



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JOSEFA IZABELE LOPES BATISTA

**EFEITO DA OUABAÍNA NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS E PRODUÇÃO
DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

**JOÃO PESSOA
2018**

JOSEFA IZABELE LOPES BATISTA

**EFEITO DA OUABAÍNA NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS E PRODUÇÃO
DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO DE LESÃO
PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

ORIENTADORA:

Prof. Dr^a. Sandra Rodrigues Mascarenhas

João Pessoa

2018

**Catálogo na publicação Seção de
Catálogo e Classificação**

B333e Batista, Josefa Izabele Lopes.

Efeito da ouabaina na migração de células e
produção de citocinas inflamatórias em modelo murino
de lesão

pulmonar aguda induzida por LPS / Josefa Izabele
Lopes Batista. - João Pessoa, 2018.

52 f.: il.

Orientação: Sandra Rodrigues

Mascarenhas. Monografia (Graduação)

- UFPB/CBiotec.

1. Ouabaina. 2. Lesão pulmonar aguda. 3. LPS. I.
Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Título.

UFPB/BC

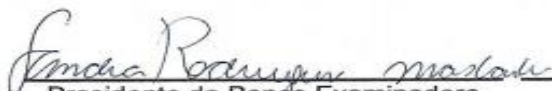


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos cinco 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. Profa. Dra. Fabíola da Cruz Nunes (CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos (CBIOTEC/UFPB), a discente Josefa Isabelle Lopes Batista, matrícula 11325123, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Efeito da ouabaína na migração de células inflamatórias para a região broncoalveolar em modelo murino de LPA**, 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.


Presidente da Banca Examinadora


Avaliador 1


Discente


Avaliador 2

João Pessoa/PB, 05 de junho de 2018.

Dedico aos meus pais que com tanto amor e esforço, me demonstraram o verdadeiro caminho do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por todo amor e cuidado. O senhor sempre esteve presente na minha vida, me livrando de todo mal, me guardando e iluminando meu caminho. Suas bênçãos na minha vida são incontáveis. A ti registro minha gratidão e amor infindável.

À minha estimada orientadora **Sandra Mascarenhas**, sempre transmitindo confiança, dedicação e demonstrando o caminho para alcançar os objetivos. Os aprendizados que obtive com você sempre farão parte da minha vida pessoal e acadêmica. Obrigada pelo acolhimento no seu laboratório, você é minha melhor referência de profissional.

Aos meus queridos pais, **Isabel e Amâncio**, as pessoas mais importantes da minha vida, a quem devo tudo o que sou e tudo que conquistei. Vocês são os melhores pais que uma filha poderia ter. Obrigada por nunca medirem esforços para que suas filhas tivesse uma educação de qualidade, sem vocês eu não seria nada. Amo muito vocês!

À minha irmã, **Ianca** por todo amor e apoio. Por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, por dividir comigo a saudade de casa e dos nossos pais, sem você tudo teria sido mais difícil.

Ao meu namorado, **Vicente**. Um dos melhores presentes que Deus me concedeu. O meu parceiro de vida. Sempre esteve ao meu lado apoiando e torcendo por mim. Nos momentos mais difíceis você foi alicerce. Sem você essa trajetória teria sido mais árdua. Obrigada por tudo!

A toda a **minha família**, em especial a meu primo **Matheus**, minha fonte diária de amor. O presente mais lindo que Deus me deu! Obrigada por me transmitir tanta sabedoria nesse seu olhar. Você me ensina todos os dias a agradecer pela amo muito!

As minhas tias queridas: **Ivete**, por ser essa mulher forte e que me inspira a cada

dia. Você é a melhor referência de força e humildade que tenho hoje. É uma tia amiga, que posso sempre contar. Uma tia que zela, cuida e ensina. Obrigada por todo carinho, amizade e por ter me dado o melhor presente da minha vida (Meu Teteu). À **Ivone**, por todo amor. Obrigada por ter me acolhido aqui em João Pessoa e por ter feito o papel de mãe. Você tem um coração gigante, a pessoa mais generosa que eu conheço. A tia mais preocupada e decoradora (kk) desse mundo. E a **Íris**, por mesmo de longe está sempre pronta para ajudar. Você é maravilhosa e eu agradeço demais a Deus por ter você como tia. Eu amo muito vocês, sem vocês três nada disso seria possível. Obrigada minhas tias-mãe!

À minha prima **Valesca**, uma das minhas melhores amigas, aquela que sempre esteve comigo, a que me escuta, aconselha e que nunca hesitou em ajudar. Obrigada por tudo, prima. As minhas melhores amigas, **Bárbara e Camila** por toda amizade e carinho. Obrigada por sempre me escutarem, me aguentarem e acima de tudo me apoiarem. Vocês são incríveis! Quero levar vocês no meu coração pra onde quer que eu vá. O melhor quarteto da minha vida!

À **Cosmo e Ana Paula**, o melhor presente que a biotecnologia me deu. O trio do sertão (kk), os amigos que vou levar para além da graduação. **Ana**, obrigada por ter me aguentado esses cinco anos e mais que isso obrigada pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo. Sem você a graduação teria sido bem mais difícil. **Cosmo**, apesar de ter nos abandonado no meio do caminho (kk) obrigada por sempre se fazer presente, pela preocupação e amizade que foi muito além do curso. Vocês são demais, obrigada por tudo!

A todos os membros do **laboratório de Imunobiotecnologia**, em especial a **Juliane** por toda ajuda, acolhimento e conhecimento transmitido. Obrigada por toda a paciência comigo, Ju. A melhor doutoranda da UFPB (kk). Você me ajudou demais, obrigada mesmo!

Aos membros da banca **Fabíola Cruz, Rafael Travassos e Luiz Henrique Agra** (suplente) que aceitaram compor a banca examinadora e contribuir na melhora deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A ouabaína é uma substância classificada quimicamente como um glicosídeo cardiotônico, um inibidor clássico da Na^+/K^+ ATPase. Foi originalmente extraída de vegetais e em 1991 foi identificada a sua produção endógena, desde então suas ações fisiológicas são alvos de muitos estudos científicos. Trabalhos do nosso grupo mostraram que a ouabaína é capaz de interferir em diversos aspectos relacionados ao sistema imune e ao processo inflamatório. A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome clínica caracterizada por infiltrado pulmonar bilateral e hipoxemia de origem não cardíaca e tem como umas das principais características o recrutamento de neutrófilos para o pulmão. Além disso, não existe tratamento terapêutico para LPA em si. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da ouabaína na migração de células e na produção de citocinas inflamatórias frente a um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida pelo LPS. Para isto, foram utilizados camundongos BALB/c machos tratados via intraperitoneal com ouabaína na dose de 0,56 mg/Kg por três dias consecutivos, 1h após o último tratamento os animais foram desafiados via intranasal com LPS (2,5 mg/Kg); Posteriormente, os animais foram eutanasiados e as amostras biológicas coletadas e os parâmetros inflamatórios: migração celular, produção de citocinas e expressão de TLR4 foram analisados. Os dados foram analisados pelo software Graphpad Prism e foi observado que o tratamento com a ouabaína diminuiu a migração de leucócitos totais para o sítio inflamado (49%), evento este, associado à diminuição da migração de neutrófilos (70%) de forma específica e independente da migração de macrófagos. Ouabaína também diminuiu a produção das citocinas inflamatória IL-6 (47%) e TNF- α (14%). Efeitos aparentemente independentes da ação da ouabaína na expressão do TLR4, pois este receptor não foi afetado pela ouabaína. Portanto, podemos concluir que ouabaína modula negativamente processos de migração celular e a produção de citocinas inflamatórias durante a LPA independente de TLR4.

Palavras chaves : ouabaína, lesão pulmonar aguda, LPS.

ABSTRACT

Ouabain is a substance chemically classified as a cardiotonic glycoside, a classic Na⁺/K⁺ ATPase inhibitor. It was originally extracted from plants and in 1991 its endogenous production was identified, since then its physiological actions have been the targets of many scientific studies. Work from our group showed that ouabain is able to interfere in several aspects related to the immune system and the inflammatory process. Acute lung injury (ALI) is a clinical syndrome characterized by pulmonary infiltrates and hypoxemia of non-cardiac origin and has as its main attraction the recruitment of neutrophils into the lungs. In addition, there is no therapeutic treatment for ALI. According to these aspects, the objective of this study was to evaluate the effect of ouabain on cell migration and on the production of inflammatory cytokines against a murine model of acute lung injury induced by LPS. For this, male BALB/c mice treated intraperitoneally with ouabain at 0.56 mg / kg for three consecutive days were used, and 1 h the last day of treatment of the animals were intranasally ingested with LPS (2.5 mg / kg); Subsequently, the animals were euthanized and their biological samples were collected and the inflammatory parameters: cell migration, cytokine production and TLR4 expression were analyzed. The data were analyzed by the software GraphPad Prism and it was observed that the treatment with ouabain decreased the migration of total leukocytes to the inflamed site (49%), an event associated with decreased neutrophil migration (70%) specifically and independent of macrophage migration. Ouabain also decreased the production of inflammatory cytokines IL-6 (47%) and TNF- α (14%). Apparently independent effects of ouabain on TLR4 expression, as this receptor were not affected by ouabain. Therefore, we can conclude that ouabain negatively modulates cell migration processes and the production of inflammatory cytokines during TLR4-independent ALI.

Keywords: ouabain, acute lung injury, LPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da ouabaína	14
Figura 2- Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS	27
Figura 3- Esquema de citometria de fluxo para análise da expressão do receptor TLR4	30
Figura 4- Histograma representativo para a expressão do TLR4	36

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Efeito do tratamento com ouabaína na migração de leucócitos totais e diferenciais para o espaço broncoalveolar na lesão pulmonar aguda induzida por LPS. 34
- Gráfico 2-** Efeito do tratamento com ouabaína na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. 35
- Gráfico 3-** Efeito do tratamento com ouabaína na expressão do TLR4. 37

SIGLAS E ABREVIações

ANG II: Angiotensina II

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA: Análise de variância

BALF: Fluido do lavado broncoalveolar

CEUA: Conselho de ética para uso de animais

DEXA: Dexametasona

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

e.p.m.: Erro Padrão da Média

INF- γ : Interferon gama

IL: Interleucina

i.n: Intranasal

i.p.: Intraperitoneal

LAK: Células assassinas ativadas por linfocina

LPA: Lesão pulmonar aguda

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

NK: células natural killer

Mn: Nanomolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Ouabaína	14
1.2	Ouabaína e o sistema imunológico	16
1.3	Lesão pulmonar aguda (LPA)	17
1.4	Imunologia da LPA	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	METODOLOGIA	24
3.1	Animais	25
3.2	Preparo da ouabaína	25
3.3	Protocolo experimental de LPA induzida por LPS	25
3.4	Grupos experimentais e tratamento dos animais	26
3.5	Obtenção do lavado broncoalveolar e determinação da migração de leucócitos totais e diferenciais no BALF	28
3.6	Quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α no BALF	29
3.7	Avaliação da expressão do TLR4	30
3.8	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Efeito da ouabaína no número de células totais e diferenciais do BALF de camundongos com LPA experimental	33
4.2	Efeito da ouabaína na produção das citocinas TNF- α e IL-6	35
4.3	Efeito da ouabaína na expressão do TLR4	36
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	43
7	REFERÊNCIAS	45

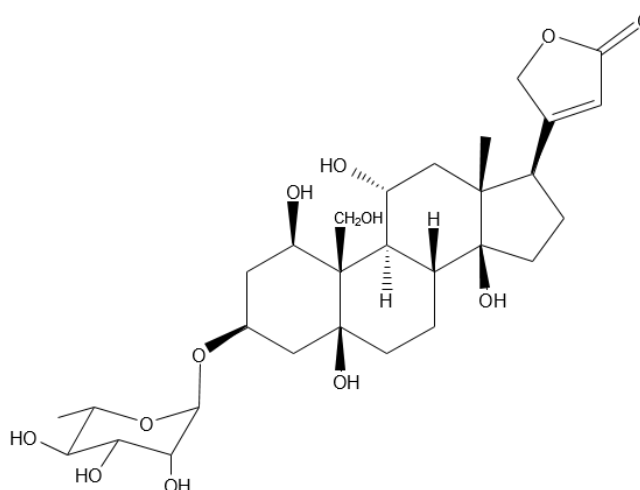
INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Ouabaína

A ouabaína é uma substância classificada quimicamente como um glicosídeo cardiotônico, sua estrutura é formada por uma ouabagenina (porção esteroidal), uma ramnose (porção glicosídica) e uma lactona (ROBBERS et al., 1997) (Fig.1). Sabe-se que a ouabaína assim como os demais glicosídeos cardíacos inibe a bomba Na^+/K^+ ATPase. Essa molécula vem sendo bastante estudada, e é alvo de diversas pesquisas de onde surgiram inúmeras constatações sobre suas ações no organismo (BAGROV e SHAPIRO, 2008; GROSS e HARRINGTON, 2016).

Figura 1 - Estrutura química da ouabaína



Fonte: Leite et al. (2015).

Esse glicosídeo foi originalmente extraído de vegetais, especificamente da semente madura de *Strophanthus gratus* e *Strophanthus kombé* e das cascas de *Acokanthera ouabaio*, plantas digitálicas da família Apocynaceae (BLAUSTEN, 1993). Por muito tempo a ouabaína foi usada para tratar a insuficiência cardíaca congestiva com base no seu efeito inotrópico positivo no músculo cardíaco (SCHONER et al., 2002).

Em 1991, a ouabaína foi identificada como um hormônio endógeno, sendo produzida naturalmente por mamíferos. A partir dessa constatação foi observado

também que a ouabaína endógena é biologicamente e imunologicamente semelhante à ouabaína extraída de vegetais (HAMLYN et al., 1991).

A ouabaína endógena parece ser sintetizada na zona glomerulosa e fasciculada do córtex da glândula supra-renal, no hipotálamo e na pituitária. A partir daí, a ouabaína é liberada na circulação após estimulação do hormônio adrenocorticotrófico (LEWIS et al., 2014), epinefrina (SCHONER e SCHEINER-BOBIS, 2005), angiotensina II (LAREDO et al., 1997) e agonistas do receptor α 1-adrenérgico (SCHONER, 2002; SCHONER E SCHEINER-BOBIS, 2007).

O papel fisiológico da ouabaína no sistema renal e cardiovascular já está bem estabelecido e se relaciona à natriurese e ao controle do tônus da vascular (NESHER et al., 2009). A concentração da ouabaína encontrada na circulação pode variar de 0,5 a 2,0 nM (DVELA-LEVITTM et al., 2015) e diversas pesquisas mostram que os níveis dessas substâncias podem ser alterados, variando tanto em situações fisiológicas como nas patológicas (SIMONIN et al., 2015).

Pacientes hipertensos e indivíduos após atividade física apresentaram níveis elevados de ouabaína na corrente sanguínea (SCHONER, 2000). Além disso, diversos estudos mostraram que os níveis circulantes desse hormônio podem ser modulados por condições de estresse (HAMLYN et al., 1991). Adicionalmente, a ouabaína também é capaz de aumentar a atividade de neurônios simpáticos em ratos, sendo assim considerado uma substância capaz modular o sistema nervoso central (DE WARDENER, 2001).

A ouabaína possui ainda atividade antiproliferativa e efeitos antimetastático em células cancerígenas (PEZZANI et al., 2014; SHIH et al., 2017). Estudos relatam que a ouabaína induziu a morte celular no câncer cervical humano HeLa e células HepG2 do cancro do fígado (OZDEMIR et al., 2016). Além disso, foi observado também que em concentrações fisiológicas, esse glicosídeo é capaz de inibir as atividades migratórias do câncer de pulmão humano nas células H292 (PONGRAKHANANON et al., 2013).

Um estudo recente utilizando cerebelo de rato mostrou que doses pequenas de ouabaína podem reduzir o estresse oxidativo induzido por lipopolissacarídeos (LPS) nesse tecido, o que é promissor, tendo em vista que o estresse oxidativo que é um fator chave na neurodegeneração característica de algumas doenças

neurológicas como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, dentre outras (GARCIA et al., 2018).

Nesse contexto, a ouabaína é um glicosídeo cardiotônico endógeno capaz de interferir em diversos mecanismos fisiológicos e patológicos mantendo e regulando a homeostase do organismo (BAGROV; SHAPIRO, 2008).

1.2 Ouabaína e o sistema imunológico

Já é estabelecido na literatura que a ouabaína é capaz de modular muitos aspectos do sistema imunológico, sendo considerada uma molécula imunomoduladora (CAVALCANTE-SILVA, 2017). A primeira evidência da ação imunomoduladora de ouabaína foi a sua capacidade de inibir a proliferação de células linfoides induzida pelo mitógeno fito-hemaglutinina (QUASTEL et al., 1968). No entanto, foi visto que a ouabaína inibe a proliferação de células induzida por outros estímulos, como éster de forbol, ionóforo de cálcio e a interleucina 2 (IL-2) (SZAMEL et al., 1981; DE MORAES et al., 1998; OLEJ et al., 1994; OLEJ et al., 1998).

Em timócitos, precursores dos linfócitos T, a ouabaína aumenta a expressão de CD69 (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003). Além disso, em experimentos de associação de ouabaína com corticoides foi visto que tanto *in vitro* como *in vivo* a ouabaína atua de forma sinérgica com corticoides (MANN et al., 2001). Ainda *in vitro*, experimento usando timócitos foi observado que altas concentrações de ouabaína ocasionam a despolarização da membrana plasmática dessas células (MANN et al., 2001). Adicionalmente, em macrófagos a ouabaína regula negativamente a expressão de CD14 (mCD14), uma molécula de superfície envolvida na fagocitose (VALENTE et al., 2009).

Foi visto que macrófagos tratados com ouabaína tiveram seus padrões de secreção de citocinas alteradas, a exemplo do aumento da produção de IL-1 β (DORNAND et al., 1984), IL-1 α (MATSUMORI et al., 2000) e TNF- α (FOEY; CRAWFORD; HALL; MATSUMORI, 1997). E quando essas células foram estimuladas com LPS, tanto *in vitro* como *in vivo*, a ouabaína mostrou-se capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF- α (FOEY, CRAWFORD; HALL, 1997; MATSUMORI, 1997).

In vivo, a ouabaína reduz as células B na medula óssea, no baço e sangue periférico (DE PAIVA et al., 2011). Foi observado também que as *células natural killer* (NK) não tem sua atividade citotóxica afetada pela ouabaína, nem na presença nem na ausência de agente estimuladores (DE MORAES et al., 1989). No entanto, a ouabaína tem a capacidade de inibir a geração de células assassinas ativadas por linfocinas (LAK) quando induzida por interleucina 2 (IL-2) (OLEJ et al., 1994).

Dados do nosso grupo demonstraram que a ouabaína apresenta uma atividade anti-inflamatória e imunomoduladora inibindo eventos moleculares na inflamação aguda, induzida por distintos agentes flogísticos, a exemplo do zimosan, carragenina e do composto 48/80 (DE VASCONCELOS et al., 2011). Além da regulação negativa da resposta inflamatória desencadeada pela (*L.*) *amazonensis* em camundongos (JACOB et al., 2013). *In vivo*, no modelo de inflamação pulmonar crônica (asma alérgica) a ouabaína foi capaz de reduzir a migração de células para o sítio inflamado, além de atenuar citocinas características do fenótipo Th2, a IL-4 e IL-13 e reduziu também a IgE-OVA (GALVÃO et al., 2017). Em outros modelos, ouabaína foi capaz de diminuir *in vitro* e *in vivo* a produção de citocinas pró-inflamatórias como: TNF- α e IL-6 (LEITE et al., 2015).

Esse glicosídeo também é capaz de induzir a ativação de várias cascatas de transdução de sinal que são independentes das mudanças nas concentrações intracelulares de sódio e potássio envolvendo as proteínas ativadas Ras/Raf/ MAP quinase, e proteína quinase C. Em timócitos murinos, a ouabaína diminui os níveis da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) e o fator nuclear de células T ativadas (NFATc1) (SZAMEL; SCHNEIDER; RESCH, 1981; VALENTE et al., 2009).

1.3 Lesão pulmonar aguda (LPA)

As doenças pulmonares são cada vez mais frequentes em todo o mundo. Esse tipo de patologia altera a função do pulmão prejudicando as trocas gasosas e gerando uma diminuição na qualidade de vida das pessoas. Estimativas do Instituto de Métricas e Avaliação da Saúde (IHME) indicam que aproximadamente 7,5 milhões de pessoas morrem de doenças pulmonares a cada ano, representando 13,5% das mortes por todas as causas (NAGHAVI et al., 2013).

Dentre as doenças pulmonares a lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome clínica caracterizada por um infiltrado pulmonar bilateral e hipoxemia de origem não cardíaca. Quando a hipoxemia é grave, a condição evolui para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (RUBENFELD et al., 2005 e DOWDY et al., 2006). A gravidade da hipoxemia diferencia o LPA da SDRA, a “American European Consensus Conference” definiu pacientes com LPA aqueles que apresentam a relação entre a PaO_2 (pressão arterial parcial de oxigênio) e a FIO_2 (fração inspirada de oxigênio) menor ou igual 300, e pacientes que evoluíram para a SDRA apresentam a relação PaO_2 / FIO_2 menor ou igual a 200 (PARKET et al, 2011).

Em 1967, Ashbaugh e colaboradores publicaram uma descrição de 12 pacientes com achados clínicos, fisiológicos, radiográficos e patológicos similares, o que veio a ser a primeira descrição da LPA. Esses pacientes apresentavam desconforto respiratório agudo, cianose refratária à oxigenoterapia, diminuição da complacência pulmonar e infiltrados pulmonares difusos na radiografia de tórax (ASHBAUGH et al., 1967).

É relatado que a LPA é mais comum do que SDRA com taxas relatadas de até 25 casos por 100.000 habitantes por ano. (QUARTIN et al., 2009 e GOSS et al., 2003). As investigações epidemiológicas da LPA são focadas em sua grande maioria em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI), no entanto alguns estudos sugerem que cerca de 9% dos pacientes em unidades de isolamento respiratório preenchem os critérios para LPA em algum momento durante sua admissão (QUARTIN et al., 2009).

Pesquisas vêm demonstrando que fatores genéticos, demográficos, idade e fatores sociais como tabagismo e abuso de álcool são condições de risco para o aparecimento e desenvolvimento de LPA (LEWANDOWSKI et al., 2006; RUBENFELD et al., 2005).

A lesão pulmonar aguda ocorre quando há um processo inflamatório exacerbado no espaço alveolar que causa a ruptura das barreiras endoteliais e epiteliais do pulmão (WARE et al., 2000). As características celulares do LPA incluem perda da integridade da membrana alvéolo-capilar, migração excessiva de neutrófilos e liberação de mediadores citotóxicos pró-inflamatório (MATTHAY et al.,

2005). Pacientes com LPA geralmente apresentam dispneia grave, taquipneia e hipoxemia resistente, além das características clínicas da lesão inicial (por exemplo, perfuração do intestino e síndrome da sepse).

A experimentação com animais mesmo que limitada em sua capacidade de mimetizar a LPA, é indispensável para melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos e desenvolvimento de novas terapias (MATTHAY et al., 2012). E nesse estudo para mimetizar a LPA foi utilizada a administração de endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias gram-negativas, que vem sendo bastante utilizada por diversos grupos de pesquisa (MATTEBELLO et al., 2008). O LPS tem a capacidade de ativar o sistema imunológico e com isso ele induz uma variedade de respostas imunológicas como, por exemplo, a inflamação, produção de anticorpos e choque térmico (MIKUNI et al., 2000).

1.4 Imunologia da LPA

A LPA tem como uma das principais características o recrutamento de neutrófilos para o pulmão. O acúmulo de neutrófilos ativados nos pulmões é um passo inicial no processo inflamatório pulmonar que leva ao LPA. Diversos modelos experimentais mostraram que a gravidade da LPA está diretamente relacionada à presença e a proporção de neutrófilos (BAUMANN et al., 2008). Juntamente com a ativação e recrutamento desses neutrófilos ocorre a liberação de quimiocinas alveolares e sistêmicas (por exemplo, CXCL-8, ENA-78) (O'KANE et al., 2009), citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral), reagentes de fase aguda (por exemplo, proteína C-reativa, lipocalina) e enzimas de remodelação da matriz (por exemplo, MMP-9) (NATHANI et al., 2008; WARE et al., 2000).

A perda da integridade da membrana alvéolo-capilar é uma característica celular da LPA já que durante a LPA a inflamação neutrófilica exacerbada causa danos na barreira alvéolo-capilar o que leva ao desenvolvimento do edema pulmonar não cardiogênico causando prejuízo na troca gasosa, levando o paciente a ter dificuldade processo respiratório (WARE et al., 2000).

Na patogênese da LPA os neutrófilos aderem ao endotélio capilar e lesionam o interstício no espaço alveolar, que passa a ser preenchido com fluido de

edema rico em proteínas. Os neutrófilos liberam oxidantes, proteases, leucotrienos e outras substâncias inflamatórias (MORAES et al., 2006). As proteases danificam a matriz extracelular do pulmão para facilitar a migração de neutrófilos do capilar para o espaço alveolar (PITTET et al., 1997).

A persistência elevada de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) após a primeira semana de LPA está diretamente associada com mortalidade (GOODMAN et al., 2003). Em diversos modelos experimentais, depleção de neutrófilos ou bloqueio de seu recrutamento atenua a lesão pulmonar (Martin et al., 1989).

Além dos neutrófilos os macrófagos também desempenham um papel importante na LPA, e são células essenciais para a imunidade inata e desempenham função de destaque no pulmão e nos espaços alveolares. Diversos estudos apoiam a importância dos macrófagos em iniciar e manter a resposta inflamatória, tendo papel crucial na iniciação e desenvolvimento da LPA (AGGARWAL et al., 2014). Os macrófagos alveolares secretam citocinas como interleucina 1, IL-6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF- α), que atuam localmente para estimular a quimiotaxia e ativar neutrófilos, consideradas mediadores chaves no desenvolvimento da doença (JOHNSON et al., 2010).

Os macrófagos alveolares estão no centro do desenvolvimento da inflamação. Macrófagos são ativados via famílias de receptores de reconhecimento de padrões relacionados, incluindo TLRs e receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação de nucleótidos (HANSEN et al., 2011). Os TLRs são receptores que estão presentes em células imunes, como as dos macrófagos e neutrófilos, e em células não imunes, que são capazes de reconhecer padrões moleculares presentes em patógenos microbianos não conservados em eucariotos e ativam o sistema imune, montando a resposta inata e organizando a resposta adaptativa (KAWAI e AKIRA, 2010; MEDZHITOV, 2001). Esses receptores reconhecem uma variedade de PAMPs a exemplos de RNA e DNA viral, β -glucana de fungos e LPS bacteriano (RIFKIN et al., 2005) e ativam as células que os expressam, dando início ao processo inflamatório. Esses receptores de reconhecimento são muito importantes e na LPA vale destacar os do tipo toll (TLRS), especificamente os TLR4 e TLR2 que desempenham um papel importante

no desenvolvimento da LPA após a ativação de macrófagos alveolares (FAN et al., 2006).

Evidências de vários estudos indicam que as citocinas TNF- α e IL-6 desempenham um papel importante na mediação, amplificação e perpetuação da lesão pulmonar aguda induzida por LPS. As citocinas que aparecem primeiro na resposta inflamatória aguda são o TNF- α e a IL-1 β e na LPA seus papéis já são bem conhecidos (GOODMAN et al., 2003). Embora TNF- α participe tanto da resposta inflamatória inicial como na tardia, é uma citocina extremamente importante no desenvolvimento da LPA (ISOWA et al., 1999; MCRITCHIE et al., 2000). A IL-6 quando liberada, aumenta os sinais pró-inflamatórios iniciais no espaço alveolar (FIELDING, 2008).

A interleucina-8 (IL-8) também está envolvida na patogênese da LPA, vários estudos relatam a presença de IL-8 no BALF de LPA, a IL-8 é uma citocina quimiotática que recruta os neutrófilos direcionando a migração dessas células para o pulmão, favorecendo sua ativação (GOODMAN et al., 2003).

A LPA é uma síndrome comum e pouco reconhecida, apesar do avanço na sua identificação e manejo com o paciente, a mortalidade ainda é muito alta. Além disso, não existe tratamento terapêutico licenciado para LPA em si. Nesse contexto, fazem-se necessárias pesquisas para o melhor entendimento e reconhecimento dessa patologia. Considerando os efeitos anti-inflamatórios da ouabaína descritos pelo nosso grupo (CALVACANTE et al., 2017), este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da ouabaína na migração de células e na produção de citocinas inflamatórias frente ao modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida pelo LPS. Dessa forma será possível contribuir para um melhor entendimento tanto da lesão pulmonar aguda como dos efeitos da ouabaína no sistema imunológico.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esse estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito da ouabaína na migração de células e produção de citocinas inflamatórias frente a um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida pelo LPS.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação de ouabaína na migração de leucócitos totais e diferenciais (macrófagos e neutrófilos) no BALF dos animais com LPA experimental;
- Avaliar a ação de ouabaína na produção das citocinas pró inflamatórias TNF- α e IL-6 na região bronco-alveolar dos animais com LPA experimental;
- Avaliar a ação de ouabaína na expressão do TLR4 nas células presentes no fluido do lavado bronco-alveolar dos animais com LPA experimental;

METODOLOGIA

3 Metodologia

3.1 Animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c machos com idade entre 6-8 semanas. Estes foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas com livre acesso à água filtrada e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* (PURINA) durante todo o período de experimentação. Foram divididos em grupos e cada grupo experimental foi composto por 6 animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia e a anestesia foram realizadas pela administração intra-muscular (i.m.) de solução anestésica contendo 29 mg/mL de cetamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9%).

Os animais utilizados nesse trabalho foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM/UFPB. Os procedimentos experimentais desse trabalho foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB), sob a certidão nº 094/2016 (ANEXO I).

3.2 Preparação da ouabaína

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

3.3 Protocolo experimental de LPA induzida por LPS

Para mimetizar a lesão pulmonar aguda, os animais foram previamente anestesiados como descrito anteriormente e receberam por instilação nasal, 40 µL de uma solução contendo LPS (LPS de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich®) na dose

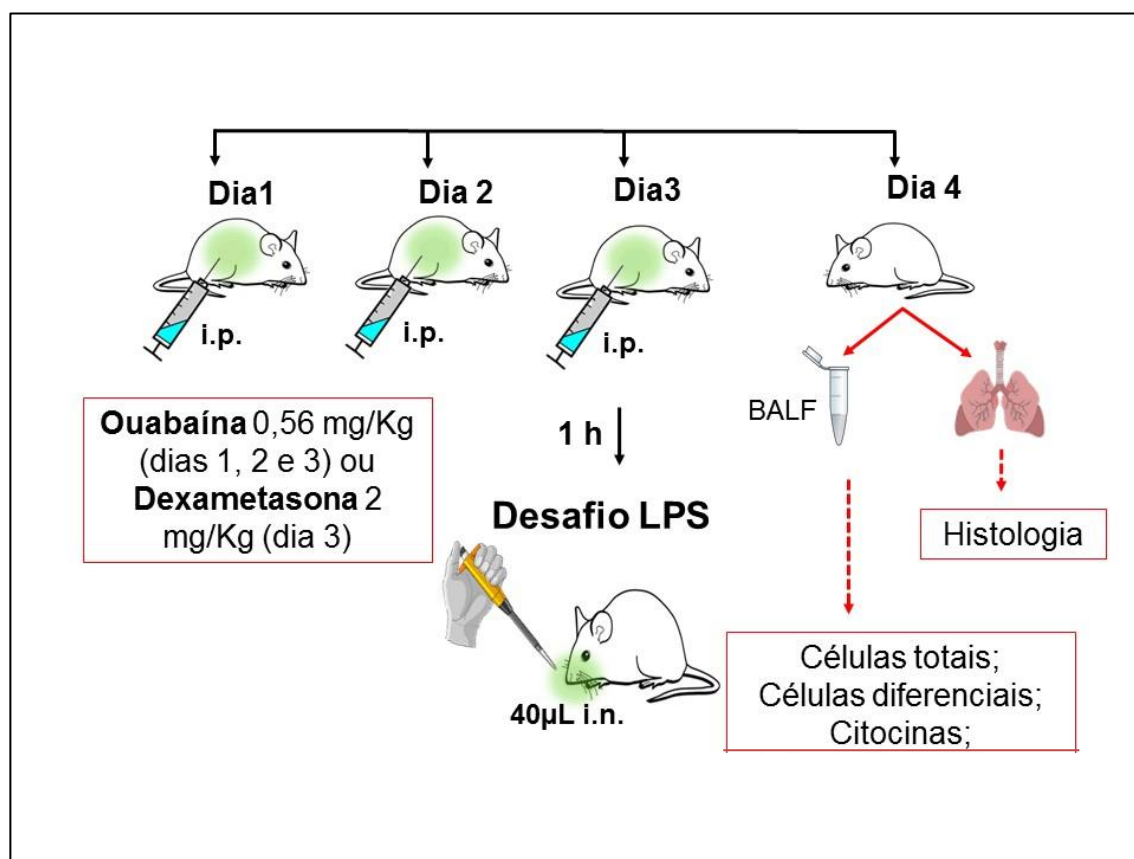
de 2,5 mg/Kg diluído em salina estéril e preparado imediatamente antes do uso (OLIVEIRA, 2014). O grupo controle recebeu a mesma quantidade do veículo estéril via intranasal. Os animais foram mantidos em condições normais e 24 horas após o desafio foram eutanasiados por overdose anestésica e o material biológico foi então coletado. Coletou-se o fluido do lavado broncoalveolar (BALF), para quantificação de citocinas e determinação do influxo de proteínas (sobrenadante), contagem de células e marcação celular (pellet).

3.4 Grupos experimentais e tratamento dos animais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (BASAL, LPS, OUA, OUA+LPS e DEXA+LPS) todos constituídos por 6 animais. O grupo BASAL representa animais saudáveis (não desafiados com LPS), que expressam os níveis imunológicos basais; o grupo LPS (desafiados com LPS), representa animais doentes, que apresentam alterações imunológicas devido a um quadro patológico de inflamação pulmonar aguda; o grupo OUA representa animais saudáveis tratados com ouabaína; o grupo OUA+LPS representa os animais tratados com ouabaína e desafiados com LPS; por fim o grupo DEXA+LPS representa os animais tratados com dexametasona (DECADRON[®]) e desafiados com LPS. Os animais foram tratados com ouabaína (0,56 mg/Kg) via intraperitoneal por três dias consecutivos antes do desafio ou tratados com dexametasona (2 mg/Kg) um único dia antes do desafio, o grupo BASAL recebeu apenas o veículo (salina estéril) durante os tratamentos. Após 1 hora do último tratamento com ouabaína e do tratamento com dexametasona os animais dos grupos LPS, LPS+OUA e LPS+DEXA foram desafiados com LPS. Para tanto, esses animais receberam via instilação nasal (i.n.) 40 µL de uma solução de LPS na dose de 2,5 mg/Kg que foi gotejada nas narinas até total absorção (OLIVEIRA, 2014). O esquema dos tratamentos e do protocolo de LPA podem ser visualizados na tabela 1 e na figura 2.

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

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

Figura 2. – Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS

3.5 Obtenção do lavado broncoalveolar e determinação da migração de leucócitos totais e diferenciais

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

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

$$\text{Equação 1: } C_T = \frac{C_C}{C_{CH}} \cdot F_D = \frac{C_C}{4} \cdot 4 \cdot 10^4$$

Após a contagem das células totais, o BALF foi centrifugado (centrífuga

CR422, JONAM) em 1000 RPM a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e congelados à -20°C para posterior dosagem de citocinas.

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

3.6 Quantificação das citocina IL-6 e TNF- α no BALF

Na quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α foi utilizado o sobrenadante do BALF armazenado a -20°C. Foi realizado Teste Imunoenzimático de ELISA direto ou sanduíche, que tem como base as interações antígeno-anticorpo. Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante de cada citocina (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

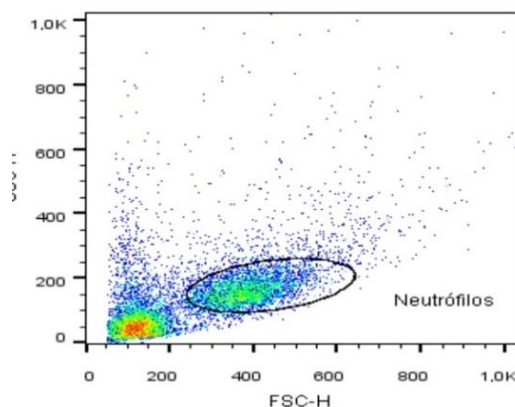
Placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura específico para cada citocina, e incubadas por 18 h a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10 % de SFB) por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C. Depois da incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas e incubadas novamente por uma hora. Posteriormente, foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionado. As placas foram incubadas por meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo

tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e a leitura realizada em leitor de microplaca (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

3.7 Avaliação da expressão do TLR4

Para a realização da avaliação da expressão do TLR4 foi feita citometria de fluxo, as células que foram obtidas do fluido do lavado broncoalveolar foram ajustadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/tubo de citômetro. Em seguida, as células foram lavadas com PBS acrescido de soro fetal bovino (2%) por 12 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas. Posteriormente, as células foram incubadas, mediante as instruções do fabricante, com o anticorpo anti-TLR4. Após a incubação, as células foram lavadas e suspensas em PBS para leitura no citômetro. A medida da fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo, BD FACSCalibur™ com 4 cores, equipado com laser de íons de argônio de 15 mW em 488 nm e com laser diodo em 635 nm, resfriados a ar. A fluorescência foi detectada após passagem em filtro de 585 nm (FL2) e a população de neutrófilos foi selecionada para a geração do histograma para a expressão do TLR4 (figura 3). Os resultados obtidos foram analisados empregando-se o software Flowjo.

Figura 3 - Esquema de citometria de fluxo para análise da expressão do receptor TLR4



3.8 Análise estatística

Todos 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 $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.0 (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

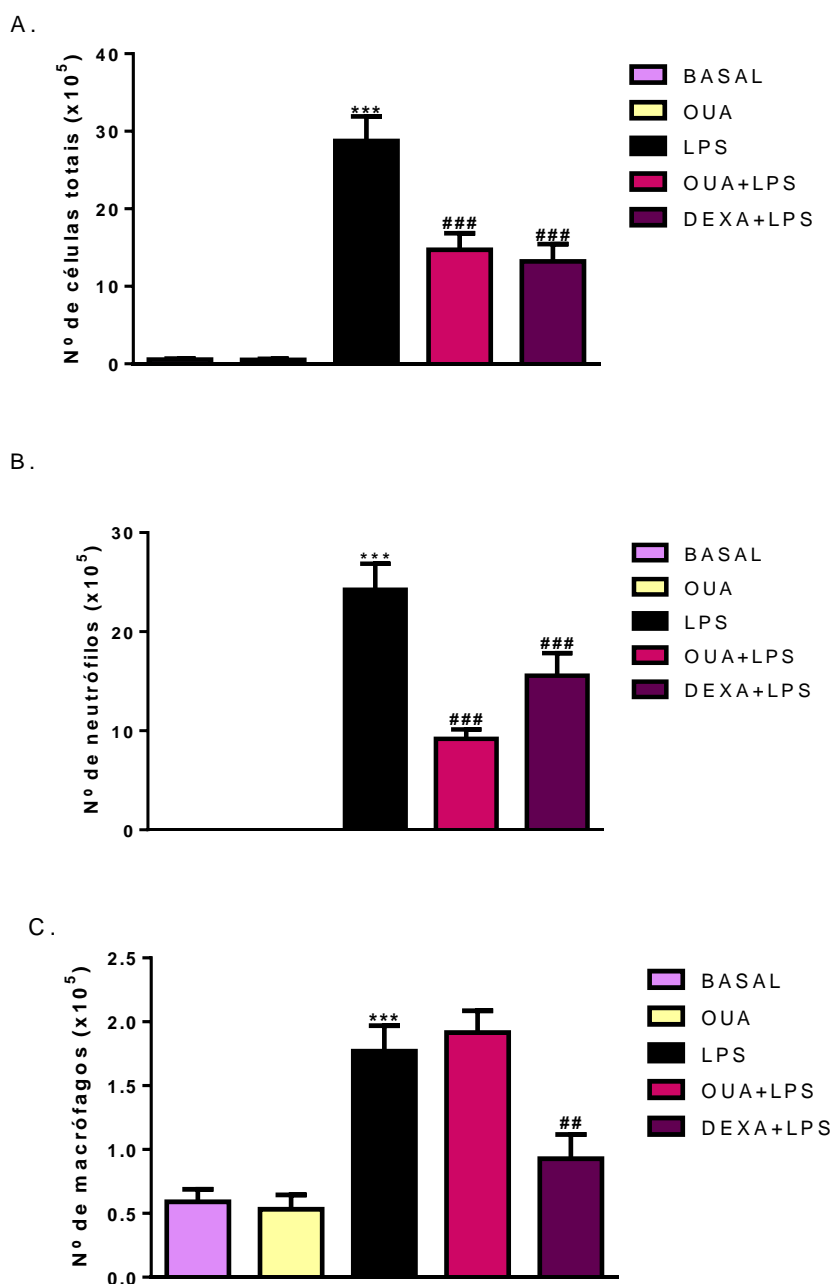
4 Resultados

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

Nesse primeiro resultado foi visto que o grupo desafiado com LPS teve um aumento representativo ($p < 0,0001$) nos números de leucócitos totais comparados com o grupo dos animais que não foram desafiados, o grupo BASAL, comprovando assim que o LPS foi capaz de induzir a migração das células para o sítio inflamado. O grupo pré-tratado com a ouabaína apresentou uma redução de 48,84% na migração de leucócitos na migração induzida pelo LPS (Gráfico 1 A). E o grupo tratado com a droga padrão dexametasona teve uma redução de 54,05% na migração. O grupo tratado com ouabaína que não sofreu o desafio com LPS (grupo OUA) apresentou resultados semelhantes ao grupo BASAL, mostrando que a ouabaína sozinha sem o estímulo inflamatório não é capaz de alterar a migração de células (Gráfico 1 A).

Foi feita a análise diferencial das células e foi visto que o aumento dos leucócitos no BALF dos animais que foram desafiados com LPS está relacionado à migração de macrófagos ($p < 0,05$) e de neutrófilos ($p < 0,0001$). O grupo tratado com ouabaína foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos em 70,7 % ($p < 0,0001$) no BALF dos animais (Gráfico 1 B), e não foi capaz de alterar a migração de macrófagos (Gráfico 1 C). Diferentemente, o grupo tratado com a dexametasona diminuiu tanto a migração de neutrófilos como a de macrófagos, agindo de forma inespecífica. E o grupo OUA, que foi tratado com ouabaína e não foi desafiado com LPS apresentou níveis de macrófagos e neutrófilos iguais aos do grupo BASAL.

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



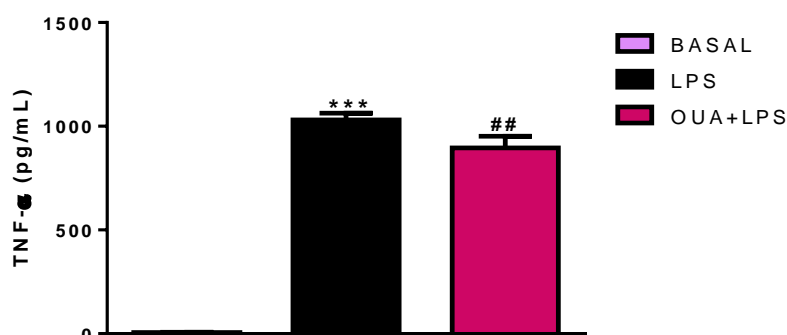
Os valores representam a média \pm erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Valores de $**p < 0.001$ e $***p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo Basal, e $\#p < 0.05$; $\#\#p < 0.001$ e $\#\#\#p < 0.0001$ foram considerados significativos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

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

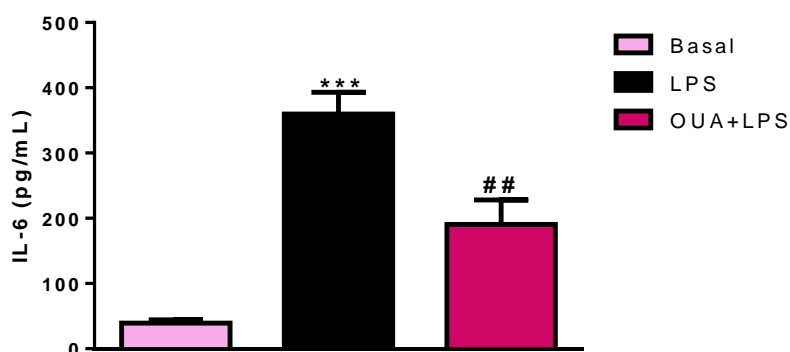
Neste resultado, o grupo que foi desafiado com LPS teve o número de citocinas pró-inflamatórias aumentadas TNF- α e IL-6 no BALF quando comparado com o grupo BASAL. O grupo que foi tratado com a ouabaína apresentou uma diminuição na produção das citocinas, o TNF- α sofreu redução de 14,80% e a IL-6 de 47,07% (gráfico 3 A e B).

Gráfico 2 - Efeito do tratamento com ouabaína na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6

A.



B.

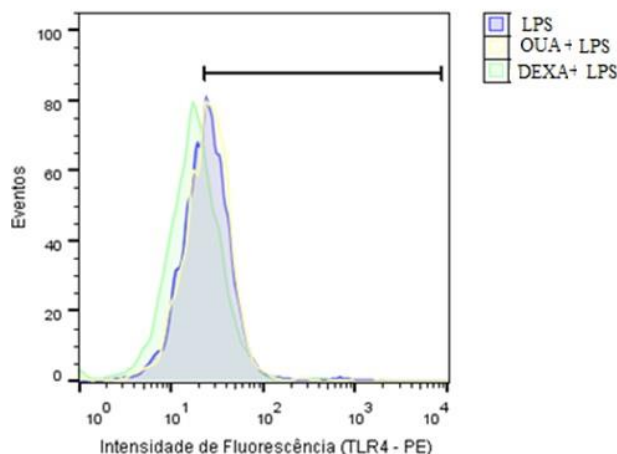


Os valores representam a média \pm erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Valores de ** $p < 0.001$ e *** $p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo Basal, e # $p < 0.05$; ## $p < 0.001$ e ### $p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo LPS. (A) efeito do tratamento com ouabaína na produção de TNF- α . (B) efeito do tratamento com ouabaína na produção de IL-6.

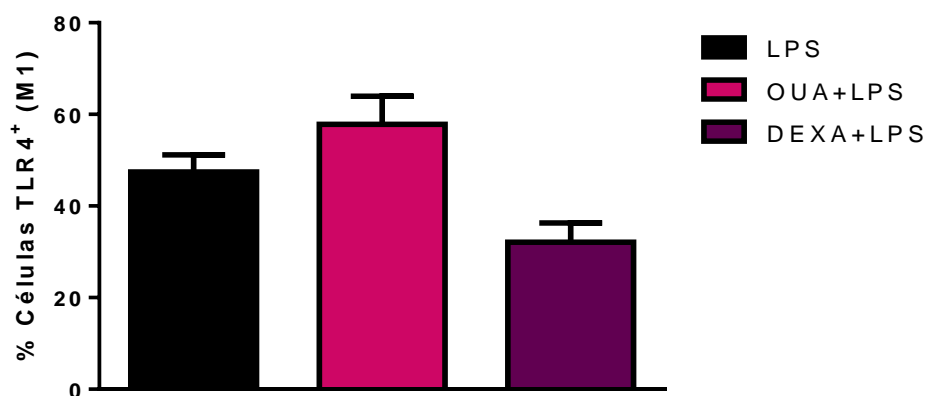
4.3 Efeito do tratamento da ouabaína na expressão do TLR4

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

Figura 4 - Histograma representativo para a expressão do TLR4



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

Gráfico 3 - Efeito do tratamento com ouabaína na expressão do TLR4

Os valores representam a média \pm erro padrão da média. ANOVA one way/teste de Dunnet foram aplicados. Não foi observada diferença estatística entre os grupos. O tratamento com ouabaína na dose de 0,56 mg/kg por 3 dias consecutivos ou com a droga padrão dexametasona (2 mg/Kg dose única) não alteraram a expressão deste receptor.

DISCUSSÃO

5 Discussão

De acordo com os resultados observados o presente trabalho mostrou que a ouabaína é capaz de modular negativamente o processo de migração celular na lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

O animais foram pré-tratados três dias consecutivos utilizando a dose de 0,56 mg/Kg, estudos anteriores do nosso grupo observaram que está dose apresenta atividade anti-inflamatória em diversos modelos de inflamação (DE VASCONCELOS et al., 2011; LEITE et al., 2015).

No modelo experimental de leishmaniose experimental *in vivo*, a ouabaína interfere na resposta inflamatória desencadeada pela *Leishmania (L.) amazonenses*, principalmente nos eventos iniciais, como migração de neutrófilos e produção das citocinas TNF- α e INF- γ (JACOB et al., 2012).

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome clínica caracterizada por resposta inflamatória exacerbada nos pulmões, o que pode levar a um rompimento da parede alvéolo-capilar provocando graves consequências para as trocas gasosas (WARE, 2000). O recrutamento de neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) no pulmão é um evento chave para o desenvolvimento da LPA (ABRAHAM et al., 2000). Os neutrófilos quando são ativados podem liberar metabólitos potencialmente prejudiciais, incluindo enzimas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, citocinas e fatores de crescimento (MORAES et al., 2006)

Diante disso, analisamos se a ouabaína seria capaz de diminuir o recrutamento de neutrófilos para região broncoalveolar durante a LPA e observou-se que o tratamento com esse glicosídeo diminuiu a migração dessas células (Gráfico 1 B), corroborando nossos achados com os dados já publicados na literatura pelo nosso grupo (LEITE et al., 2015), que já relatam que a ouabaína reduz migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos induzida por estímulos inflamatórios a exemplo do zimosan) e no modelo de inflamação pulmonar crônica (asma alérgica) (GALVÃO et al., 2017).

No espaço alveolar, o recrutamento e o acúmulo de neutrófilos assim como a proporção destes estão diretamente relacionados à gravidade da doença (O'KANE et al., 2009; NATHANI et al., 2008; WARE et al., 2000), com isso a inibição da migração dessas células é essencial para a resolução e controle da LPA (ABRAHAM

et al., 2000), o que engrandece a importância do resultado obtido. O grupo desafiado com LPS teve um aumento no número de células totais e na migração de leucócitos mostrando a efetividade do lipossacarídeo, já que este induziu a extensa migração de neutrófilos para o sítio inflamado.

Foi analisado também se ouabaína seria capaz de diminuir a migração de macrófagos já que estes também desempenham um papel importante no desenvolvimento da LPA (AGGARWAL et al., 2014). No entanto, nesse estudo a ouabaína não foi capaz de reduzir a migração desses mononucleares, diferentemente da dexametasona que diminuiu também a migração dessas células (Gráfico 1 B). Com isso, podemos deduzir que a ação da ouabaína no processo de migração de leucócitos durante a LPA é específica para neutrófilos, ao contrário da dexametasona que é capaz de reduzir neutrófilos e macrófagos agindo de maneira inespecífica. O tratamento com a dexametasona, uma droga padrão, já usada no mercado farmacêutico com atividades anti-inflamatórias foi feito a fim de comparar seus efeitos com os efeitos da ouabaína. Observamos que tanto a ouabaína quanto a dexametasona foram capazes de reduzir a migração de neutrófilos, embora de formas diferentes.

A resposta inflamatória na LPA é iniciada, amplificada e modulada por uma complexa rede de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias (GOODMAN et al., 2003). A lesão causa a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 (MILLER et al., 1996). Diante disto, analisamos a produção de duas citocinas importantes na patogênese da LPA: IL-6 e TNF- α .

O fator de necrose tumoral é considerado uma das principais citocinas inflamatórias e imunológicas (CARSWELL, 1975). Estudos demonstram que no BALF de pacientes com LPA o TNF- α é encontrado em alta concentração (ISOWA et al., 1999; MCRITCHIE et al., 2000). O LPS é um estímulo para a produção do TNF- α e durante a LPA esta citocina é sintetizada localmente no pulmão (BROIDE et al., 1992), age localmente em outras células, incluindo macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais para estimular a produção de outras citocinas importante para o desenvolvimento da LPA (MILLER et al., 1996). Estudos relatam também que níveis persistentemente elevados de IL-6 em pacientes com LPA são

fortes indicativos de predisposição a mortalidade (MEDURI et al., 1995; MARSHALL et al, 2002).

O grupo tratado com LPS teve aumento significativo na produção das citocinas IL-6 e TNF- α , comprovando a eficiência do modelo experimental em mimetizar as ações celulares da LPA. O tratamento com ouabaína foi capaz de diminuir a produção dessas citocinas (Gráfico 2 A e B). Até então, não havia relatos sobre esse efeito modulador da ouabaína na LPA, embora já existam diversos estudos mostrando a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora da ouabaína em outros modelos experimentais. Em outros trabalhos a ouabaína foi capaz de reduzir a inflamação induzida por zimosan, inibindo a atividade do NF-kB, um fator de transcrição importante para produção de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-1 β (LEITE et al., 2015). Além da regulação negativa da resposta inflamatória desencadeada pela (*L.*) *amazonensis* em camundongos (JACOB et al., 2013), na asma alérgica, a ouabaína reduziu a produção de citocinas como IL-4 e IL-13 (GALVÃO et al., 2016).

Outro fato importante sobre a LPA é participação de receptores de reconhecimento padrão. Nessa patologia vale destacar os do tipo toll (TLRS). Esses receptores estão presentes em algumas células imunes e são responsáveis por desencadear diversas cascatas de sinalização que podem estimular a produção do NF-kB e mediadores pró inflamatórios (KAWAI e AKIRA, 2010; MEDZHITOV, 2001).

Já se sabe que o LPS molécula utilizada nesse estudo para induzir a LPA atua via receptor Toll-like 4 (TLR4), desencadeando uma forte reação imunológica que culmina com processo inflamatório exacerbado (MORRIS e LI, 2012). Por isso, para sabermos se o receptor TLR4 estava envolvido no mecanismo modulador da ouabaína durante a LPA analisamos a expressão deste receptor.

Nos resultados (gráfico 3) foi observado que tanto o tratamento com ouabaína como o tratamento com a droga padrão dexametasona não foram capazes de alterar a expressão do TLR4, o que mostra que o efeito da ouabaína na migração celular e produção de citocinas inflamatórias na LPA induzida por LPS parece ser independente da ação desse glicosídeo na expressão desse receptor.

Diante disso, nossos achados atrelados aos dados publicados na literatura nos levam a sugerir que a ouabaína modula negativamente o processo inflamatório

durante a LPA induzida por LPS, diminuindo a migração de células e a produção de citocinas inflamatórias. Efeitos aparentemente independentes da ação da ouabaína na expressão do TLR4.

CONCLUSÕES

5 Conclusões

A análise dos resultados deste trabalho permitir concluir que a ouabaína:

- O pré-tratamento com a ouabaína modula negativamente o processo inflamatório na lesão pulmonar aguda
- A ouabaína diminuiu a migração de neutrófilos
- Diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias: IL-6 e TNF- α
- O mecanismo de ação da ouabaína na LPA independe do receptor TLR-4

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Edward *et al.* Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 6, p. L1137-45, 2000.

AGGARWAL, N. R.; KING, L. S.; D'ALESSIO, F. R. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 8, p. L709-25, 2014.

ASHBAUGH DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. **Lancet** 1967;2:319–23.

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

BAUMANN, Hans Joerg *et al.* Yield and safety of bedside open lung biopsy in mechanically ventilated patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. **Surgery**, v. 143, n. 3, p. 426-433, 2008.

BERNARD, Gordon R. *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 149, n. 3, p. 818-824, 1994.

BLAUSTEIN, Mordecai P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 264, n. 6, p. C1367-87, jun. 1993.

BROIDE, D. H., *et al.* Cytokines in symptomatic asthma airways. **J. Allergy Clin Immunol**, v.89, n.5, p.958-957,1992.

CARSWELL, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

CAVALCANTE-SILVA, Luiz Henrique Agra *et al.* Much more than a cardiotonic steroid: modulation of inflammation by ouabain. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 895, 2017

DA SILVA, Joyle Moreira Carvalho *et al.* Dynamics of murine B lymphocytes is modulated by *in vivo* treatment with steroid ouabain. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 368-76, fev. 2016.

DE MORAES, V. L. *et al.* Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 12, p. 2425-2429, 1989.

DE PAIVA, Luciana S. *et al.* Modulation of mature B cells in mice following treatment

with ouabain. **Immunobiology**, v. 216, n. 9, p. 1038-43, set. 2011.

DE VASCONCELOS, Danielle Ingrid Bezerra *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2011, ID 912925, 11 p. 2011.

DE WARDENER, H. E. The hypothalamus and hypertension. **Physiological reviews**, v. 81, n. 4, p. 1599-1658, 200

DVELA-LEVITT, Moran *et al.* Reduction in maternal circulating ouabain impairs offspring growth and kidney development. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 5, p. 1103-14, maio 2015.

DORNAND, J. *et al.* Paradoxical production of mouse thymocyte activating factor by ouabain-treated human mononuclear cells. **Cellular Immunology**, .83, p351-359,1984.

DOWDY, David W. *et al.* Quality of life after acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. **Intensive care medicine**, v. 32, n. 8, p. 1115-1124, 2006.

FAN, Jie *et al.* Hemorrhagic shock primes for increased expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the lung: role in pulmonary inflammation following lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 1, p. 440-7, 1998.

FAN, J., Y. Li, Y. Vodovotz, T. R. Billiar, and M. A. Wilson. 2006. Hemorrhagic shock-activated neutrophils augment TLR4 signaling-induced TLR2 upregulation in alveolar macrophages: role in hemorrhage-primed lung inflammation. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.** 290: L738–L746.

FIELDING, Ceri A. *et al.* IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 2189-95, ago. 2008..

FOEY, A. D.; CRAWFORD, A.; HALL, N. D. Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na,K-ATPase activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1355, p. 43-9, 1997.

GALVÃO, José Guilherme FM *et al.* Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 12, p. 1117-1130, 2017.

GOODMAN, Richard B. *et al.* Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 14, n. 6, p. 523-35, 2003.

GOSS, Christopher H. *et al.* Incidence of acute lung injury in the United States. **Critical care medicine**, v. 31, n. 6, p. 1607-1611, 2003.

GROSS, N. B.; HARRINGTON, M. G. Cerebroventricular sodium, regulated by Na, K, ATPase and endogenous ouabain, changes neuronal excitability in a rat migraine model. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1 Supplement, p. 935.7, 2016.

HAMLYN, John M. *et al.* Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 14, p. 6259-63, jul. 1991.

HANSEN, John D.; VOJTECH, Lucia N.; LAING, Kerry J. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 9, p. 886-897, 2011.

HYERS, Thomas M. *et al.* Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, v. 144, n. 2, p. 268-271, 1991.

ISOWA, Noritaka *et al.* LPS-induced depolymerization of cytoskeleton and its role in TNF- α production by rat pneumocytes. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 277, n. 3, p. L606-L615, 1999.

JACOB, P. L. *et al.* Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania amazonensis*-infected Swiss mice. **Parasitology research**, v. 112, n. 3, p. 1313-21, mar. 2013.

JACOB, P. L. *et al.* Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania amazonensis* infected Swiss mice. **Parasitol Res.**, v. 112, p. 1313-21, 2012.

JOHNSON, E. R.; MATTHAY, M. A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 243-52, 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-84, 2010.

LAREDO, James *et al.* Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension**, v. 29, n. 1, pt. 2, p. 401-7, jan. 1997.

LEITE, Jacqueline Alves *et al.* Ouabain modulates zymosan-induced peritonitis in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2015, ID 265798, 12 p. 2015.

LEWANDOWSKI, K.; LEWANDOWSKI, M. Epidemiology of ARDS. **Minerva anesthesiologica**, v. 72, n. 6, p. 473-477, 2006.

LEWIS, J. F.; JOBE, A. H. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, n. 1, p. 218-233, 1993.

LEWIS, Lynley K. *et al.* Endogenous ouabain is not ouabain. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 680-683, 2014.

MANN, Cynthia L. *et al.* Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5059-68, dez.

2001.

MARTIN, Thomas R. et al. Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability. **The Journal of clinical investigation**, v. 84, n. 5, p. 1609-1619, 1989.

MATTHAY, Michael A.; ZIMMERMAN, Guy A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 319-327, 2005.

MATTHAY, M. A, WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**. 122(8):2731–2740, 2012.

MATSUMORI, A. et al. Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain. **Citokine**, v. 12, p.294-297, 2000;

MATSUMORI, Akira *et al.* Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. **Circulation**, v. 96, n. 5, p. 1501-06, 1997.

MATUTE-BELLO, Gustavo *et al.* Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. L379-99, 2008.

MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135-45, 2001.

MIKUNI, Y., et al. Expression of Toll-like Receptor 2 on T Cells Bearing Invariant Vg6/vd1 Induced by Escherichia Coli Infection in Mice. **J. Immunol.**, v 165, p. 931-940, 2000.

MILLAR, A. B. et al. Tumour necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. **The Lancet**, v. 334, n. 8665, p. 712-714, 1989.

MILLER, Edmund J.; COHEN, Allen B.; MATTHAY, Michael A. Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. **Critical care medicine**, v. 24, n. 9, p. 1448-1454, 1996.

MORAES, Theo J. *et al.* Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. **Current opinion in hematology**, v. 13, n. 1, p. 21-7, 2006.

MORRIS, M; LI, L. Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 13-8, 2012.

NATHANI, Nazim et al. Kerbs von Lungren 6 antigen is a marker of alveolar inflammation but not of infection in patients with acute respiratory distress

syndrome. **Critical Care**, v. 12, n. 1, p. R12, 2008.

NESHER, Maoz et al. Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 6, p. H2026-H2034, 2009.

OLEJ, Beni *et al.* Effect of ouabain on lymphokine-activated killer cells. **International journal of immunopharmacology**, v. 16, n. 9, p. 769-74, set. 1994.

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

OLIVEIRA, Maria Talita Pacheco de et al. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahidroisoquilínico**. 2014. 113 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

O'KANE, Cecilia M. et al. Salbutamol up-regulates matrix metalloproteinase-9 in the alveolar space in the acute respiratory distress syndrome. **Critical care medicine**, v. 37, n. 7, p. 2242-2249, 2009.

ÖZDEMİR, Aysun et al. Cardiac glycoside-induced cell death and Rho/Rho kinase pathway: Implication of different regulation in cancer cell lines. **Steroids**, v. 109, p. 29-43, 2016

PAREKH, D.; DANCER, R. C.; THICKETT, D. R. Acute lung injury. **Clinical Medicine**, v. 11, n. 6, p. 615-8, 2011.

PARK, William Y. *et al.* Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 10, p. 1896-903, 2001.

PEZZANI, Raffaele et al. The antiproliferative effects of ouabain and everolimus on adrenocortical tumor cells. **Endocrine journal**, v. 61, n. 1, p. 41-53, 2014.

PITTET, J. F. *et al.* Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 155, n. 4, p. 1187-205, 1997.

PONGRAKHANANON, Varisa; CHUNHACHA, Preedakorn; CHANVORACHOTE, Pithi. Ouabain suppresses the migratory behavior of lung cancer cells. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68623, 2013.

QUARTIN, Andrew A. et al. Acute lung injury outside of the ICU: incidence in respiratory isolation on a general ward. **Chest**, v. 135, n. 2, p. 261-268, 2009.

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

RIFKIN, Ian R. *et al.* Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunological reviews*, v. 204, n. 1, p. 27-42, 2005.

RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra *et al.* CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. *Life sciences*, v. 73, n. 8, p. 1037-51, jul. 2003.

RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra *et al.* Modulation of the immune system by ouabain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1153, n. 1, p. 153-163, 2009.

ROBBERS, James E.; SPEEDIE, Marilyn K.; TYLER, Varro E. Farmacognosia e farmacobiotechnologia. **São Paulo: Premier**, p. 92-121, 1997.

RUBENFELD, Gordon D. *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685-93, 2005.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. **American journal of cardiovascular drugs**, v. 7, n. 3, p. 173-89, maio 2007.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. C509-36, ago. 2007.

SCHONER, Wilhelm. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 10, p. 2440-8, maio 2002.

SCHONER, Wilhelm. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes**, v. 108, n. 07, p. 449-54, 2000.

SIMONINI, Marco *et al.* Endogenous Ouabain: An Old Cardiotonic Steroid as a New Biomarker of Heart Failure and a Predictor of Mortality after Cardiac Surgery. **BioMed research international**, v. 2015, ID 714793, 10 p. 2015.

SZAMEL, Marta; SCHNEIDER, Siegfried; RESCH, K. Functional interrelationship between (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen-stimulated rabbit thymocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 17, p. 9198-9204, 1981.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1334-49, 2000.

SHIH, Yung-Luen *et al.* Ouabain impairs cell migration, and invasion and alters gene expression of human osteosarcoma U-2 OS cells. **Environmental toxicology**, v. 32, n. 11, p. 2400-2413, 2017.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I - Certidão do CEUA



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito imunomodulador de ouabaina em modelo experimental de sepse e em macrófagos peritoneais murinos”, protocolo nº 094/2016 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 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2017 – 2021
Espécie/linhagem	<i>Mus musculos</i> / Balb/C
Número de animais	228
Idade/Peso	25-30 g / 6-8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB