
por todo apoio, amor e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela minha vida e pela oportunidade que tenho a cada dia de tentar me tornar uma pessoa melhor.

À toda a **minha família**, principalmente aos meu pais, **Elza e Wivonaldo**, por me ensinarem a ser uma cidadã de bem e por todo esforço que fizeram e fazem para que eu e **meu irmão** tenhamos sempre o melhor. Vocês são o meu maior exemplo, devo tudo a vocês.

Ao meu namorado, **Erick**, companheiro de vida, por toda amizade, amor e confiança. Obrigada por sempre estar presente e me incentivando em tudo na minha vida. Amo você!

À minha querida orientadora, **Sandra Rodrigues Mascarenhas**, por ter feito me apaixonar pela imunologia e por todos os ensinamentos, incentivo, paciência e dedicação. Obrigada por ser a melhor orientadora!

A todos que fazem parte do laboratório de Imunobiologia, em especial aqueles que me ajudaram diretamente na aprendizagem e realização dessa pesquisa, **José Guilherme, Luiz, Laércia e Talissa**. E ao grupo de pós-graduandos e de iniciação científica da professora Sandra pela amizade e carinho, em especial **Éssia e Júlia**.

A todos meus colegas de turma, por todos esses anos de convivência, estudos e brincadeiras, em especial as minhas eternas amigas, **Fany, Eduarda e Éssia**, por toda amizade, leserias, risadas, estudos e companheirismo de todas as manhãs.

Aos professores membros da Banca Examinadora, **Fabíola da Cruz Nunes e Rafael de Almeida Travassos**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho, e além disso, pelos esforços que fizeram para me ajudar no término da graduação junto a minha turma 2012.1. Agradeço imensamente.

A todos os meus professores da graduação em Biotecnologia por todo conhecimento transmitido e pela contribuição na minha formação.

Aos meus colegas de apartamento, em especial **Raylan e Iago**, por sempre estarem na torcida por mim. As minhas queridas primas, **Gaby e Flavinha**, que são mais que primas, pois nossos laços de amor vêm de outras vidas. E aos meus queridos amigos de ensino médio e da vida, por sempre acreditarem no meu potencial, **Lidiane, Ana Lúcia e Mikeas**.

A **José Crispim** por toda sua dedicação ao biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e pela sua disponibilidade em ajudar.

E a todos que não citei, mas que fizeram parte dessa conquista.

Muito obrigada!

"O Cristo não pediu muita coisa, não exigiu que as pessoas escalassem o Everest ou fizessem grandes sacrifícios. Ele só pediu que nos amássemos uns aos outros."

Chico Xavier

RESUMO

Ouabaína, um potente inibidor da Na⁺/K⁺-ATPase, foi identificado como uma substância endógena circulante no plasma de mamíferos superiores. Recentemente, foi mostrado que a ouabaína afeta vários processos imunológicos. Nosso grupo tem demonstrado a capacidade da ouabaína em modular a inflamação aguda, porém seu possível papel em inflamações alérgicas ainda não foi relatado. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da ouabaína no processo inflamatório pulmonar alérgico. Para isto, foi utilizado o modelo de inflamação pulmonar induzido por ovalbumina (OVA) e foram analisados a migração celular, os níveis de IL-4 e níveis de IgE OVA-específica no lavado broncoalveolar (BAL). O tratamento intraperitoneal da ouabaína foi realizado antes do protocolo com OVA. Camundongos BALB/c foram sensibilizados intraperitonealmente (i.p.) com OVA nos dias 0 e 12. Do dia 19 ao dia 22 estes animais foram desafiados diariamente por 30 min com aerossol de OVA em solução salina. Após vinte e quatro horas do último desafio foi coletado o lavado broncoalveolar (BAL). Foi observado que o tratamento com a ouabaína reduziu significativamente tanto as células totais quanto o número de neutrófilos e eosinófilos no BAL comparado com o grupo desafiado com OVA não tratado. Além disso, o BAL dos camundongos desafiados e sensibilizados com OVA apresentaram aumento na concentração de IL-4 em comparação com os camundongos não estimulados, já o tratamento com a ouabaína reduziu as concentrações de IL-4 no BAL. Adicionalmente, os níveis de IgE em camundongos previamente tratados com ouabaína e sensibilizados e desafiados com OVA diminuíram. De acordo com os dados, a ouabaína foi capaz de modular a inflamação pulmonar alérgica por reduzir a migração de eosinófilos, níveis de IL-4 e IgE, sugerindo um novo modo de ação dessa substância.

Palavras-chave: Esteroide cardiotônico. IgE. Citocinas.

ABSTRACT

Ouabain, a potent inhibitor of the Na⁺/ K⁺-ATPase, was identified as an endogenous substance circulating in the plasma of higher mammals. Recently, ouabain was shown to affect several immunological processes. Our group has demonstrated the ouabain ability to modulate acute inflammation, but its possible role in allergic inflammation has not been reported before. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of ouabain in the inflammatory pulmonary allergic process. For this, pulmonary allergic inflammation induced by ovalbumin (OVA) model was used. Cell migration, IL-4 and IgE OVA-specific levels in the bronchoalveolar lavage (BAL) were analyzed. Ouabain intraperitoneal treatment was performed before the protocol with OVA. BALB/c mice were sensitized intraperitoneally (i.p.) with OVA on days 0 and 12. From day 19 to day 22, these animals were challenged daily for 30 min with OVA in saline by aerosol. Twenty-four hours after the last challenge bronchoalveolar lavage (BAL) was collected. It was observed ouabain treatment significantly reduced both total cell, neutrophils and eosinophils numbers in the BAL compared with the untreated OVA-challenged group. Furthermore, the BAL of mice sensitized and challenged with OVA showed an increase in IL-4 concentration compared to unstimulated mice, and ouabain treatment decreased IL-4 BAL concentrations. Additionally, the IgE levels in mice previously treated with ouabain sensitized and challenged with OVA decreased. According to the data, ouabain was able to modulate the pulmonary allergic inflammation by reducing migration eosinophils, IL-4 and IgE levels, suggesting a new mode of action of this substance.

Keywords: Cardiotonic steroid. IgE. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da ouabaína	14
Figura 2 – Mecanismo molecular e celular da inflamação alérgica	20
Figura 3 – Distribuição dos grupos	25
Figura 4 – Protocolo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA	26
Figura 5 – Efeito da ouabaína na celularidade total do lavado broncoalveolar	30
Figura 6 – Efeito da ouabaína no número de neutrófilos do lavado broncoalveolar.....	31
Figura 7 – Efeito da ouabaína no número de eosinófilos do lavado broncoalveolar.....	32
Figura 8 – Análise da migração de granulócitos do lavado broncoalveolar.....	33
Figura 9 – Efeito da ouabaína nos níveis da citocina IL-4 do lavado broncoalveolar.....	34
Figura 10 – Efeito da ouabaína no título de IgE-OVA-específica	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AV3V	Região anteroventral do terceiro ventrículo
BAL	Lavado broncoalveolar
CD	Do inglês “ <i>cluster of differentiation</i> ”
DEXA	Dexametasona
ELISA	Do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
e.p.m.	Erro padrão da média
ERK	Do inglês “extracellular signal – <i>regulated kinase</i> ”
FACS	Do inglês “fluorescente-activated” classificador de células
Fc	Receptor do tipo Fc
FSC	Tamanho celular
HBSS	Do inglês “Hank’s balanced salt solution”
HLA-DR	Do inglês “human leukocyte antigen”
i.d.	Intradérmica
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
JNK	Do inglês “c-Jun N-terminal kinases”
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
n	Número de animais
Na⁺/K⁺ - ATPase	Bomba de sódio e potássio ATPase
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NFAT	Fator nuclear de ativação de células T
NK	Células natural <i>killer</i>
OUA*	Ouabaína
OVA	Ovalbumina
p38	Proteína quinase ativadora de mitógeno p38
PAF	Fator de ativação plaquetária

PBS	Solução fosfato tamponado
PBST	Solução fosfato tamponado contendo tween
PGs	Prostaglandinas
r.p.m.	Rotação por minuto
SAL	Salina
SBF	Soro fetal bovino
SSC	Granulosidade
TH0	Célula T naive
TH2	Célula T tipo 2
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Ouabaína	14
1.2 Efeito da ouabaína no sistema imunológico.....	16
1.3 Inflamação pulmonar alérgica.....	18
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivo específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Material	24
3.1.1 Animais.....	24
3.1.2 Drogas utilizadas	24
3.2 Métodos	24
3.2.1 Separação dos animais em grupos.....	24
3.2.2 Pré-tratamento com ouabaína	25
3.2.3 Inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA.....	25
3.2.4 Coleta do lavado broncoalveolar.....	26
3.2.5 Contagem de células total e diferencial	27
3.2.6 Análise de citometria de fluxo de células do lavado broncoalveolar	27
3.2.7 Ensaio imunoenzimático para a dosagem de IL-4	27
3.2.8 Teste de anafilaxia cutânea passiva – PCA.....	28
3.2.9 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	30

4.1 Efeito da ouabaína na migração de células totais do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica	30
4.2 Efeito da ouabaína na migração de neutrófilos do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica	31
4.3 Efeito da ouabaína na migração de eosinófilos do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica	32
4.4 Avaliação do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células presentes no lavado broncoalveolar	33
4.5 Efeito da ouabaína sobre os níveis da citocina IL-4 do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica	34
4.6 Efeito da ouabaína sobre o título de IgE-OVA-específica na inflamação pulmonar alérgica.....	35
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) ..	49
ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA <i>IMMUNOBIOLOGY</i>	50

que os digitálicos, assim como a ouabaína, atuavam inibindo a bomba de Na^+/K^+ , uma proteína que estabelece um gradiente eletroquímico através da membrana (SHATZMANN, 1953). Em seguida, no ano de 1960, a descoberta do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no músculo cardíaco de mamíferos levou à conclusão de que a inibição da bomba de sódio e potássio por digitálicos leva a um aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} como um evento secundário, que por sua vez resulta na contração cardíaca (SCHONER, 2002).

Estudos demonstram que a ouabaína é sintetizada pela adrenal, hipotálamo, hipófise e na região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), podendo ser identificada no plasma humano em concentrações de 50pM a 80nM (FERRANDI et al., 1997; GOTO et al., 1992; HAMLIN et al., 1991; PAMNANI et al., 1981; SCHONER et al., 2003). Sugere-se que a sua secreção possivelmente esteja direcionada ao metabolismo de hormônios esteroides (HAMLIN et al., 2003). Assim, existem muitas evidências que a ouabaína seja um novo hormônio esteroide do hipotálamo e córtex supra-renal (SCHONER, 2002).

Diversas evidências demonstram que a secreção de ouabaína pode se alterar de acordo com o estado fisiológico em que se encontra o organismo. Existem vários eventos, tanto fisiológicos como patológicos que podem modificar os níveis endógenos desse digitálico. Foram encontrados em pacientes hipertensos níveis elevados de ouabaína (SCHONER, 2000) assim como em diferentes modelos de ratos com hipertensão (ROSSONI et al., 2003; WENCESLAU et al., 2011; XAVIER et al., 2004). A ouabaína também pode atuar na resposta do organismo ao estresse agudo, pois se observou que o exercício físico tem capacidade de aumentar os níveis de ouabaína em ratos, cachorros e seres humanos minutos depois do início da atividade física (GOTO et al., 1992; LEITE, 2012).

Nos últimos anos, a ouabaína tem sido bastante estudada por sua capacidade de interferir em vários mecanismos mantenedores e reguladores da homeostase do organismo (BAGROV; SHAPIRO, 2008). Devido ao seu uso na clínica o efeito da ouabaína no organismo foi mais estudado em células cardíacas e renais, no entanto, vários trabalhos vêm evidenciando o papel imunomodulador desse digitálico (DE PAIVA et al., 2011; DE VASCONCELOS et al., 2011; LEITE et al., 2015; ECHEVARRIA-LIMA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2014; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008).

1.2 Efeito da ouabaína no sistema imunológico

O organismo é protegido de agentes infecciosos e de outras substâncias nocivas, por uma variedade de células efetoras e moléculas, que juntas constituem o sistema imune (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Assim, o sistema imunológico é composto por uma rede de órgãos, células e moléculas que são capazes de manter a homeostasia do organismo (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). A resposta imune pode ser modulada por substâncias ativas que tenham capacidade de reprimir as respostas indesejadas resultantes de uma inflamação, autoimunidade, alergia, rejeição de transplante e em adição podem estimular as respostas de proteção contra agentes patogênicos (CHAUSSABEL; PASCUAL; BANCHEREAU, 2010). A ouabaína, por sua vez é capaz de interferir em diversos aspectos da resposta imunológica (ECHEVARRIA – LIMA; RUMJANEK, 2006; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2009).

Foi demonstrado pelo nosso grupo que a ouabaína é capaz de modular negativamente a resposta inflamatória peritoneal aguda em camundongos *swiss* infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* por reduzir a migração de células totais no local infectado e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (JACOB et al., 2012). Adicionalmente, foi relatado que a ouabaína é capaz de induzir a expressão de CD69, uma molécula presente na maturação dos linfócitos T, em timócitos murinos, mediante o aumento de Ca^{2+} no meio intracelular (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003). Além disso, outros dados indicam que a ouabaína tem capacidade de inibir a proliferação dos timócitos (células precursoras dos linfócitos T) desencadeada por concanavalina-A (SZAMEL; SCHNEIDER; RESCH, 1981). Este efeito pode estar envolvido com a sua capacidade em reduzir a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) e os níveis do fator nuclear de ativação (NFAT), moléculas importantes na regulação de citocinas pró-inflamatórias, bem como na expressão de enzimas que participam no desenvolvimento da inflamação (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008).

Além de modular a maturação de timócitos, foi demonstrado que a ouabaína também tem efeito na maturação de células dendríticas por aumentar a expressão de CD86 e HLA-DR (NASCIMENTO et al., 2014).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao sítio da inflamação. Essas células são caracterizadas pela liberação de enzimas líticas presentes em seus

grânulos com grande potencial antimicrobiano e por possuírem a capacidade de atuar como fagócitos (BORREGAARD, 2010; NATHAN, 2006). Resultados evidenciaram a capacidade da ouabaína em reduzir o número de neutrófilos, no modelo de peritonite induzido por concanavalina-A (DE VASCONCELOS et al., 2011). Neste trabalho, a ouabaína também apresentou atividade antiedematogênica e antinociceptiva relacionada à inibição de mediadores como a prostaglandina e a bradicinina.

Citocinas inflamatórias, a exemplo de TNF- α e IL-1 β , ativam o fator de transcrição NF- κ B, induzindo a expressão de vários genes inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (TAKADA et al., 2009). Estudos recentes têm evidenciado que alguns glicosídeos cardiotônicos, incluindo digoxina, ouabaína e odorosideo A, são capazes de inibir a via de sinalização do TNF/NF- κ B, responsável pela produção de fatores pró-inflamatórios (YANG et al., 2005). Dentro desse contexto, foi verificado em nosso laboratório que ouabaína é capaz de modular etapas moleculares dos eventos que levam a inflamação aguda característica da peritonite induzida por zymosan, ao reduzir IL-1 β , TNF- α e número de células peritoneais que migram para o sítio inflamado. Esses eventos estão relacionados com a capacidade da substância tem de inibir ativação do NF- κ B e o consequente extravasamento leucocitário no processo (LEITE et al., 2015).

Os progenitores linfoides dão origem aos linfócitos T, B e células NK. As células que vão se diferenciar em linfócitos T (LT) deixam a medula óssea e migram para o timo, onde ocorre seu amadurecimento. As células, que vão se diferenciar em linfócitos B (LB), permanecem na medula óssea, onde sofrem processos de diferenciação e maturação (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). O processo de diferenciação dos linfócitos B pode ser modulado por hormônios esteroidais (GARVY et al., 1993). Foi demonstrado que o tratamento da ouabaína por três dias consecutivos é capaz de alterar a maturação dos linfócitos B, uma vez que foi verificado uma diminuição no número de LB maduros na medula óssea, baço e sangue periférico (DE PAIVA et al., 2011). Além desse trabalho, vários outros estudos vem relatando que a ouabaína exerce efeitos inibitórios sobre a proliferação linfocitária induzida por diversos estímulos (DE MORAES et al., 1989; OLEJ et al., 1998; QUASTEL; KAPLAN, 1968).

O papel da ouabaína no organismo ainda é pouco compreendido. Evidências crescentes têm demonstrado que este glicosídeo cardiotônico possui a capacidade de

interferir em diversos aspectos da resposta inflamatória aguda. Porém, os efeitos da ouabaína em processos inflamatórios alérgicos não foram devidamente explorados.

1.3 Inflamação pulmonar alérgica

A inflamação é uma resposta imune reconhecida como um processo benéfico, visto que visa estabelecer a homeostasia do organismo, porém quando em excesso pode tornar-se prejudicial. Portanto pode ser entendida como uma resposta de adaptação ao desequilíbrio homeostático. Adicionalmente, a inflamação está relacionada no desenvolvimento de várias doenças, tais como, artrite reumatoide, câncer, hipertensão, obesidade e asma (NATHAN; DING, 2010). Assim, diversos fatores podem dar início a um processo inflamatório, como por exemplo, infecções microbianas e virais; radiação e substâncias químicas ou tóxicas; ou exposição à alérgenos (AGGARWAL; GEHLOT, 2009; SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010).

Doenças alérgicas estão presentes na população em geral e estão relacionadas à sensibilização a alérgenos do ambiente, como alimentos, polens, ácaros, fungos, insetos, medicamentos, entre outros. A presença de anticorpos IgE específico é o que provoca as manifestações alérgicas (DAHER et al., 2009). Uma das doenças pulmonares alérgicas mais comum nos dias de hoje é a asma.

A asma é uma doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo. Esta doença é classificada por uma hipersensibilidade tipo I - imediata e está associada a uma gama de sintomas que são caracterizados por inflamação das vias aéreas, broncoconstrição e a hiperresponsividade das vias aéreas (SHAHID, 2013; WANNER; MENDES, 2010).

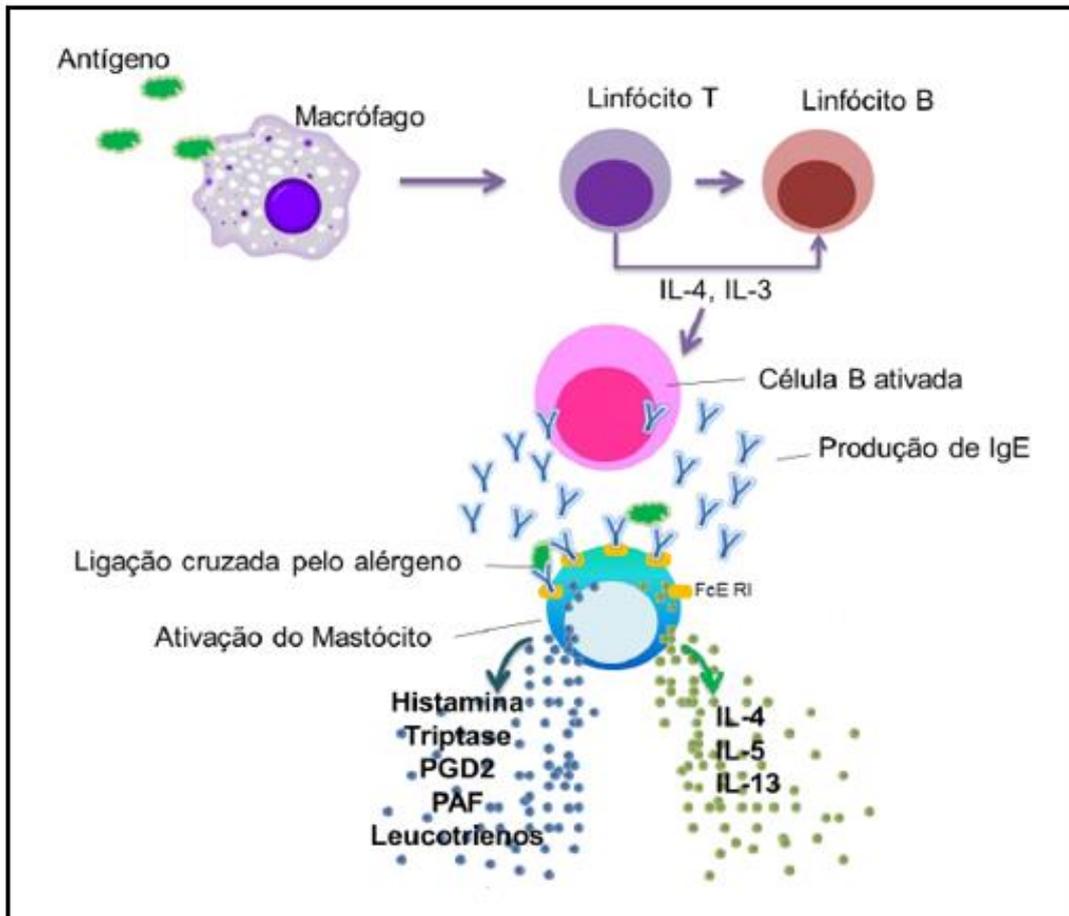
Alergia e asma possuem traços genéticos complexos, onde cada fator ambiental, interage com fatores genéticos para influenciar seu desenvolvimento (GIRODET et al., 2011). A resposta imune na asma alérgica é caracterizada pelo envolvimento de IgE específica e células T helper 2 - Th 2 (GALLI; TSAI; ADRIAN, 2008).

As células Th2 estão presentes no pulmão de pacientes com asma, especialmente pacientes com asma alérgica. Diversos estudos relatam que na asma leve e moderada as células Th2 dominam as vias aéreas, e que essas células são essenciais para o desenvolvimento da inflamação característica da asma (HOGAN et al., 2008; HORNER, 2010).

O modelo teórico atual propõe que esse processo inflamatório ocorre, primariamente, em resposta à inalação de um antígeno, em geral, um aeroalergênio. No primeiro contato com o organismo, o alérgeno é captado, processado e internalizado por células dendríticas, situadas no epitélio e submucosas das vias aéreas (HAMMAD; LAMBRECHT, 2006; VON GARNIER et al., 2005). Com o auxílio do Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II (MHC-II), ocorre a apresentação e ativação, aos linfócitos T auxiliares (LT helper – Th0), que são cruciais para a ativação e sua diferenciação em linfócitos do tipo Th2 (LLOYD; HESSEL, 2010). As células Th2, por sua vez, passam a sintetizar citocinas as quais promovem a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Esses, na presença de citocinas tais como IL-4 e IL-13, favorecem a troca de isotipo das imunoglobulinas em IgE. Posteriormente as IgE produzidas irão ligar-se aos receptores de alta afinidade do tipo FcεRI, que estão presentes na membrana celular de mastócitos pulmonares (PALMQVIST; WARDLAW; BRADDING, 2007) (Figura 2).

O contato subsequente do mesmo alérgeno com as IgEs presentes na superfície dos mastócitos, promoverá o “Cross Linking” através de uma reação antígeno-anticorpo, provocando a degranulação dos mastócitos e a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, derivados dos fosfolípidicos de membrana (serotonina, leucotrienos, prostaglandinas, fator de ativação plaquetária - PAF), capazes de causar contração do músculo liso brônquico e inflamação da mucosa respiratória ou seja, provocar broncoespasmo e edema (BARNES, 2008; EDWARDS et al., 2012; MCKAY et al., 2004) (Figura 2).

Figura 2 – Mecanismo molecular e celular da inflamação alérgica



Fonte: Adaptado de CAVALCANTI, 2014.

A fase efetora da resposta imunológica induzida por IgE se desenvolve além da fase de degranulação incluindo a fase de reações tardias que ocorrem dentro de horas ou dias de exposição ao alérgeno e são dependentes da expressão de várias citocinas e outros mediadores (WILLIAMS; GALLI, 2000). Posteriormente instalação do processo inflamatório característico da asma, ocorre a migração de células para as vias aéreas. Essas células presentes nos linfonodos regionais são em seguida recrutadas para as vias aéreas através de proteínas quimioatraentes, denominadas quimiocinas, produzidas por diferentes células presentes no pulmão dos indivíduos asmáticos (JAMES; CARROLL, 2000). A resposta tardia se desenvolve como resultado da regulação de citocinas, quimiocinas e de moléculas de adesão que ativam e recrutam células inflamatórias, principalmente os eosinófilos, basófilos, linfócitos, além dos neutrófilos e macrófagos para o sítio onde ocorreu o contato (SHAKOORY et al., 2004; TODO-BOM; PINTO, 2006).

Os eosinófilos estão intimamente associados com a patogênese da alergia, especificamente no trato respiratório com o desenvolvimento da asma alérgica (BOCHNER; BUSSE, 2005). Vários trabalhos já relataram que os eosinófilos não estão presentes apenas na parede das vias aéreas durante a asma, mas também são encontrados em grande número no escarro e no fluído do lavado broncoalveolar (BAL) (KAY, 2005; LEMIERE et al., 2006; PALMQVIST; WARDLAW; BRADDING, 2007; VIEIRA et al., 2012). O prolongamento da ativação e recrutamento dos eosinófilos está relacionado a gravidade da asma e é provável que estes sejam diretamente os responsáveis por muitos dos sinais e sintomas dessa doença (SEMINARIO; GLEICH, 1994; VENGE, 1995).

Eosinófilos são leucócitos multifuncionais que estão ativamente envolvidos na asma através da regulação de respostas imunes de tipo Th2 (AKUTHOTA; XENAKIS; WELLER, 2011). Esse tipo celular, é gerado na medula óssea, distribuído aos tecidos pela corrente sanguínea e recrutados para a parede brônquica através de uma série de processos. Logo após inalações de alérgenos, os mastócitos liberam citocinas e fatores quimiotáticos, os quais aumentam a eosinopoiese, aumentam a sua quimiotaxia, a expressão de moléculas de adesão e favorecem o aumento da expressão dos seus ligantes pelos eosinófilos. Na mucosa brônquica, os eosinófilos são ativados e liberam mediadores lipídicos e citocinas imunorreguladoras que aumentam o processo inflamatório (LAVIOLETTE et al., 1994).

Os eosinófilos podem sintetizar e segregar importantes citocinas inflamatórias e regulatórias, quimiocinas, e fatores de crescimento. Muitas dessas citocinas são potentes indutores de respostas imune na asma, eczema, rinite e outras doenças inflamatórias (KAY et al., 2004). Além disso, essas citocinas são armazenadas em grânulos cristalóides e pequenas vesículas secretoras, que possuem bioatividade em sua liberação (LACY; MOQBEL, 2000). Essas moléculas liberadas pelos eosinófilos têm atividades pró-inflamatórias que incluem ativação e regulação da permeabilidade vascular, aumento no sistema de adesão, secreção de muco e contração de músculo liso (HOGAN et al., 2008).

O mecanismo que regula a atividade e a acúmulo dos eosinófilos no pulmão asmático é provavelmente comandado por linfócitos T helper 2 (Th2). As células Th2 liberam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 além de induzirem a síntese de IgE por células B, participando, especialmente, no combate as alergias (BROIDE et al., 2010). Uma consequência da ativação desta célula é a produção de interleucina 5 (IL-5) que

estimula a produção de eosinófilos na medula óssea, a diferenciação, a maturação e mantém sua viabilidade (FLOOD-PAGE et al., 2003; KUCUKSEZER et al., 2013).

Como componentes chave na asma, o influxo de eosinófilos no pulmão durante a resposta inflamatória tem sido relatado como importante interveniente ao progresso do dano tecidual e remodelamento pulmonar (HUMBLES et al., 2004; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Assim, o eosinófilo tem funções importantes no processo inflamatório que é responsável pela doença asmática. A capacidade migratória das células do sistema imunológico é uma característica crucial da resposta imune, sendo um dos principais eventos que compõe a resposta fisiológica intrínseca à inflamação (LANG; RATKE, 2009).

A liberação de mediadores a partir das células inflamatórias, incluindo eosinófilos, linfócitos, mastócitos e macrófagos, tem contribuído diretamente ou indiretamente em alterações na estrutura e na função das vias aéreas (KRISHNAMOORTHY et al., 2012; MIKALSEN; HALVORSEN; OYMAR, 2014; VIG; FORSYTHE; VLIAGOFTIS, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da ouabaína no processo inflamatório pulmonar alérgico.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da ouabaína sobre a migração de células totais;
- Avaliar o efeito da ouabaína sobre a migração de células diferenciais;
- Avaliar o efeito da ouabaína sobre os níveis da interleucina- 4 (IL-4);
- Avaliar o efeito da ouabaína sobre o título de IgE-OVA-específica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c de 6 a 8 semanas, com peso corporal entre 20 e 30 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e mantidos com livre acesso a água e a uma dieta controlada a base de ração do tipo *pellets* em uma sala com temperatura entre $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, e ciclos claro/escuro de 12h. Os animais foram manuseados conforme o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do Cbiotec- UFPB sob o número 110/15.

3.1.2 Drogas utilizadas

Foram utilizadas as drogas: ouabaína e ovalbumina (OVA grade II e V), ambas obtidas na *Sigma-Aldrich*, dexametasona, xilasina e quetamina.

3.2 Métodos

3.2.1 Separação dos animais em grupos

Os camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos (n=5): controle negativo (não sensibilizado com OVA) ou salina, controle positivo (sensibilizado com OVA) ou ovalbumina, dexametasona (2 mg/kg por via intraperitoneal i.p.) e ouabaína (0,56 mg/kg por via intraperitoneal i.p.). O grupo salina recebeu o veículo durante os tratamentos pela mesma via de administração que os demais grupos (Quadro 1).

Figura 3 – Distribuição dos grupos

GRUPO SALINA	GRUPO OVALBUMINA
Não sensibilizado Tratado com solução salina	Sensibilizado e Desafiado com OVA
GRUPO OUABAÍNA	GRUPO DEXAMETASONA
Sensibilizado e desafiado com OVA Tratado com ouabaína	Sensibilizado e desafiado com OVA Tratado com dexametasona

Fonte: CARVALHO, 2016.

3.2.2 Pré-tratamento com ouabaína

Para avaliar o efeito da ouabaína na inflamação pulmonar alérgica, dois dias antes de cada sensibilização com OVA, os camundongos foram pré-tratados com injeções intraperitoneais (i.p.) durante três dias consecutivos, contendo 200 µL de ouabaína (0,56 mg/kg) ou salina, a fim de sofrerem o mesmo estresse. As sensibilizações foram efetuadas uma hora após o último dia de pré-tratamento.

3.2.3 Inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA

O protocolo experimental ocorreu em 23 dias. Os animais foram sensibilizados via a injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,2 mL de uma suspensão contendo 10 µg de ovalbumina grade V e 0,2 g de hidróxido de alumínio, no dia zero e no décimo segundo dia. No período entre os dias 19 a 22 após a sensibilização, os animais foram desafiados com aerossol de OVA (grade II sigma) 5% dissolvido em salina (NaCl a 0,9 %) durante 30 minutos em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultra-sônico (LLOYD, 2010). O pré-tratamento com a dexametasona foi feito uma hora antes de cada desafio, na dose de 2 mg/kg, utilizada como droga padrão, onde seus resultados serviram de comparativo no parâmetro imunológico de recrutamento de leucócitos no protocolo experimental. No 23º dia, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (xilazina 20

3.2.5 Contagem de células total e diferencial

Para a contagem total de células foi adicionado 30 µL da solução de Turk em 10µL do BAL (proporção de 1:4). Após a homogeneização, 10 µL da solução foram colocados em uma câmara de Neubauer, realizando-se a contagem das células totais no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS). Para contagem diferencial foram retirados 100 µL ou 150 µL de cada BAL e centrifugados na citocentrífuga do tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método de panótipo. A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X).

3.2.6 Análise de citometria de fluxo de células do lavado broncoalveolar

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para analisar a população de granulócitos. O BAL foi centrifugado a 1000 rpm à 4 °C por 5 minutos. Em seguida, o *pellet* foi utilizado para análise inespecífica das populações por citometria de fluxo (FACScan) através do tamanho relativo das células FSC (*Forward Scatter* – por difração da luz) e da granulosidade citoplasmáticas SSC (*Side Scatter* – por difusão da luz).

3.2.7 Ensaio imunoenzimático para dosagem de IL-4

A citocina IL-4 presente no lavado broncoalveolar (BAL) foi quantificada por ELISA sanduíche de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Para tal, a placa de ELISA (NUNC-Immuno™) foi sensibilizada com o anticorpo de captura, diluído em tampão fosfato pH 6.5 e incubada por 18 hr (overnight) a 4 °C. Após este período, a placa foi lavada 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, a placa foi lavada em PBST e adicionada tanto às amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações da citocina IL-4 para a realização da curva. A placa foi novamente incubada por 18 hrs (overnight) a 4 °C.

Terminado o período de incubação, a placa foi lavada e o anticorpo de detecção adicionado e em seguida incubada por uma hora. Posteriormente, a placa foi novamente lavada e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionado. A placa foi incubada por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com a solução de parada (ácido sulfúrico 1N) e a leitura realizada em leitor de placa (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm.

3.2.8 Teste de anafilaxia cutânea passiva - PCA

O título de IgE-OVA-específica foi determinado pelo teste de anafilaxia cutânea passiva. As amostras de soros dos camundongos obtidas do plexo braquial foram diluídas em salina. Para cada amostra foi realizada oito diluições seriadas (1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 e 1:4096) e um volume de 50 µL dessas amostras foi injetada por via intradérmica (i.d) em oito diferentes sítios do dorso de ratas Wistar depiladas e previamente anestesiadas com solução anestésica (xilasina 0,2% e quetamina 1,5%). Após 24 h, foi realizado o desafio antigênico nas caudas das ratas pela administração de 500µL de uma solução contendo o corante Azul de Evans (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) 1% e 2,0 mg de OVA grade V na veia caudal. Após 30 min, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os diâmetros das manchas formadas no dorso foram medidas. O título foi determinado pela maior diluição do soro capaz de promover mancha mensurável a 5 mm (HOLT et al., 1981), com o auxílio de uma régua de 20 cm.

3.2.9 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média ± e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste t ou análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados

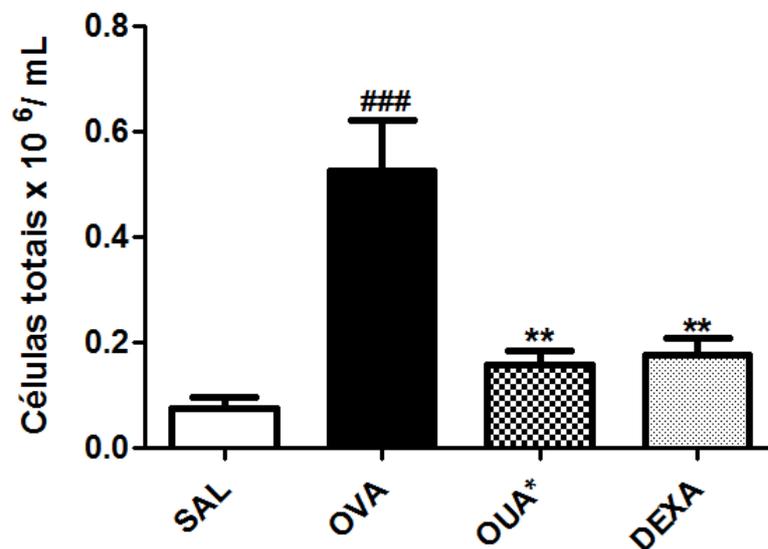
utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para analisar os dados do citômetro de fluxo foi utilizado o programa WinMDI 2.9.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da ouabaína na migração de células totais do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica

Como mostrado no gráfico 1, o grupo OVA (sensibilizado com a ovalbumina) apresentou um aumento de 85,5% na migração de células para o espaço broncoalveolar quando comparado ao grupo basal, confirmando assim o processo inflamatório característico da inflamação pulmonar. Por outro lado, o grupo tratado com a ouabaína (OUA*) na dose de 0,56 mg/kg reduziu 69,8% o número dessas células em relação ao grupo OVA, ação comparável a droga padrão utilizada, a dexametasona que reduziu 66,3% na dose 2 mg/kg.

Figura 5 – Efeito da ouabaína na celularidade total do lavado broncoalveolar

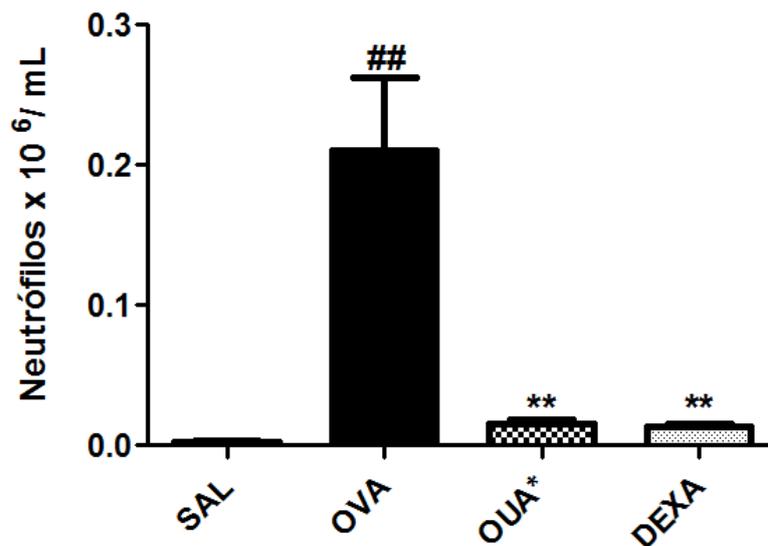


Camundongos BALB/c (n=5) pré-tratados com ouabaína na dose 0,56 mg/kg foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). No dia 23^o os animais foram eutanasiados e obtido o BAL, utilizado na contagem de células. A dexametasona foi utilizada como droga padrão anti-inflamatória. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm e.p.m e analisados por teste t ou análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ** (p<0,01) corresponde aos tratamentos estatisticamente significantes em relação ao grupo OVA. ### (p<0,001) significativo em relação aos grupos tratados.

4.2 Efeito da ouabaína na migração de neutrófilos do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica

Como mostrado no gráfico 2, o grupo OVA apresentou um aumento na migração de neutrófilos (98,9%) para o espaço broncoalveolar em comparação ao grupo basal. Já a droga padrão utilizada, dexametasona (DEXA), foi capaz de diminuir em 93,4% a migração dessas células quando comparada ao grupo OVA. Assim como a dexametasona, o grupo tratado com a ouabaína (OUA*) na dose de 0,56 mg/kg, também reduziu o número desse tipo celular (92,7%) para o pulmão em relação ao grupo OVA.

Figura 6 – Efeito da ouabaína no número de neutrófilos do lavado broncoalveolar

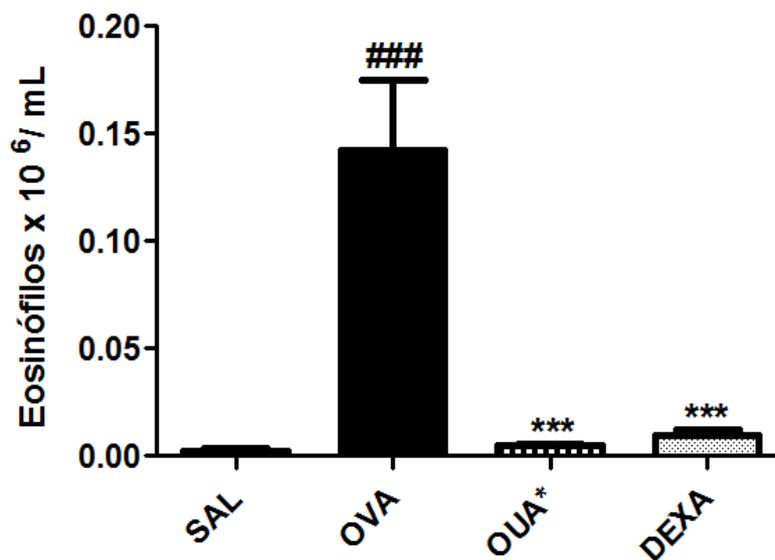


Camundongos BALB/c (n=5) pré-tratados com ouabaína na dose 0,56 mg/kg foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). No dia 23º os animais foram eutanasiados e obtido o BAL, utilizado na contagem de células. A dexametasona foi utilizada como droga padrão anti-inflamatória. Os dados numéricos foram apresentados em média ± e.p.m. e analisados por teste t ou análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ** (p<0,01) corresponde aos tratamentos estatisticamente significantes em relação ao grupo OVA. ## (p<0,01) significativo em relação aos grupos tratados.

4.3 Efeito da ouabaína na migração de eosinófilos do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica

Como mostrado no gráfico 3, o grupo OVA apresentou aumento na migração de eosinófilos (98,2%) para o espaço broncoalveolar em relação ao grupo basal, visto que a eosinofilia é um sinal marcante de desordens alérgicas (BEZERRA-SANTOS et al., 2006). Já o grupo tratado com a ouabaína (OUA*) na dose de 0,56 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente (96,5%) o número desse tipo celular para o pulmão em relação ao grupo OVA. O efeito inibitório alcançado pela ouabaína foi semelhante ao grupo dexametasona (DEXA) (93,2%) na dose 2mg/kg.

Figura 7 – Efeito da ouabaína no número de eosinófilos do lavado broncoalveolar

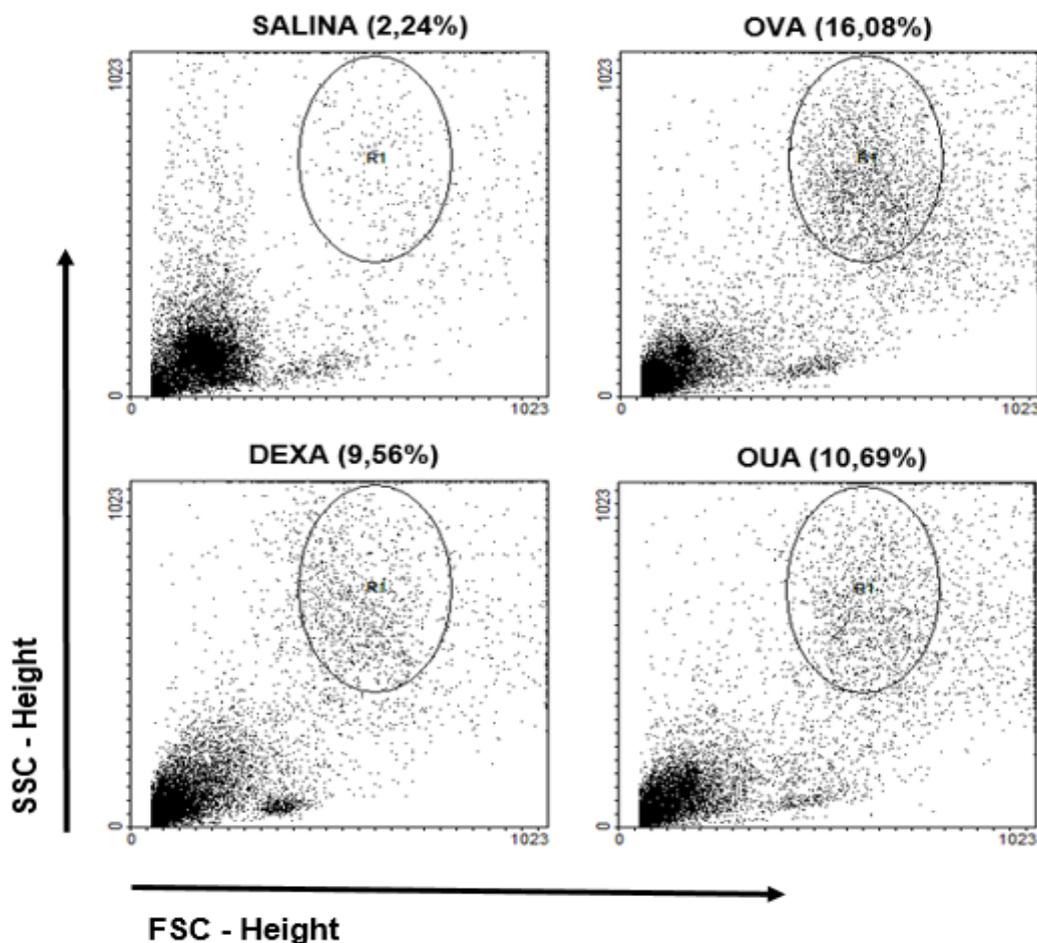


Camundongos BALB/c (n=5) pré-tratados com ouabaína na dose 0,56 mg/kg foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). No dia 23^o os animais foram eutanasiados e obtido o BAL, utilizado na contagem de células. A dexametasona foi utilizada como droga padrão anti-inflamatória. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm e.p.m. e analisados por teste t ou análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ***($p < 0,001$) corresponde aos tratamentos estatisticamente significantes em relação ao grupo OVA. ### ($p < 0,001$) significativo em relação aos grupos tratados.

4.4 Avaliação do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células presentes no lavado broncoalveolar

Na figura 4, a área demarcada provavelmente, corresponde ao tamanho e granulosidade intracelular característico de granulócitos - eosinófilos e neutrófilos. A análise do tamanho (FSC) e da granulosidade citoplasmáticas (SSC) indicam um aumento no número destas células (86%) no grupo OVA em comparação ao grupo basal. O tratamento com a ouabaína (OUA*), assim como a dexametasona (DEXA), foi capaz de reduzir em torno de 40% a migração de granulócitos para a cavidade pulmonar, em relação ao grupo OVA.

Figura 8 - Análise da migração de granulócitos no lavado broncoalveolar

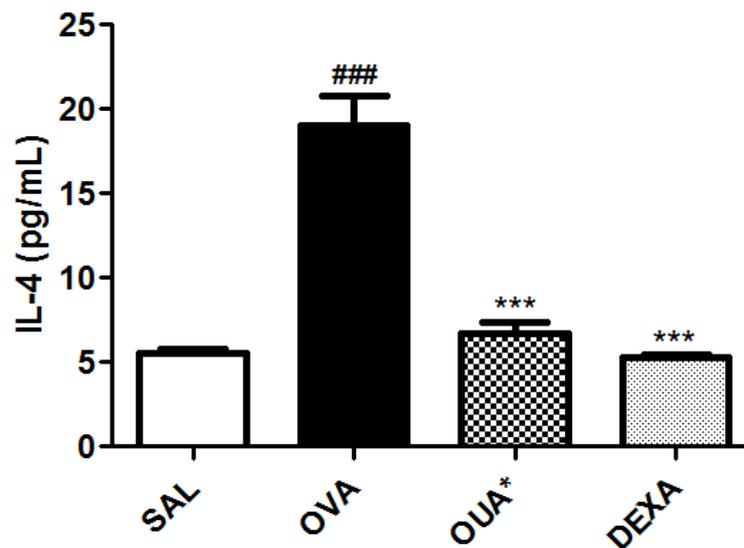


Camundongos BALB/c (n=5) pré-tratados com ouabaína na dose 0,56 mg/kg foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). No dia 23º os animais foram eutanasiados e obtido o BAL, utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) por citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.9.

4.5 Efeito da ouabaína sobre os níveis da citocina IL-4 do lavado broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica

No gráfico 4, observa-se que os animais sensibilizados com ovalbumina (OVA) aumentaram os níveis da citocina IL-4 (70,7%), citocina importante em doenças alérgicas, em relação ao grupo basal. Já a droga padrão utilizada, dexametasona, foi capaz de diminuir em 72% os níveis dessa citocina quando comparada ao grupo OVA. Assim como a dexametasona, o grupo tratado com a ouabaína (OUA*) na dose de 0,56 mg/kg, promoveu uma redução significativa (64,8%) nos níveis dessa citocina no pulmão.

Figura 9 – Efeito da ouabaína nos níveis da citocina IL-4 do lavado broncoalveolar

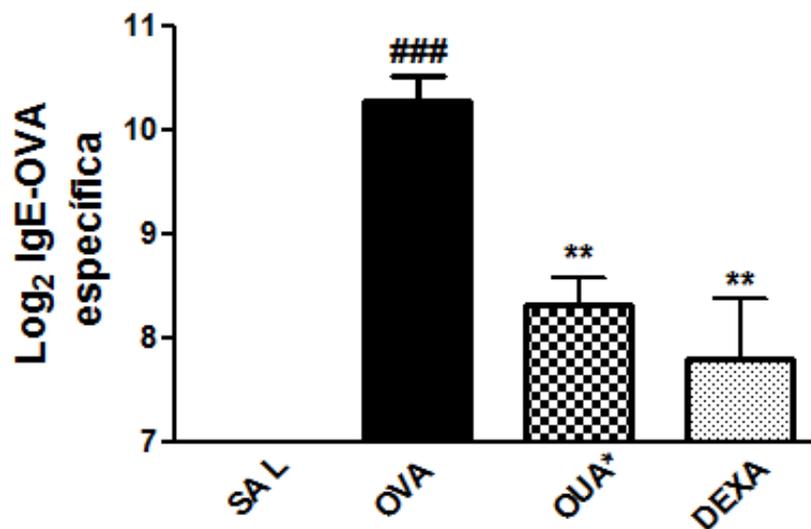


Camundongos BALB/c (n=5) pré-tratados com ouabaína na dose 0,56 mg/kg foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). No dia 23º os animais foram eutanasiados e obtido o BAL. A dexametasona foi utilizada como droga padrão anti-inflamatória. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm e.p.m. e analisados por teste t ou análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ***($p < 0,001$) corresponde aos tratamentos estatisticamente significantes em relação ao grupo OVA. ### ($p < 0,001$) significativo em relação aos grupos tratados.

4.6 Efeito da ouabaína sobre o título de IgE-OVA-específica na inflamação pulmonar alérgica

No gráfico 5, observa-se que o grupo sensibilizado com ovalbumina (OVA) apresentou título de IgE OVA-específica em relação ao grupo salina, comprovando assim a indução de uma resposta alérgica. O tratamento com a ouabaína (OUA*) na dose 0,56 mg/kg inibiu de forma estatisticamente significativa (74,2%) o título de IgE OVA-específica. Este efeito inibitório foi semelhante a droga padrão, dexametasona (DEXA) (81,9%) na dose 2 mg/kg.

Figura 10 - Efeito da ouabaína no título de IgE-OVA-específica.



Camundongos BALB/c (n=5) pré-tratados com ouabaína na dose 0,56 mg/kg foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). No dia 23^o os animais foram eutanasiados e obtido o soro a partir do plexo braquial. A dexametasona foi utilizada como droga padrão anti-inflamatória. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm e.p.m. e analisados por teste t ou análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. **($p < 0,01$) corresponde aos tratamentos estatisticamente significantes em relação ao grupo OVA. ### ($p < 0,001$) significativo em relação aos grupos tratados.

5 DISCUSSÃO

Embora conhecida como inibidor da bomba de Na^+/K^+ , várias outras ações sistêmicas e celulares tem sido atribuídas a ouabaína. Vários trabalhos vêm evidenciando que esse digitalico é capaz de interferir em diversos aspectos da resposta imunológica (DE VASCONCELOS et al., 2011; ECHEVARRIA – LIMA; RUMJANEK, 2006; LEITE et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2014; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2009).

No presente trabalho foi avaliado o papel da ouabaína na inflamação pulmonar alérgica, utilizando o modelo de inflamação pulmonar induzido por ovalbumina (OVA).

Durante o processo inflamatório ocorre o recrutamento de células para o sítio inflamado. Assim, para avaliar o efeito da ouabaína na migração celular, analisamos a celularidade total e diferencial presentes no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos BALB/c previamente tratados com ouabaína e sensibilizados e desafiados com OVA.

Uma característica fundamental da resposta imune é a capacidade migratória das células do sistema imunológico, que migram da circulação para os tecidos adjacentes (YONEKAWA; HARLAN, 2005). Estas células, liberam moléculas inflamatórias, tais como citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas que podem ocasionar injúria tecidual (SERHAN; SAVILL, 2005). Assim, a regulação da migração destas células é fundamental para o desenvolvimento da inflamação (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006). Nosso resultado demonstrou que o tratamento com ouabaína inibiu a migração de células para a cavidade pulmonar, semelhante a droga padrão utilizada, a dexametasona, sendo capaz de interferir no processo inflamatório pulmonar.

Uma vez observado que a ouabaína é capaz de reduzir o número total de células, avaliamos quais subpopulações celulares estavam presentes no lavado broncoalveolar. Os neutrófilos são células que participam da inflamação sendo efetoras do sistema imune e essenciais no combate contra patógenos. Estas células são caracterizadas pela liberação de enzimas líticas presentes em seus grânulos com grande potencial antimicrobiano e por possuírem a capacidade de atuar como fagócitos (BORREGAARD, 2010; NATHAN, 2006). A ouabaína foi capaz de inibir a

migração deste tipo celular nas vias aéreas, corroborando com os resultados já demonstrados pelo nosso grupo recentemente (LEITE et al., 2015).

Os eosinófilos estão envolvidos como mediadores importantes das desordens alérgicas, especificamente no trato respiratório com o desenvolvimento da asma alérgica (BOCHNER; BUSSE, 2005). O prolongamento da ativação e recrutamento dos eosinófilos está relacionado a gravidade da asma e sendo diretamente os responsáveis por muitos dos sinais e sintomas dessa patologia (SEMINARIO; GLEICH, 1994; VENGE, 1995). Nossos resultados evidenciaram que a ouabaína foi capaz de inibir a migração desse tipo celular na cavidade pulmonar, semelhante a droga padrão, a dexametasona.

Portanto, podemos inferir que a ouabaína possui efeito modulador tanto na migração de eosinófilos quanto de neutrófilos, e assim reduzindo a migração celular total para o pulmão. Esses conjuntos de dados, evidencia o papel anti-inflamatório da ouabaína.

Para avaliar se a ouabaína interfere em processos alérgicos, foram analisados os níveis da citocina IL-4 e da Imunoglobulina E (IgE), mediadores que participam diretamente das respostas alérgicas.

As citocinas desempenham um papel crucial no desenvolvimento de inflamações. A ativação de linfócitos T após contato com alérgeno induz a secreção de diversas citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, tendo papel fundamental no desenvolvimento e prolongamento da inflamação (BOUSQUET et al., 2000). A citocina IL-4 é um fator determinante para estimulação de linfócitos a desenvolverem um padrão Th2, além de favorecerem na troca de isotipo das imunoglobulinas em IgE (VUOLO, 2002). Quando foram mensurados os níveis de IL-4 em camundongos previamente tratados com a ouabaína e submetidos à exposição de OVA, esses valores foram diminuídos, similarmente ao uso de dexametasona. Nosso grupo já havia demonstrado que a ouabaína interfere nos níveis de outras citocinas, como TNF- α e IL-1 β (LEITE et al., 2015).

Além do infiltrado de eosinófilos na cavidade pulmonar e citocinas do perfil Th2, o aumento dos níveis de Imunoglobulina E (IgE) é característico de processos alérgicos. A presença de anticorpos IgE específico é o que provoca as manifestações alérgicas (DAHER et al., 2009). Os dados apresentados nesse trabalho mostraram que os níveis de IgE-OVA-específica em camundongos previamente tratados com

ouabaína e sensibilizados e desafiados com OVA diminuíram, evidenciando assim a atuação da ouabaína em respostas alérgicas.

A ouabaína, portanto, demonstrou que é capaz de modular processos alérgicos, devido à redução nos níveis de IL-4 e IgE-OVA-específica. Além de reduzir a migração de células para a cavidade pulmonar, principalmente do perfil eosinofílico. Este efeito pode estar relacionado com sua capacidade em reduzir a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2008) e os níveis do fator nuclear kappa B (NF-kB) (YANG et al., 2005). A família das MAPKs é composta de várias proteínas quinases, tais como, ERK1/ERK2, p38 e JNK. Estas proteínas ativam fatores de transcrição como o NF-kB que é um importante fator de transcrição ativado durante a resposta inflamatória da asma, regulando assim a expressão de citocinas, moléculas de adesão e proteínas inflamatórias, as quais são responsáveis por manter a inflamação das vias aéreas (CI et al., 2012; KIM; KIM; LEE, 2012). Portanto, a redução na ativação da MAPK p38 e consequentemente do NF-kB pode estar relacionada a essa modulação da ouabaína na inflamação pulmonar alérgica. Esse aspecto do mecanismo de ação da ouabaína já está em avaliação.

6 CONCLUSÃO

De posse dos dados obtidos, conclui-se que o tratamento com a ouabaína é capaz de modular o processo inflamatório pulmonar alérgico, por reduzir a migração eosinofílica, a citocina IL-4 e o título de IgE OVA-específica, mediadores característicos da inflamação alérgica.

REFERÊNCIAS

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

AKUTHOTA, P.; XENAKIS, J. J.; WELLER, P. F. Eosinophils: offenders or general bystanders in allergic airway disease and pulmonary immunity? **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 2, p. 113–9, 2011.

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

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n.3, p. 183-192, 2008.

BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 7, p.1152–1160, 2006.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{++} stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**, v. 264, n. 6, p. C1367-C1387, 1993.

BOCHNER, B. S.; BUSSE, W. W. Allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 953-959, 2005.

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

BOUSQUET J. et al. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 5, p. 1720-1745, 2000.

BROIDE, D.H. et al. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 689–695, 2011.

CAVALCANTI, A. C. **Obtenção de insumo farmacêutico a partir das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl e seu efeito sobre mediadores inflamatórios relevantes para a asma.** 2014. 178 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014. il color.

CHAUSSABEL, D.; PASCUAL, V.; BANCHEREAU, J. Assessing the human immune system through blood transcriptomics. **BMC Biology**, v. 8, n.1, p. 84, 2010.

CL, X. et al. Short-term roxithromycin treatment attenuates airway inflammation via MAPK/NF-Kb activation in a mouse model of allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 61, n. 7, p. 749-758, 2012.

DAHER, S. et al. Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. **Revista brasileira alérgica e imunopatologia**, v. 32, p. 3-8, 2009.

DE MORAES, V. L. et al. Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 12, p. 2425-9, 1989.

DE PAIVA, L. S. et al. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, n. 9, p. 1038-43, 2011.

DE VASCONCELOS, D. I. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

ECHEVARRIA-LIMA, J. et al. Ca²⁺ Mobilization Induced by Ouabain in Thymocytes Involves Intracellular and Extracellular Ca²⁺ Pools. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1386-1392, 2003.

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

EDWARDS, M. et al. The microbiology of asthma. *Nature*. **Reviews Microbiology**, v. 10, p. 459-471, 2012.

FERRANDI, M. et al. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasm: comparison of two independent assays. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 886-96, 1997.

FLOOD-PAGE, P. T. et al. Eosinophil's Role Remains Uncertain as Anti–Interleukin-5 only Partially Depletes Numbers in Asthmatic Airway. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 2, p. 199-204, 2003.

GALLI, S. J.; TSAI, M. P.; ADRIAN, M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445 – 454, 2008.

GARVY, B. A. et al. Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. **Immunology**, v. 79, n. 2, p. 270-7, 1993.

GIRODET, P. O. et al. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, n.3, p. 325-337, 2011.

GOTO, A. et al. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. **Pharmacology Reviews**, v. 44, n. 3, p. 377-99, 1992.

HAMLIN, J. M. et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 88, n.14, p. 6259-6263, 1991.

HAMLIN, J. 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. 685-693, 2003.

HAMMAD H.; LAMBRECHT B. N. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 331–336, 2006.

HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-750, 2008.

HOLT, P. G. et al. Induction of Adjuvant-Independent IgE Responses in Inbred Mice: Primary, Secondary, and Persistent IgE Responses to Ovalbumin and Ovomuroid. **International Archives Allergy and Immunology**, v. 65, n. 1, p. 42-50, 1981.

HORNER A. A. Regulation of aeroallergen immunity by the innate immune system: laboratory evidence for a new paradigm. **Journal of Innate Immunology**, v. 2, n.2, p. 107-113, 2010.

HUMBLES, A. A. et al. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1776–1779, 2004.

JACOB, P. L. et al. Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania amazonensis*-infected Swiss mice. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1313-1321, 2012.

JAMES A.; CARROLL N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. **The European Respiratory Journal**, v. 15, n. 4, p. 782–9, 2000.

KAY, A. B.; PHIPPS, S.; ROBINSON, D. S. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 9, p. 477-482, 2004.

KAY A. B. The role play of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 148-152, 2005.

KIM, S. H.; KIM, B. H.; LEE, Y. C. Effects of Corni fructus on ovalbumin-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. **Journal of Inflammation**, v. 23, n.1, p. 1-12, 2012.

KRISHNAMOORTHY, N. et al. Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n.10, p.1525–1530, 2012.

KUCUKSEZER, U. C. et al. Mechanisms of immune tolerance to allergens in children. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 56, n. 12, p. 505, 2013.

LACY, P.; MOQBEL, R. Eosinophil cytokines. **Chemical Immunology**, v. 76, p. 134–55, 2000.

LANG, K.; RATKE, J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. **Cell Communication and Signaling**, v. 7, n.1, p. 27, 2009.

LAVIOLETTE, M. et al. Effects of inhaled steroids on blood eosinophils in moderate asthma **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 725, n.1, p. 288-297, 1994.

LEITE, J. A. **Atividade imunomoduladora da ouabaína no processo inflamatório agudo**. 2012. 131 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012. il.

LEITE, J. A. et al. Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

LEMIERE C. et al. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 118, n. 5, p. 1033–9. 2006.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than Just Th2 cells. **Nature**, v. 10, n.12, p. 838-848, 2010.

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.

MCKAY, A. et al. A Novel Anti-Inflammatory Role of Simvastatin in a Murine Model of Allergic Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 2903-2908, 2004.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MIKALSEN, I. B.; HALVORSEN, T.; OYMAR, K. Blood eosinophil counts during bronchiolitis are related to bronchial hyper-responsiveness and lung function in early adolescence. **Acta Paediatrica**, v. 103, n. 1, p. 86–92, 2014.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. Porto Alegre (RS): Artes Medicas, 2010.

NASCIMENTO, C. R. et al. The Influence of Ouabain on Human Dendritic Cells Maturation. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-15, 2014.

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.

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

PALMQVIST, C.; WARDLAW, A.J.; BRADDING, P. Chemokines and their receptors as potential target for the treatment of asthma. **British Journal of Pharmacology**, v.151, n. 6, p. 725-736, 2007.

PAMNANI, M. B. et al. Studies on the role os humoral sodium-transport inhibitor and the anteroventral third ventricle (AV3V) in experimental low-renin hypertension. **Clinical science**, v. 61, n. s7, p. 57s-60s, 1981.

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

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, n. 8, p. 1037-51, 2003.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S. et al. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell Biology International**, v. 32, n. 10, 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, n.1, p. 153-163, 2009.

ROSSONI, L. V. et al. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine in L-NAME-induced hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 105-16, 2003.

ROTHENBERG, M, E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual Review Immunology**. v. 24, n.1, p.147–74, 2006.

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

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

SCHONER, W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. **Eur. J. Biochem**, v. 269, n. 10, p. 2440–2448, 2002.

SCHONER, W. et al. Ouabain as a mammalian hormone. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 986, n.1, p. 678-84, 2003.

SEMINARIO, M. C.; GLEICH, G. J. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 6, n. 6, p. 860-864, 1994.

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

SHAHID, S. K. Newer glucocorticosteroids and corticosteroid resistance reversal in asthma. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 2, n. 3, p. 373-385, 2013.

SHAKOORY, B. et al. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. **Journal Interferon Cytokine Reseresh**, v. 24, n. 5, p. 271-281, 2004.

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

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

TAKADA, Y. et al. Odoroside A and ouabain inhibit Na⁺/K⁺-ATPase and prevent NF kappaB inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 9, p. 1157-66, 2009.

TODO-BOM, A.; PINTO, A. M. Fisiopatologia da Asma Grave. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, v. 29, p. 113-116, 2006.

VENGE, P. Role of eosinophils in childhood asthma inflammation. **Pediatric Pulmonol**, v. 19, n. 11, p. 34-35, 1995.

VIEIRA, G.C. et al. Inhaled *Cissampelos sympodialis* Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+T Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 916-925, 2012.

VIG, R.S.; FORSYTHE, P.; VLIAGOFTIS, H. The role of stress in asthma: insight from studies on the effect of acute and chronic stressors in models of airway inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, n.1, p. 65–77, 2006.

VON, G. C. et al. A. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 3, p. 1609–1618, 2005.

VUOLO, F. S. **Avaliação dos níveis de citocinas em soro e o papel do tratamento com canabidiol em modelo animal de asma**. 2012. 69 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2012.

WANNER, A. M.; MENDES E. S. Airway Endothelial Dysfunction in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 11, p. 1344-1351, 2010.

WENCESLAU, C. F. et al. Long-term ouabain treatment impairs vascular function in resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 48, n. 4, p. 316-26, 2011.

WILLIAMS, C. M.; GALLI, S. J. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 5, p. 847-859, 2000.

WITHERING, W. An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases. **Arch Intern Med**, v. 112, n. 1, p. 143, 1963.

XAVIER, F. E. et al. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 215-25, 2004.

YANG Q. et al. Cardiac glycoside 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. 9631–9636, 2005.

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

ANEXO A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

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

**CERTIDÃO**

João Pessoa, 03 de agosto de 2015.
CEUA nº 100/2015.

Ilmo(a): **Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas**
Departamento de Biologia Celular e Molecular – CBIotec – UFPB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **15/07/2015** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **PAPEL DA OUABÁINA NA ASMA ALÉRGICA: ASPECTOS FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS**.

Com previsão de empregar **64 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c (fêmeas), 24 ratos Wistar (fêmeas);**

Animais do **Biotério Prof. Thomas George;**

Para serem utilizados no período de **agosto/2015 a dezembro/2016**.

Atenciosamente,

Islania Giselia Albuquerque Gonçalves

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Prof.ª Dr.ª Islania G.A. Gonçalves:
Coordenadora CEUA/UFPB
SIAPE 3366301

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Federal da Paraíba
www.ufpb.br/ceua/ - ceua@ufpb.br

ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA IMMUNOBIOLOGY

Elsevier Editorial System(tm) for
Immunobiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Ouabain immunoregulation attenuates ovalbumin-induced airway inflammation

Article Type: Research Paper

Keywords: allergic airway inflammation;
ouabain;
CD3+ T cells;
Th2 cytokines.

Corresponding Author: Dr. Sandra Rodrigues-Mascarenhas,

Corresponding Author's Institution:

First Author: José Guilherme F.M. Galvão

Order of Authors: José Guilherme F.M. Galvão; Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva; Deyse Cristina M. Carvalho; Laércia Karla D. P. Ferreira; Talissa Mozzini Monteiro; Adriano Francisco Alves; Larissa Adilis D. P. Ferreira; Francisco Allysson A. F. Gadelha; Marcia Regina Piuvezam; Sandra Rodrigues-Mascarenhas

Abstract: Ouabain, a Na⁺/K⁺ ATPase inhibitor hormone, presents immunomodulatory actions, including anti-inflammatory effect on acute inflammation models. In the present study, it was assed ouabain effect in a model of allergic airway inflammation induced by ovalbumin (OVA). Initially, it was observed that ouabain treatment inhibited cellular migration induced by OVA on bronchoalveolar lavage fluid (BALF), mostly granulocytes, without interference on macrophage migration. Also, it was observed, by flow cytometry, that ouabain reduces CD3+ T cells on BALF. Furthermore, ouabain treatment decreased IL-4 and IL-13 levels. Ouabain also promoted pulmonary histological alterations, including decreased cell migration into peribronchiolar and perivascular regions observed through hematoxylin-eosin (HE) and reduced mucus production in bronchioles by periodic acid-Schiff (PAS). Allergic airway inflammation is characterized by high OVA-specific IgE serum titer. This parameter was also reduced by ouabain treatment. Therefore, our data demonstrate that ouabain negatively modulate allergic airway inflammation induced by OVA.

Suggested Reviewers: Jerry Lingrel
Interim Chair and Professor of Molecular Genetics, University of Cincinnati
lingrejb@uc.edu

Cristoforo Scavone
Researcher and Professor, USP
cscavonne@icb.usp.br

Vivian Rumjanek
Researcher and Professor, UFRJ
vivianrumjanek@yahoo.com.br