



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

MATEUS DA SILVA MATIAS ANTUNES

Efeito da Ouabáína em células do tumor de Ehrlich: avaliação *in vitro* da viabilidade e da produção de citocinas

JOÃO PESSOA

2019

MATEUS DA SILVA MATIAS ANTUNES

Efeito da Ouabaína em células do tumor de Ehrlich: avaliação *in vitro* da viabilidade e da produção de citocinas

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

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Cruz Nunes

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A636e Antunes, Mateus da Silva Matias.

Efeito da Ouabaina em células do tumor de Ehrlich: avaliação in vitro da viabilidade e da produção de citocinas / Mateus da Silva Matias Antunes. - João Pessoa, 2019.

59 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: Fabíola da Cruz Nunes.


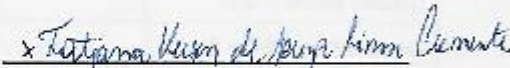
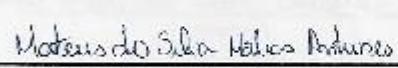
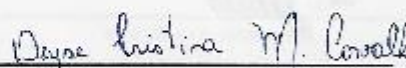
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Ouabaina. 2. Células de Ehrlich. 3. Inflamação. 4. Câncer. 5. In vitro. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Nunes, Fabíola da Cruz. III. Título.

UFPB/BC

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dezenove dias do mês de setembro de 2019, às 10:00h, 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. Fabíola da Cruz Nunes (DBCM/CBIOTEC/UFPB) e composta pelas avaliadoras: 1. Profa. Dra. Tatjana Koesen de Souza Lima Clemente (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. M^a Dayse Cristina Madruga Carvalho (PMPGCF/UFPB), o discente Mateus da Silva Matias Antunes, matrícula 11503099, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **"Efeito da ouabaina em células do tumor de Ehrlich: avaliação *in vitro* da viabilidade e produção de citocinas"**, 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 ao discente e demais presentes e eu, Fabíola da Cruz Nunes, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.

 _____ Presidente Orientadora	 _____ Avaliador 1
 _____ Discente	 _____ Avaliador 2

João Pessoa/PB, 19 de setembro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivanildo Matias e Elizabete Antunes, que com palavras e atitudes me ensinaram o que os livros e a academia jamais poderiam me ensinar;

Aos meus irmãos, Nayara Matias e Thiago Matias, que acima da herança genética compartilham comigo a mesma história e contribuem profundamente para a formação do que sou;

Ao meu melhor amigo, desde a tenra infância, Daniel Mateus de Carvalho, que mesmo longe sempre se fez perto;

E à criança que eu fui que um dia sonhou em ser cientista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo seu incomensurável amor e misericórdia que permitiram que eu chegasse até aqui e, de alguma forma, contribuísse para o desenvolvimento da ciência e assim cumprisse com um dos meus propósitos de vida e por meio deste enaltecer ao Criador.

Agradeço aos meus pais, Ivanildo Matias Antunes e Elizabete Maria Antunes, que confiaram em mim e permitiram que eu “ganhasse o mundo” sozinho, aos 17 anos. De igual modo, sou grato aos meus irmãos, Thiago Matias Antunes e Nayara Matias da Silva, por sempre me apoiarem, mesmo sendo difíceis as escolhas e árduo o caminho. Além da minha família, agradeço aos meus grandes amigos, Daniel Mateus de Carvalho e Ronaldo Espinda, por terem me dado todo apoio para ingressar na Universidade, mesmo que a distância nos separasse fisicamente. Todos vocês foram primordiais para que eu iniciasse esse ciclo que hoje se encerra.

Agradeço ao meu grande e singular amigo Junior Gouveia e sua família, que me acolheram em sua casa, me dando não só um teto para morar, mas um coração e uma família onde habitar e pertencer por toda eternidade. Agradeço à minha grande amiga Sugerlayne Salles e sua família; Sugerlayne que possui não só força, mas também um grande coração e infinitas qualidades que faltam adjetivos para descrever. Amo vocês.

Agradeço à minha querida e admirável orientadora, professora Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas, por ter confiado e acreditado no meu potencial e força de vontade. Jamais me esquecerei da grande oportunidade que me foi concedida quando me recebeste como um de seus alunos de iniciação científica, e o privilégio que foi fazer parte do incrível “Time Mascarenhas”.

Agradeço à minha co-orientadora Fabíola da Cruz Nunes por todo apoio e sempre se colocar à disposição para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço aos ex-alunos de iniciação científica, hoje já graduados, que me precederam no laboratório e na pesquisa utilizando as células de Ehrlich: Amanda Salmeron, Gabriel Rodrigues, Beatriz Calado e Beatriz Fernandes. Vocês foram muito pacientes e atenciosos ao me ensinarem e me ajudaram a me aperfeiçoar através das correções. Além do conhecimento, também compartilhamos muitos momentos engraçados, filosóficos e musicais. Espero que se sintam orgulhosos de

seu pupilo e que eu tenha conseguido honrar o “Grupo Ehrlich”, assim como vocês o fizeram com maestria.

Agradeço copiosamente à doutoranda Deyse Cristina Madruga Carvalho e ao graduando Patrik Saul Zarpellon Barbosa. Vocês foram substanciais para a realização deste trabalho e meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal. Espero que possamos trabalhar juntos novamente.

Agradeço a todo “Time Mascarenhas” por terem me recebido de braços abertos, sempre pacientes e aptos para ensinar e ajudar. Meus sinceros agradecimentos Éssia Lima, Juliane França, José Marreiro, José Guilherme e Luiz Agra. Sinto-me honrado por ter trabalhado com vocês. Considero-os um sinônimo de trabalho em equipe, competência e solicitude.

Agradeço à professora Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente e à doutoranda Deyse Cristina Madruga Carvalho por aceitarem participar da minha banca examinadora, contribuindo para meu trabalho e crescimento.

Agradeço à professora Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco por permitir que armazenássemos as nossas células de Ehrlich no seu nitrogênio líquido, e à técnica de laboratório Dra. Ana Paula Gomes Moura, assim como toda equipe do Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR-UFPB), pela gentileza e prestatividade.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fomentar esta pesquisa e pela bolsa concedida.

Agradeço a todos e todas que participaram, diretamente ou indiretamente, desse trabalho e da minha formação como biotecnologista cujos nomes não constam nesse documento.

*“Quando eu parti, partiu-se em mim meu coração
Meus pés tremeram ao pisar em outro chão
Eu disse adeus e a Deus eu disse sem razão
Que a minha companhia era a solidão*

*Por sobre a estrada anoiteceu e amanheceu
E eu vi que os dias mais sombrios também são Teus
O homem que eu parti de casa se perdeu
E a caminhada fabricou um novo eu*

*O fogo me queimou, mas me aqueceu
A luz que me cegou, me fez ver Deus
Minh'alma se fartou sem água e pão
A mãe da esperança é a provação”*

Estêvão Queiroga

RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo, ocupando a segunda colocação no ranking de 2016. Devido a sua heterogeneidade e etiologia multifatorial, elucidar mecanismos envolvidos na carcinogênese é uma tarefa complexa que desafia muitos pesquisadores a buscarem respostas às incógnitas através da oncologia experimental. As células do tumor de Ehrlich são células neoplásicas oriundas de um adenocarcinoma mamário murino, altamente agressivas para o hospedeiro, sendo utilizadas na oncologia experimental para estudos *in vivo* e *in vitro*. Neste trabalho, foi avaliado *in vitro* o efeito de um hormônio endógeno circulante em mamíferos, a ouabaína, em células do tumor de Ehrlich. A ouabaína, uma substância endógena capaz de inibir a Na⁺/K⁺-ATPase, afeta diversos mecanismos fisiopatológicos, dentre eles, a resposta inflamatória. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a ouabaína modula a carcinogênese no modelo experimental de tumor de Ehrlich, *in vivo*, através da diminuição do crescimento tumoral. Dessa forma, para compreender o papel fisiológico dessa substância no processo de carcinogênese e responder lacunas pertinentes ao mecanismo de ação desse digitálico, foi avaliado o efeito da ouabaína *in vitro*. Foram estabelecidos oito grupos experimentais, testados com diferentes concentrações de ouabaína (1 nM, 10 nM, 100nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM e 1000 µM) ou apenas PBS (grupo controle) durante os tempos de 24 horas e 48 horas. Foi adotada como parâmetros avaliativos a viabilidade celular, analisada através do ensaio de redução de MTT e contagem de células na câmara de Neubauer através do método de exclusão por azul de trypan, além da determinação da concentração celular viável em todos os grupos testados. Os dados obtidos foram analisados utilizando ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey, sendo considerados significativos somente os valores de $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que a ouabaína não foi citotóxica para as células do tumor de Ehrlich em concentrações abaixo de 1000 µM. Foi observada uma redução significativa na viabilidade e na concentração celular unicamente no grupo de maior concentração (1000 µM), sendo a redução na viabilidade de 60% no tempo de 24 horas e 75% no tempo de 48 horas sugerindo uma resposta dose e tempo-dependente. Adicionalmente, foi evidenciado que a ouabaína não foi capaz de alterar níveis basais das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. Sendo assim, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, a citotoxicidade da ouabaína em células do tumor de Ehrlich, além de permitir que fossem indicadas possíveis respostas concernentes ao mecanismo de ação pelo qual a ouabaína retardou a progressão tumoral no modelo experimental *in vivo*. Esses achados ajudam a delimitar o papel fisiopatológico da ouabaína no modelo experimental de Ehrlich.

Palavras-chave: Ouabaína. Células de Ehrlich. Inflamação. Câncer. In vitro.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, cancer is one of the leading causes of death in the world, ranking second in the 2016 ranking. Due to its heterogeneity and multifactorial etiology, elucidating mechanisms involved in carcinogenesis is a complex task that challenges many researchers to seek answers to unknowns through experimental oncology. Ehrlich's tumor cells are neoplastic cells derived from a highly aggressive host murine mammary adenocarcinoma and are used in experimental oncology for in vivo and in vitro studies. In this work, the effect of a circulating endogenous hormone in mammals, ouabain, on Ehrlich tumor cells was evaluated in vitro. Ouabain, an endogenous substance capable of inhibiting Na⁺/K⁺-ATPase, affects several pathophysiological mechanisms, including the inflammatory response. Previous work by our group has shown that ouabain modulates carcinogenesis in the experimental Ehrlich tumor model in vivo by decreasing tumor growth. Thus, to understand the physiological role of this substance in the carcinogenesis process and answer relevant gaps to the mechanism of action of this digitalis, the effect of ouabain in vitro was evaluated. Eight experimental groups were established, tested with different ouabain concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM and 1000 μM) or only PBS (control group) during 24 hours and 48 hours. The cell viability was analyzed as an evaluative parameter, analyzed by the MTT reduction assay and cell count in the Neubauer chamber by the trypan blue exclusion method, in addition to the determination of the viable cell concentration in all groups tested. The data obtained were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey post-test, considering only $p < 0.05$ as significant. The results demonstrated that ouabain was not cytotoxic to Ehrlich tumor cells at concentrations below 1000 μM. Significant reduction in cell viability and concentration was observed only in the highest concentration group (1000 μM), with a 60% reduction in viability at 24 hours and 75% at 48 hours suggesting a dose and time-dependent response. Additionally, it was evidenced that ouabain was not able to alter basal levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 cytokines. Thus, this work demonstrated, for the first time, the cytotoxicity of ouabain in Ehrlich's tumor cells, and allowed to indicate possible responses concerning the mechanism of action by which ouabain slowed tumor progression in the in vivo experimental model. These findings help to delimit the pathophysiological role of ouabain in Ehrlich's experimental model.

Keywords: Ouabain. Ehrlich Cells. Inflammation. Cancer. In vitro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – As oito principais características do câncer.....	18
FIGURA 2 – Estrutura química da ouabaína.....	21
FIGURA 3 – Esquema da montagem das placas para execução dos ensaios propostos.....	29
FIGURA 4 – Esquema de preparo das soluções com ouabaína por diluição seriada	30
GRÁFICO 1 – Resultado do ensaio de MTT – 24 horas	34
GRÁFICO 2 – Resultado do ensaio de MTT – 48 horas	34
GRÁFICO 3 – Resultado do método de exclusão por azul de trypan – 24 horas	35
GRÁFICO 4 – Resultado do método de exclusão por azul de trypan – 48 horas	35
GRÁFICO 5 – Resultado indicando a concentração de células viáveis - 24 horas ...	36
GRÁFICO 6 – Resultado indicando a concentração de células viáveis - 48 horas ...	36
GRÁFICO 7 – Resultado do ensaio imunoenzimático: produção de TNF- α	37
GRÁFICO 8 – Resultado do ensaio imunoenzimático: produção de IL-1 β	38
FIGURA 5 – Proposta do possível mecanismo de ação da ouabaína em células do tumor de Ehrlich, na concentração de 1000 μ M, para os experimentos <i>in</i> <i>vitro</i>	44
FIGURA 6 – Proposta do possível efeito da ouabaína no modelo experimental de Ehrlich <i>in vivo</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de variância

ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico

ATCC: *American Type Culture Collection*

Ca²⁺-ATPase: Bomba Cálcio ATPase

COX: Cicloxigenase

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio imunoenzimático

HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

IL: Interleucina

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-13: Interleucina 13

IFN- γ : Interferon gamma

LPS: Lipopolissacarídeo

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MIF: Fator de inibição da migração de macrófago

MTT: {brometo de [3-(4,5 - dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]}

Na⁺/K⁺ ATPase: bomba sódio-potássio ATPase

NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B

OUA: Ouabaína

PBS: Tampão fosfato-salina

PBST: Tampão fosfato-salina + Tween

RCF: Força centrífuga relativa

rpm = Rotações por minuto

SFB: Soro fetal bovino

STAT3: *Signal transducers and activators of transcription*

TGF- β : Fator de crescimento tumoral β

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF: Fator de necrose tumoral

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-1: Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2: Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	Aspectos gerais do câncer	17
2.2	Câncer e inflamação	19
2.3	Ouabaína	20
2.4	Células do tumor de Ehrlich	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	Meio de cultivo	27
4.2	Células do tumor de Ehrlich	27
4.3	Delineamento Experimental	28
4.4	Ensaio de viabilidade celular por redução de sais de MTT	30
4.5	Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de trypan	31
4.6	Análise indireta da produção de óxido nítrico (NO).....	31
4.7	Ensaio imunoenzimático para mensuração de citocinas.....	32
4.8	Análise estatística	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Ensaio de viabilidade celular por redução de sais de MTT	34
5.2	Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de trypan	35
5.3	Concentração celular pelo método de exclusão por azul de trypan	36
5.4	Análise indireta da produção de óxido nítrico (NO) e ensaio imunoenzimático para mensuração de citocinas	37
5.4.1	Produção de óxido nítrico (NO).....	37
5.4.2	TNF- α	37
5.4.3	IL-1 β	38
5.4.4	IL-6.....	38
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS	46
9	GLOSSÁRIO	56

1 INTRODUÇÃO

Câncer é a designação utilizada para se referir a um grupo de mais de 100 doenças que possuem como principal característica a proliferação descontrolada de células anormais, causando a formação de tumores. Essas células podem invadir outros tecidos e órgãos causando um processo denominado metástase, que é a principal causa de morte por câncer (INCA, 2019a).

O câncer é uma doença multifatorial. Fatores ambientais e internos como: condições genéticas, imunológicas e hormonais, as quais interagem para desencadear o processo de carcinogênese, que é a formação de câncer. De forma geral, cerca de 90% dos casos de câncer estão relacionados a fatores ambientais que compreendem maus hábitos alimentares, poluição, estilo de vida, como tabagismo e alcoolismo, consumo constante e/ou indiscriminado de medicamentos, radiação, organismos infecciosos, dentre outros. Paralelamente, apenas 10% dos casos estão relacionados unicamente aos fatores internos, que refletem falhas ou ineficiência do organismo em se defender das agressões externas (INCA, 2018b).

Segundo a World Health Organization (WHO, 2018), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que, a cada seis mortes no globo terrestre, uma esteja relacionada a essa doença. De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2018), em 2018 a prevalência mundial de câncer chegou a 18,1 milhões e estima-se que este número cresça até 2040 atingindo a marca de 29,5 milhões. No Brasil, a estimativa para 2018 apontava o registro de 582.590 novos casos da doença, sendo 300.140 homens e 282.450 mulheres (INCA, 2018a).

Acredita-se que o aumento da incidência global de câncer seja um reflexo do estilo de vida da sociedade contemporânea que se expõe com maior frequência aos agentes cancerígenos, ou seja, agentes que podem causar câncer. Tabagismo, alcoolismo, dieta, obesidade e infecções persistentes estão entre os principais fatores carcinogênicos (ANAND et al., 2008).

Devido à alta prevalência de câncer no mundo e o impacto negativo, social e econômico, causadas aos pacientes e cofres públicos, diversas pesquisas científicas direcionadas à elucidação de mecanismos envolvidos na carcinogênese, compreensão dos agentes carcinogênicos, e prospecção de drogas antineoplásicas

vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de sanar ou atenuar a doença. Nesse contexto, as células do tumor ascítico de Ehrlich (CTAE), oriundas de um adenocarcinoma mamário murino, são utilizadas mundialmente para estudos oncológicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (GUERRA, 1983).

Os estudos *in vitro*, permitem avaliar a citotoxicidade de determinada substância e investigar o seu mecanismo de ação, sendo, portanto, essencial para a prospecção de novas drogas e o entendimento dos mecanismos celulares (PALERMO-NETO, 2003). Em relação aos estudos *in vivo*, são necessários para a investigação dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos que comprovem a atividade observada *in vitro*, pois algumas substâncias podem ser metabolizadas e conseqüentemente, podem perder sua atividade ou apresentar problemas de biodisponibilidade no modelo *in vivo* (SMITH et al., 2005).

Sendo assim, as pesquisas da oncologia experimental envolvendo candidatos a novas drogas ou investigações de mecanismos de ação, necessitam de resultados *in vivo* e *in vitro*. Esses candidatos podem ser de origem sintética ou natural, sendo que os produtos de origem natural possuem grande potencial e já representam cerca de 50% dos fármacos aprovados para o tratamento de câncer, como o Taxol, um dos fármacos mais vendidos no mundo para tratamento de câncer (MANN, 2002).

Entre os produtos naturais, a ouabaína (OUA), hormônio endógeno presente em mamíferos, capaz de inibir a Na^+/K^+ ATPase e com atividade cardiotônica e imunomoduladora em diferentes modelos de inflamação (BLAUSTEIN, 1993; HAMLIN et al., 1991), possui potencial antineoplásico. Foi demonstrado em modelos experimentais *in vitro*, utilizando linhagens de células tumorais humanas, que a OUA foi capaz de induzi-las à apoptose e suprimir o seu comportamento migratório (CHANVORACHOTE; PONGRAKHANANON, 2012; HUANG et al., 2004; PONGRAKHANANON et al., 2013).

Em estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo utilizando a OUA no modelo experimental de Ehrlich *in vivo*, na sua forma ascítica e sólida, foi observada a redução da progressão do tumor em camundongos Swiss, quando comparado com o grupo controle, não tratado com OUA (CALADO, 2019; SALMERON, 2018). Apesar dessa observação, ainda eram desconhecidos os mecanismos por qual a OUA reduzia a progressão tumoral em células de Ehrlich, sendo necessário um estudo para investigar e avaliar, *in vitro*, o potencial citotóxico da OUA afim de

elucidar se o fenômeno observado *in vivo* estava associado à ação anti-inflamatória da OUA, que inibe eventos atrelados à carcinogênese, ou à citotoxicidade direta sobre as células tumorais de Ehrlich.

Portanto, este trabalho se justifica pela necessidade de esclarecer ou propor o papel da OUA no microambiente tumoral no modelo experimental de Ehrlich, corroborando os dados obtidos nos estudos anteriores e, oferecendo novas perspectivas sobre a atuação desse hormônio em pacientes oncológicos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é um conjunto de doenças que possuem como principal característica a propagação contínua e desordenada de diversas linhagens celular que possuem a capacidade de invadir e colonizar outros tecidos, formando tumores secundários ou metástases. De acordo com a linhagem celular o câncer pode ser classificado como: carcinoma, caso o câncer tenha início em células do tecido epitelial como pele e mucosas; adenocarcinoma, quando o epitélio de origem é glandular; linfoma, quando o tumor é originário de células da linhagem linfoide, geralmente formando agregados sólidos nos linfonodos; leucemia, quando o câncer é proveniente de células que constituem o sangue; ou sarcoma, caso a origem da doença seja células do tecido conjuntivo como cartilagem, osso e músculo. (INCA, 2019b; LIMA et al. 2016; SAITO et al., 2015).

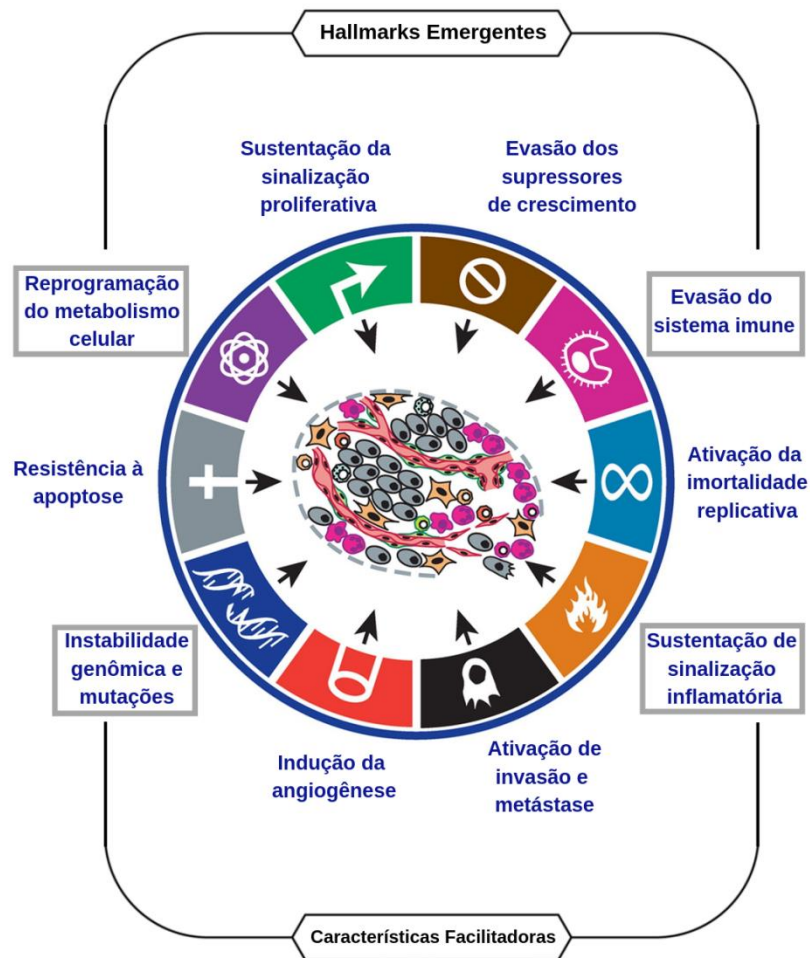
O câncer é uma doença multifatorial, sendo desencadeado principalmente pela exposição à agentes cancerígenos capazes de provocar alterações epigenéticas e/ou mutações que se acumulam no genoma das células afetadas, consequentemente transformando células normais em células cancerosas e desenfreado o ciclo celular (BAYLIN; JONES, 2011; EVANGELISTA, 2018; HUBBI; SEMENZA, 2015).

Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram os seis *hallmarks of cancer* (marcas registradas do câncer, em tradução livre), que compreendem seis características biológicas do câncer que permitem o seu crescimento e disseminação metastática, sendo a principal característica a sustentação da sinalização proliferativa.

Em 2011, os autores Hanahan e Weinberg propuseram uma revisão do próprio trabalho publicado em 2000, adicionando mais quatro características aos *hallmarks of cancer*, sendo duas delas rotuladas como marcas emergentes, pois ainda não foram totalmente validadas nos diferentes tipos de câncer, sendo essas duas marcas: a reprogramação do metabolismo celular, para beneficiar a proliferação celular; e a evasão do sistema imune, particularmente linfócitos T e B, células *natural killer* e macrófagos. E as duas marcas remanescentes foram rotuladas como características facilitadoras cuja função é facilitar o surgimento do

câncer e a progressão tumoral, sendo essas duas marcas: a instabilidade genômica, que promove a progressão do tumor; e a sustentação de sinais inflamatórios por células imunes inatas que inadvertidamente promovem o surgimento e progressão de tumores (Figura 1).

Figura 1. As oito principais características do câncer



As oito principais características do câncer propostas por Hanahan e Weinberg, entre elas a sustentação de sinalização inflamatória como uma característica facilitadora para o surgimento e manutenção do câncer.

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

O processo de carcinogênese é lento e gradual. Esse processo compreende três estágios: a iniciação, a promoção e a progressão (HYNDMAN et al. 2016).

O estágio de iniciação é caracterizado pela mutação de genes que sofrem alterações por agentes cancerígenos endógenos ou exógenos. Essas mutações podem levar a ativação de proto-oncogenes, que são genes que promovem a formação de tumores como HER-2/neu, ou a inativação de genes supressores de

tumor como TP53 (AMIRIFARD et al., 2016; AUBREY et al., 2016; HYNDMAN et al. 2016).

O segundo estágio, promoção, é caracterizado pela exposição contínua à agentes cancerígenos promotores, também chamados de oncopromotores. Nesse estágio, as células iniciadas em contato com os agentes oncopromotores acumularão mutações e serão lentamente transformadas em células malignas. A suspensão do contato da célula iniciada com os oncopromotores pode interromper o processo de carcinogênese. Geralmente, nesse estágio há a atuação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e de citocinas pró-inflamatórias que estimulam a proliferação de células iniciadas, influenciando no processo de carcinogênese (INCA, 2019b; HYNDMAN et al. 2016).

O último estágio, progressão, é caracterizado pela proliferação desregulada das células cancerosas, podendo ocorrer metástases. Esse estágio é irreversível, pois o câncer já está instalado. Os primeiros sinais clínicos surgirão nessa etapa (GREENSTEIN, 2016).

2.2 Câncer e inflamação

Atualmente, é mundialmente aceito que há uma estreita relação entre inflamação e o processo de carcinogênese. Alguns tipos de câncer como cólon, estômago, bexiga e fígado podem ser resultantes de inflamações crônicas que criam um microambiente inflamado propício a causar danos no material genético das células expostas às citocinas produzidas pelas células inflamatórias. Um exemplo dessas citocinas é o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) que suprime a transcrição da proteína p53, responsável pelo desencadeamento da morte celular por apoptose, podendo prolongar o tempo de vida e a proliferação das células expostas ao sítio inflamado que por sua vez diminui a eficiência da atividade da maquinaria de reparação de danos ao DNA, contribuindo para o acúmulo de mutações e conseqüentemente a iniciação do processo de carcinogênese (COUSSENS; WERB, 2002).

A proliferação celular, isoladamente, é insuficiente para causar o câncer. No entanto, a proliferação acentuada por longos períodos em sítios inflamados e com acúmulo de células inflamatórias, fatores de crescimento, citocinas, espécies reativas de oxigênio e outros produtos metabólicos capazes de danificar o material

genético são determinantes para aumentar os riscos ou desencadear um câncer (STUELTEN et al., 2008).

Além de estimular a produção e liberação de diversos agentes estimuladores da proliferação celular e inibidores da apoptose, as células inflamatórias, através da liberação de citocinas e fatores de crescimento como TGF- β , induzem células tumorais a produzirem VEGF, que atuam nos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 de células endoteliais, estimulando o processo de formação de novos vasos sanguíneos, denominado angiogênese. A angiogênese é essencial para a sobrevivência e multiplicação de células mutadas, além de aumentar a probabilidade de metástase (DVORAK, 2002; THUN et al., 2004).

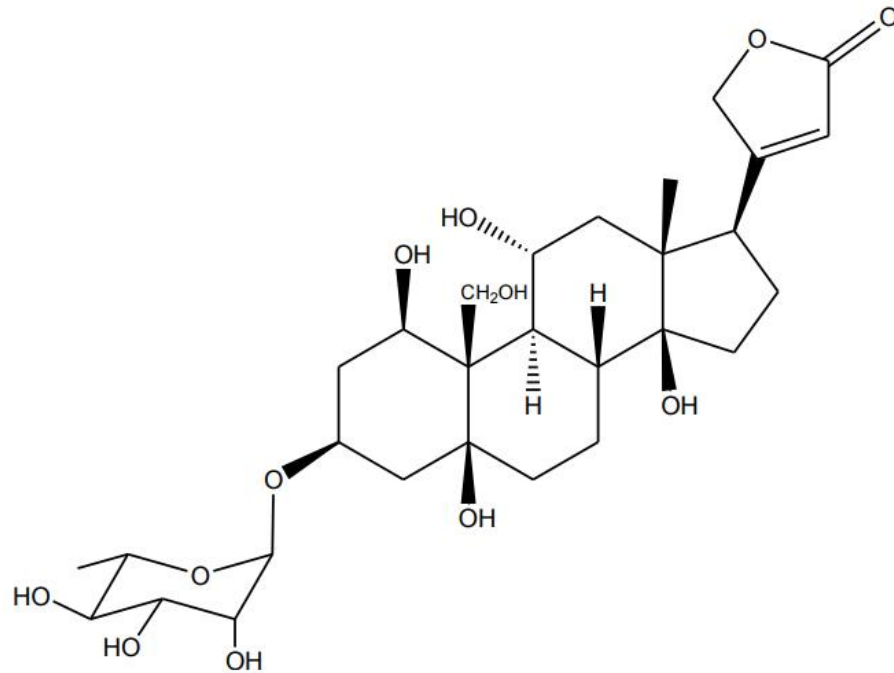
Ainda sobre a relação câncer-inflamação, a literatura científica relata diversos trabalhos em que foi demonstrado experimentalmente que o uso de moléculas anti-inflamatórias capazes de inibir a ciclooxigenase (COX) e fatores de transcrição envolvidos na inflamação como NF- κ B e STAT3, estão associados com a prevenção e redução do risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer, ressaltando mais uma vez a importância da inflamação para o desenvolvimento de câncer (GIOVANNUCCI, 1999; GREENBERG et al., 1993; GREENHOUGH, 2009; KUDO et al., 1980; KUNE et al., 1988; SUH et al., 1993; THUN et al., 1991).

2.3 Ouabaína

Inicialmente encontrada apenas em espécies vegetais da família *Apocynaceae* e posteriormente descrita como um hormônio endógeno circulante em mamíferos, a ouabaína (OUA) é um glicosídeo cardiotônico cuja atividade fisiológica ainda é pouco conhecida. Apesar disso, a literatura científica dispõe de diversos trabalhos os quais relatam a capacidade da OUA em inibir a Na⁺/K⁺-ATPase, conferindo sua atividade cardiotônica, e também atividade imunomoduladora em vários modelos experimentais de inflamação (BLAUSTEIN, 1993; CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; DE VASCONCELOS et al., 2012; HAMLIN et al., 1991; LEITE, 2015; LINGREL, 2010; RODRIGUES-MASCARENHAS, 2009).

A OUA é um composto hidrofílico cuja estrutura é composta pela união do esteroide ouabagenina e do açúcar ramnose através de uma ligação glicosídica (Figura 2).

Figura 2. Estrutura química da ouabaína



Fonte: Adaptado de LEITE, 2012.

Esse digitálico (nome atribuído aos glicosídeos cardíacos) é produzido em mamíferos pela hipófise, hipotálamo e, principalmente, pela adrenal, sendo possível sua detecção e quantificação em tecidos e plasma sanguíneo humano a partir de 50 pM até 80 nM (DORIS; STOCCO, 1989; FERRANDI, 1997; HAMLYN et al. 1991; TYMIAK et al., 1993; YAMADA et al. 1992).

A síntese e liberação desse hormônio são moduladas de acordo com o estado fisiológico do indivíduo como: níveis séricos de angiotensina II, sódio, corticotrofina (ACTH) e sinalização adrenérgica. A liberação de OUA também pode ser induzida através de estresse provocado por exercício físico (LAREDO et al, 1997; BAUER et al., 2005a; BAUER et al., 2005b; WARDENER, 1961; HAMLYN et al., 2003). A metabolização de outros hormônios esteroides também é capaz de modular a biossíntese e liberação de OUA, haja vista que a ouabagenina, substrato para produção de OUA, é um esteroide proveniente de um intermediário da via de produção de pregnenolona (LICHTSTEIN et al., 1998).

Os digitálicos, de forma geral, são os únicos inibidores específicos da proteína Na^+/K^+ ATPase em baixas concentrações (10^{-8} a 10^{-9} M) (GOTO et al., 1992). Nesse contexto, a OUA atua se ligando à subunidade α da Na^+/K^+ -ATPase, exposta no domínio extracelular, responsável pela atividade catalítica dessa

proteína; conseqüentemente, essa ligação provoca o aumento da concentração intracelular de Na^+ , resultando na diminuição da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; a resultante dessa cascata é o acúmulo de íons Ca^{2+} no citoplasma da célula que pode ser captado pela Ca^{2+} -ATPase, estocando-o no retículo sarcoplasmático, ou redirecionado para outras vias de sinalização intracelular (BLAUSTEIN et al., 1998; WENCESLAU, 2007).

Atualmente é conhecido que, em baixas concentrações, a OUA não inibe totalmente a Na^+/K^+ -ATPase, enquanto que, em altas concentrações, a inibição total da Na^+/K^+ -ATPase reduz a concentração intracelular de K^+ , conseqüentemente induzindo a célula à apoptose por ativação de caspases (ANNER et al., 1994; BORTNER et al., 1997; ESTEVES et al., 2005; ORLOV et al., 1999).

Apesar da OUA não ser capaz de inibir totalmente a Na^+/K^+ -ATPase em baixas concentrações, estudos demonstram que mesmo em tais concentrações esse hormônio é capaz de promover mudanças conformacionais nessa proteína, interferindo em processos vitais para a célula como motilidade, crescimento e proliferação (AIZMAN et al., 2001; FONTANA et al., 2013).

Devido a capacidade de modular a Na^+/K^+ -ATPase, a OUA também possui atividade imunomoduladora, atuando em diversos mecanismos do sistema imunológico (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003). A literatura relata que a OUA é capaz de inibir a proliferação de timócitos e linfócitos, mesmo quando estimulados por mitógenos como a interleucina-2 (IL-2), éster de forbol e a concanavalina-A (MORAES et al., 1989; OLEJ et al., 1994; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009; STOECK et al., 1983). Além disso, em timócitos de camundongos a OUA demonstrou ser capaz de induzir o influxo de cálcio do meio extracelular, e conseqüentemente aumentar a expressão da proteína CD69, primordial para o processo de maturação dessas células (ECHEVARRIA-LIMA et al., 2003; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003).

Além dos exemplos supracitados, estudos conduzidos por nosso grupo utilizando esse digitálico evidenciam a sua atividade anti-inflamatória em diversos modelos experimentais de inflamação: no modelo de edema de pata em camundongos, induzido por carragenina, zimosan e composto 48/40, a OUA atenuou os efeitos da fase aguda da inflamação, além de reduzir a efusão de exsudato para a cavidade peritoneal do animal (DE VASCONCELOS et al., 2011); no modelo de inflamação pulmonar alérgica, foi possível observar a inibição do recrutamento de

linfócitos CD3⁺, além de redução da infiltração de eosinófilos nos pulmões. Adicionalmente, a OUA modulou os níveis de IL-4, IL-13 e IFN- γ (GALVÃO et al., 2017); em modelo experimental de inflamação induzida por *Leishmania amazonenses*, a OUA foi capaz de reduzir o nível de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , além de minorar a migração de neutrófilos para o sítio inflamado (JACOB et al., 2013); semelhantemente, em modelo experimental de inflamação aguda, induzida por zimosan, a OUA mitigou a migração de neutrófilos através da inibição do fator de transcrição NF- κ B, e dos níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α (LEITE et al., 2015). Recentemente, demonstramos que a OUA é capaz de reduzir a expressão da molécula de adesão CD18, presente em neutrófilos, e associada ao processo inflamatório (CAVALCANTE-SILVA et al., 2019). Vale ainda ressaltar que outros digitálicos, como a marinobufagenina, podem modular negativamente o processo inflamatório, como demonstrado por Carvalho e colaboradores (2019).

Além desses trabalhos, diversas publicações científicas relacionam o potencial anti-inflamatório da OUA com a capacidade de regular negativamente o desenvolvimento de cânceres através da inibição da migração de células cancerosas (LIU et al., 2013; PONGRAKHANANON et al., 2013), haja vista que a inflamação é um dos fatores que influenciam positivamente para o desenvolvimento tumoral (WALLACE, 2002; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Ademais, estudos demonstram que a OUA é capaz de interferir em diversas vias de sinalização em células cancerosas de pulmão e mama, induzindo-as ou sensibilizando-as a apoptose (BIELAWSKI et al., 2006; CHANVORACHOTE; PONGRAKHANANON, 2012; HUANG et al., 2004; TRENTI et al., 2014; WINNICKA et al., 2007; WINNICKA et al., 2008).

Estudos *in vivo* realizados por nosso grupo, utilizando OUA no modelo experimental de tumor ascítico e sólido Ehrlich, demonstraram que a OUA foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos e macrófagos para o sítio inflamado, local onde foram implantadas as células tumorais, além de aumentar a migração de linfócitos. Adicionalmente, a OUA reduziu o crescimento do tumor (SALMERON, 2018; CALADO, 2019). Esses resultados nos instigaram a investigar se os fenômenos observados ocorriam devido à ação anti-inflamatória da OUA ou devido a uma suposta atividade antineoplásica, e assim elucidar o papel da OUA nessa condição fisiopatológica.

2.4 Células do tumor de Ehrlich

As células do tumor de Ehrlich são células neoplásicas oriundas de um tumor mamário murino que surge de forma espontânea. Essas células foram descritas pela primeira vez em 1896 por Paul Ehrlich que as batizou com o seu nome (EHRlich, 1906). Décadas seguintes, um estudo publicado pelos pesquisadores Loewenthal e Jahn, em 1932, relatava que essas células, quando implantadas na cavidade peritoneal de camundongos, eram capazes de crescerem no fluido ascítico (LOEWENTHAL; JAHN, 1932).

Essa observação foi crucial para a consolidação do tumor de Ehrlich como um modelo experimental a ser amplamente utilizado na oncologia experimental, que nada mais é do que um ramo da oncologia que busca elucidar questões acerca do processo de carcinogênese, diagnóstico e terapias em modelos experimentais animais utilizando células de tumores espontâneos, assim como as células do tumor de Ehrlich (BABA; CÂTOI, 2007).

As células do tumor de Ehrlich se caracterizam por serem, em sua maioria, pleomórficas. Seu diâmetro é até três vezes superiores ao das hemácias. Essas células possuem pouco citoplasma e núcleo denso, de forma arredondada ou ovoide, com um ou mais nucléolos, de diferentes tamanhos (DAGLI, 1989; GUERRA, 1983). Essas células são facilmente transplantáveis, se multiplicam rapidamente, possuem alta capacidade metastática, e não regridem espontaneamente, caracterizando-as como células altamente agressivas ao hospedeiro, sendo essas características desejáveis sob o ponto de vista experimental (FRAJACOMO et al., 2016; RIZZO, 2000; SIGIURA, 1965; SILVA et al., 2017; THAPLIYAL et al., 2019). Chen e Watkins (1970) descreveram que células de Ehrlich são desprovidas de antígenos H-2; esse antígeno é o nome atribuído ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de camundongos, explicando o motivo pelo qual essas células são capazes de serem transplantadas e crescerem em várias linhagens de camundongos gerando poucas reações de imunogenicidade.

O uso das células de Ehrlich para o estudo dos mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese e prospecção de novas drogas permite avaliar importantes aspectos a níveis moleculares, bioquímicos, imunológicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Esses estudos podem ser conduzidos *in vitro* e posteriormente validados *in vivo* nas formas sólida ou ascítica (AGRAWAL et al.,

2001; SAAD et al., 2017, SYMCHYCH et al., 2017).

De modo geral, células cancerosas, assim como as de Ehrlich, transformam o microambiente onde estão situadas de modo a suprir o seu metabolismo acelerado, evadir-se do sistema imune, e sustentar os sinais proliferativos característicos de câncer (LI et al., 2007; KATO et al., 2013). Nesse contexto, o sistema imunológico, apesar da teoria da vigilância imunológica que postula que é papel do sistema imune monitorar, reconhecer e destruir células transformadas (BURNET, 1957), desempenha um importante papel, inadvertidamente, no desenvolvimento do câncer devido ao fato que células inflamatórias, principalmente macrófagos, produzem e secretam substâncias que favorecem a angiogênese, como VEGF e proteases; além disso, células inflamatórias liberam diversas citocinas que favorecem a proliferação celular e inibição da apoptose, tornando o microambiente tumoral favorável para a sobrevivência e multiplicação das células mutadas (DVORAK, 2002; EMI; TANABE, 2007; KIM; POLVERINI, 1977; THUN et al., 2004). Dessa forma, o microambiente tumoral mantém as células tumorais, e os processos inflamatórios cooperam para a progressão do processo de carcinogênese através da produção de fatores de crescimento, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, remodelamento tecidual e angiogênese (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Devido às características biológicas, facilidade de manuseio que possibilita padronização experimental, e baixo custo de se trabalhar com as células do tumor de Ehrlich (CHEN; WATKINS, 1970; OZASLAN et al., 2011), elas são amplamente utilizadas na oncologia experimental e foram optadas para investigar o papel da OUA na fisiopatologia do câncer, sendo este trabalho voltado para o estudo *in vitro* do potencial citotóxico da OUA para elucidar como digitalico modula negativamente o desenvolvimento do câncer no modelo experimental de Ehrlich.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, o potencial citotóxico e a modulação da produção de citocinas pela ouabaína nas células do tumor de Ehrlich.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o protocolo de cultura de células de tumor de Ehrlich no laboratório de Imunobiologia (UFPB).
- Avaliar o potencial citotóxico da ouabaína em células de Ehrlich através do ensaio de redução do sal MTT;
- Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de trypan;
- Avaliação da produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelas células do tumor de Ehrlich expostas à ouabaína;
- Avaliação da produção de óxido nítrico pelas células do tumor de Ehrlich expostas à ouabaína

4 METODOLOGIA

4.1 Meio de Cultivo

Foi utilizado o meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM) (Sigma® - código do produto D1152), já suplementado com 4,5 g de glicose, tampão HEPES, L-glutamina e vermelho de fenol. O meio de cultivo foi preparado utilizando 17,3 g de meio dissolvido em 1 litro de água mili-Q autoclavada, conforme a recomendação do fabricante. Foi acrescentado ao meio 2,0 g/L de bicarbonato de sódio e 1 mM/L de piruvato de sódio (0,11 g/L). O meio foi preparado, seu pH ajustado para 7,4 e por fim filtrado em membrana branca, lisa, 0,22 µm de diâmetro e estéril (Merck Millipore®). Ao final da filtração, foi acrescentado ao meio filtrado 1% de antibiótico Penicilina-Streptomicina (10.000 U/ml de penicilina + 10.000 µg/ml de streptomicina) (Gibco™).

O meio de cultivo pronto foi armazenado a 4°C. Para uso, o meio de cultivo foi reaquecido em banho-maria a temperatura de 37° C.

Também foi utilizado soro fetal bovino (SFB) como complemento para o meio de cultivo. Este, por sua vez, só foi adicionado ao meio de cultivo no momento de uso, devido à possibilidade de degradação de nutrientes, caso o SFB não fosse mantido congelado em longo prazo. O SFB foi armazenado a -15°C. Para uso, o SFB foi reaquecido em banho-maria a temperatura de 37° C.

4.2 Células do tumor de Ehrlich

Foram utilizados criotubos contendo células do tumor de Ehrlich diluídas em 1 mL de SBF + 10% de DMSO, criopreservadas em nitrogênio líquido à -196°C, oriundas da cavidade peritoneal de camundongos não isogênicos da linhagem *Swiss*. A data de criopreservação das células foi 29/04/2019.

Depois de removido do nitrogênio líquido, o criotubo foi imediatamente colocado em banho-maria a 42° C por 10 minutos, para que as células fossem reaquecidas o mais rápido possível, para evitar a formação de cristais de gelo no interior das células e conseqüentemente matando-as (RALL; FAHY, 1985).

Após o reaquecimento, a concentração e viabilidade celular foram

determinadas através da contagem na câmara de Neubauer, utilizando o método de exclusão por azul de trypan, para que fossem semeadas em um frasco plástico de cultura de 75 cm² de área de superfície, previamente preenchido com 14 mL do meio de cultura DMEM + 10% de SFB. Foi adotado, com bases em vários testes preliminares realizados por nosso grupo, que a concentração celular mínima requerida para a semeadura fosse 5×10^5 células, e a viabilidade mínima requerida de 60%. As células utilizadas neste trabalho atingiram 96,07% de viabilidade e a concentração de células viáveis foi de $2,45 \times 10^7$. Todo o conteúdo do criotubo foi semeado no frasco de cultura.

Antes que fossem iniciados os experimentos, as células foram mantidas em cultura por 7 dias, sendo realizados subcultivos a cada 2 dias, na proporção 1:3, conforme as recomendações do site da *American Type Culture Collection* (ATCC) para uma linhagem de Ehrlich semelhante à utilizada neste trabalho. Os subcultivos foram realizados transferindo todo conteúdo do frasco de cultura para um tubo falcon de 15 ml. Em seguida, foi realizada a centrifugação em uma centrífuga Hermle Z 326 K, a 1200 rpm a 37° C, por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura DMEM + 10% SFB. Em seguida, 1/3 dessa suspensão contendo as células de Ehrlich foi semeada em um novo frasco de cultura, previamente preenchido com 14 mL do meio de cultura DMEM + 10% SFB.

4.3 Delineamento Experimental

Após os 7 dias iniciais de manutenção e estabilização das células, o frasco contendo meio cultivo e células foi centrifugado a 1200 rpm a 37° C, por 4 minutos (centrífuga Hermle Z 326 K); em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 ml de meio de cultivo DMEM + 10% SFB. Uma alíquota foi retirada para que fossem avaliadas a concentração e viabilidade celular das células de Ehrlich, para que fossem iniciados os experimentos em placas de 96 poços.

Foram plaqueadas somente células cuja viabilidade fosse superior a 90%. A concentração celular foi então ajustada para 5×10^4 células/poço. Cada poço recebeu um total de 180 µl de células + 20 µl de uma solução contendo OUA dissolvida em meio de cultivo + 10% SFB, preparadas por diluição seriada, de acordo com as concentrações testadas (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM). Para o grupo controle, foi utilizado 180 µl de células + 20 µl de solução fosfato-salina

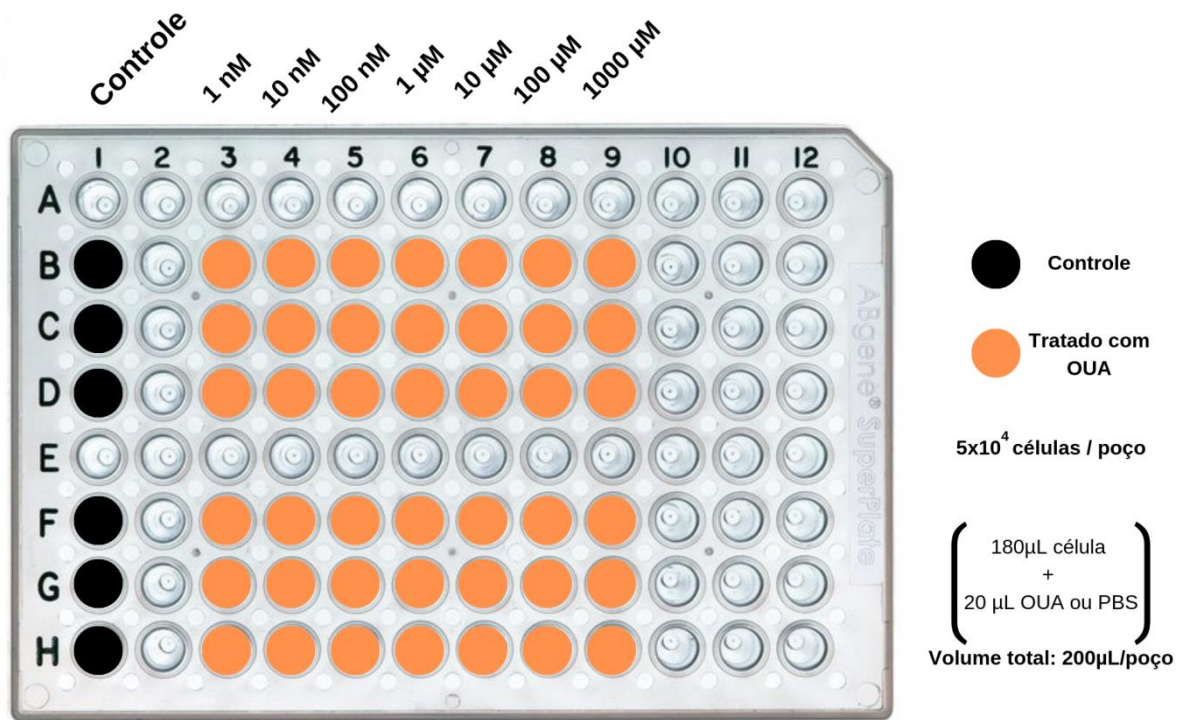
tamponada (PBS). A figura 3 ilustra os grupos dispostos na placa de 96 poços.

No total, foram preparadas quatro placas de 96 poços. Duas placas para efetuar as análises no tempo de 24 horas e duas placas para o tempo de 48 horas. Foram realizados ensaios de viabilidade celular por redução de sais de MTT, avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de trypan, análise indireta da produção de NO, e análise da produção de citocinas pelo teste de ELISA. As placas foram incubadas em estufa úmida, a 37° C e CO₂ a 5%, protegidas da luz.

Todos os testes foram realizados em triplicata.

A única observação é que para o teste de citocinas foram utilizados somente os três grupos de maior concentração (10, 100 e 1000 µM) e o grupo controle. Além disso, esse teste foi realizado somente no tempo de 24 horas.

Figura 3. Esquema de montagem das placas para execução dos ensaios propostos



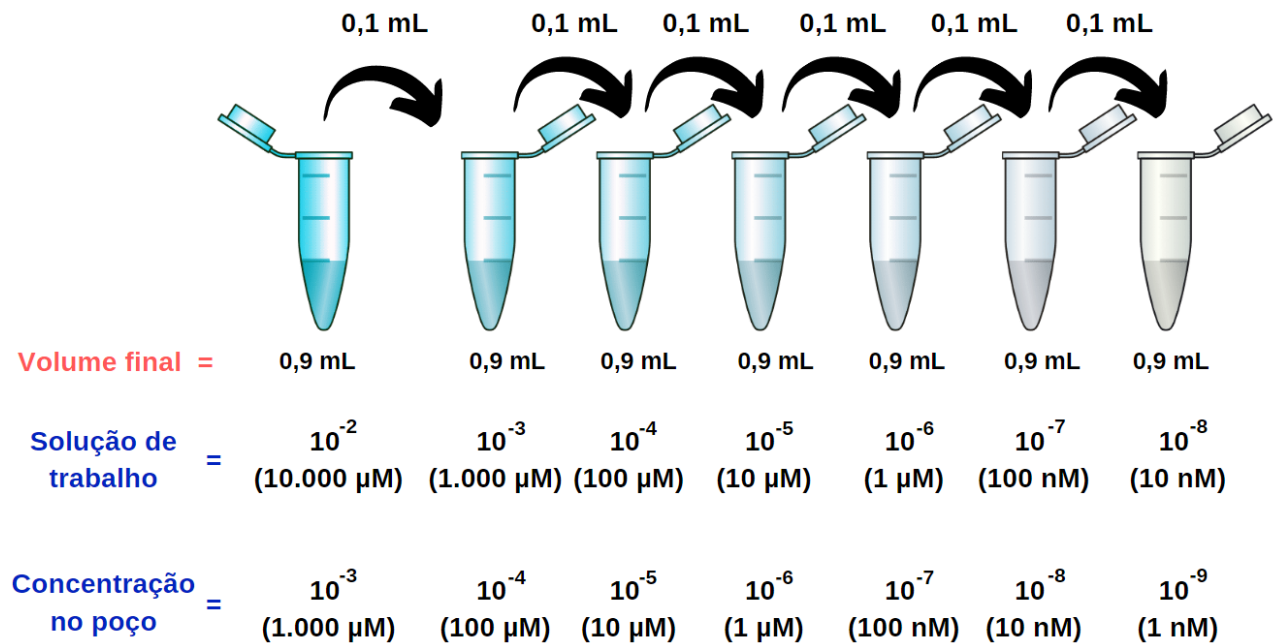
Representação esquemática de como foram distribuídos os grupos experimentais nas placas de 96 poços para a execução dos ensaios de viabilidade celular, ensaio imunoenzimático e reação de Griess.

Fonte: Autoral.

As soluções, contendo OUA em diferentes concentrações, foram preparadas através de diluição seriada, partindo de uma solução-mãe contendo 0,0073 g de OUA diluída em 1 mL de PBS (concentração de 10.000 µM). Dessa forma, foram

preparadas sete soluções de trabalho, cuja concentração deve ser 10 vezes superior à concentração no poço, haja vista que a concentração da solução de trabalho, quando for plaqueada, sofrerá uma diluição de 10 vezes dentro do poço, devido à proporção 1:10 entre meio de cultivo (180 μ L) e a solução com OUA (20 μ L) (Figura 4).

Figura 4. Esquema de preparo das soluções com ouabaína por diluição seriada



Representação esquemática de como foram preparadas as soluções contendo ouabaína nas diferentes concentrações utilizadas para a execução dos ensaios de viabilidade celular, ensaio imunoenzimático e reação de Griess.

Fonte: Autoral.

4.4 Ensaio de viabilidade celular por redução de sais de MTT

O MTT é um sal de tetrazólio amarelo e solúvel em água, que é metabolizado em cristais de formazan, insolúveis em água, por desidrogenases mitocondriais de células viáveis. Os cristais de formazan são compostos cromogênicos que manifestam uma coloração violácea, permitindo quantificar a intensidade da cor violeta e inferir a viabilidade celular de uma amostra (MOSMANN, 1983).

Para execução do ensaio, foi preparada uma solução em PBS utilizando 0,5 g/mL do reagente MTT. Essa solução foi protegida da luz para evitar degradação do MTT. Em seguida, a placa de 96 poços foi centrifugada a 300 RCF, a 4° C por 6

minutos (centrífuga Hermle Z 326 K). O sobrenadante foi descartado e nos poços foi adicionado 100 µL de meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de SFB + 10% do reagente MTT previamente preparado em PBS. Em seguida a placa foi incubada por 4 horas em estufa úmida a 37° C e CO₂ a 5%, protegida da luz.

Após o tempo de incubação, os cristais de formazan haviam sido produzidos. Foi adicionado aos poços 100 µl de uma solução de SDS 10% para solubilizar os cristais. A placa foi deixada sob agitação, e protegida da luz, *overnight*. No dia seguinte, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Foram obtidos os valores de absorbância de cada amostra.

4.5 Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de trypan

Foi retirada uma alíquota de 50 µL de cada poço para realização da contagem de células na câmara de Neubauer e posteriormente calcular a viabilidade celular. A alíquota foi homogeneizada em 50 µL do corante azul de trypan 0,4% (Gibco™) e posteriormente efetuada a contagem na câmara de Neubauer utilizando um microscópio óptico com aumento de 200 vezes (ocular 10 vezes de aumento e objetiva 20 vezes). Foi obtida a concentração de células viáveis e a viabilidade celular de cada amostra em porcentagem.

4.6 Análise indireta da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO pelas células de Ehrlich foi quantificada através de uma análise indireta conhecida como Reação de Griess (GREEN et al., 1982). Nesse método, é dosada a quantidade do produto de degradação do NO, o nitrito, um composto cromogênico. Foi realizada a análise indireta da produção de NO, pois a produção e meia-vida dessa molécula em amostras biológicas é diminuta, tornando difícil a sua mensuração de forma direta. Portanto, diversas tecnologias, tanto de forma direta como indireta, são utilizadas na literatura para avaliar a produção de NO pelas células (ARCHERS, 1993).

O Reagente de Griess é uma solução composta por 0,1% de naftiletilenodiamino e 1% sulfonamina p-aminobenzeno em ácido orto-fosfórico 5%.

As amostras para análise indireta da produção de NO foram obtidas a partir

da centrifugação das placas a 300 RCF, a 4°C por 6 minutos (centrífuga Hermle Z 326 K). O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de nitrito.

De forma sucinta, 50µL do reagente de Griess foi adicionado a 50µL do sobrenadante de cada amostra. A reação ocorreu na ausência de luz, para que o reagente não fosse degradado, à temperatura ambiente. Após 10 minutos, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Foram obtidos os valores de absorbância de cada amostra.

Foi determinada a concentração de nitrito, em µM, através da comparação com a curva padrão, realizada com nitrito de sódio nas seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 µM.

4.7 Ensaio imunoenzimático para mensuração de citocinas

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é um teste que permite a detecção de anticorpos ou antígenos específicos em uma amostra. Devido à especificidade da ligação antígenos-anticorpo e a alta sensibilidade de uma reação enzimática, o teste de ELISA torna-se de alta confiabilidade e altamente sensível, sendo capaz de detectar quantidades mínimas de uma substância em particular em uma amostra (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Entre os diversos tipos de ELISA, o utilizado neste trabalho foi o tipo sanduíche. Nesse tipo de ELISA, em uma placa de 96 poços, é previamente adsorvido nos poços um anticorpo específico, chamado de anticorpo de captura, para um antígeno de interesse (nesse trabalho os antígenos foram as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6). Em seguida, é inserida a amostra nos poços e o antígeno de interesse se ligará ao anticorpo de captura. Logo após, é inserido mais um anticorpo específico para o antígeno, chamado de anticorpo secundário, que também se liga ao antígeno. Posteriormente, é adicionado mais um anticorpo acoplado a um complexo enzimático capaz de clivar um substrato em uma molécula cromogênica; esse anticorpo se liga ao anticorpo secundário. Por último, é adicionado um substrato que será convertido pela enzima em uma substância cromogênica que será quantificada através da absorbância no espectrofotômetro.

Neste trabalho foram quantificadas por ELISA sanduíche as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, utilizando o Kit e protocolo indicados pelo fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

As amostras para realização do teste de ELISA foram obtidas a partir da centrifugação das placas a 300 RCF, a 4° C por 6 minutos (centrífuga Hermle Z 326 K). O sobrenadante foi coletado e utilizado no teste de ELISA.

De forma sucinta, foram adsorvidos em placas de ELISA (NUNC-Immuno™) os anticorpos de captura anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-6, diluídos em PBS pH 6,5, e em seguida as placas foram incubadas a 4°C por 18 horas (*overnight*). Posteriormente, as placas foram lavadas em uma solução de PBS + 0,05% de tween 20 (PBST). Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos utilizando como solução de bloqueio PBS + 10% SFB; aguardou-se o tempo de uma hora. Cumprido o tempo, as placas foram novamente lavadas em PBST e em seguida foram adicionadas as amostras a seres analisadas e as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 para a elaboração das curvas padrão; essas placas foram novamente incubadas a 4° C por 18 horas (*overnight*). Ao fim do tempo de incubação, as placas foram novamente lavadas com PBST e então foi adicionado o anticorpo secundário. Em seguida prosseguiu-se com mais uma lavagem da placa com PBST e por fim foi adicionado o anticorpo acoplado ao complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*); feito isso, as placas foram incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente. Por fim, foram feitas mais lavagens com PBST e foi adicionada uma solução contendo o substrato tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Passado 15 minutos, a reação foi parada pela adição de ácido fosfórico 1M e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450 nm. Foram obtidos os valores de absorbância de cada amostra.

Foi determinada a concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-6, em pM, através da comparação com a curva padrão, realizada com TNF- α , IL-1 β e IL-6 nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 pM, para TNF- α e IL-1 β ; e 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 e 3,90625 pM para IL-6.

4.8 Análise estatística

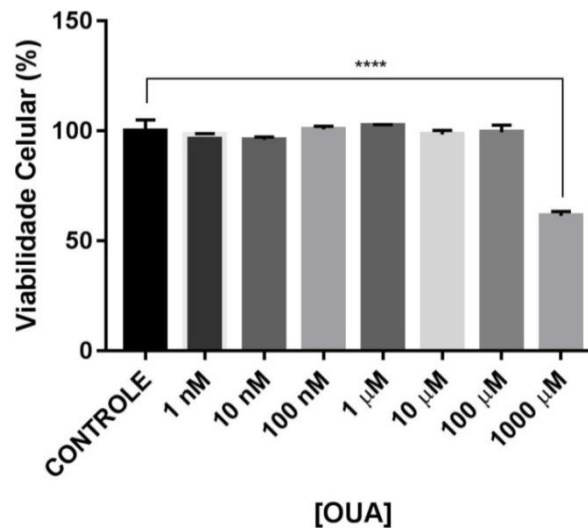
Todos os resultados foram analisados pelo método ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Para as análises foi utilizado o programa Graph Pad Prism versão 6.0, sendo os valores com $p < 0,05$ considerados significativos (Graph Pad Software Inc., San Diego, U.S.A.).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de viabilidade celular por redução de sais de MTT

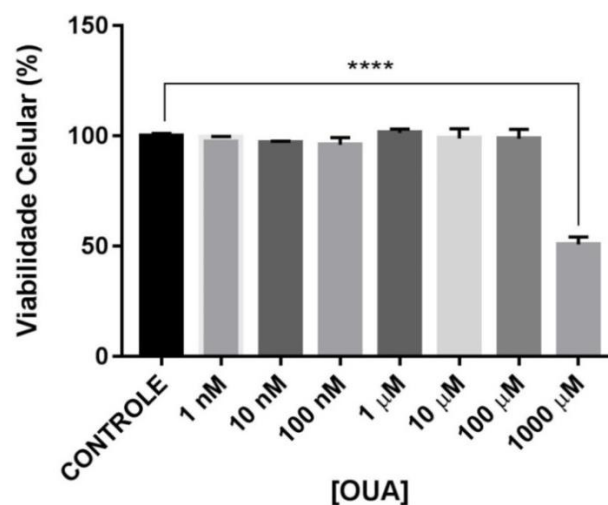
No grupo testado com a maior concentração de OUA (1000 μ M) houve redução de 39,6% na viabilidade celular no tempo de 24 horas; com 48 horas de exposição à ouabaína, a redução de viabilidade foi de 49,3%. Não houve alterações significativas nos outros grupos testados (Gráfico 1 e 2).

Gráfico 1. Resultado do ensaio de MTT - 24 horas



No tempo de 24 horas, houve redução de viabilidade celular de 39,6% apenas no grupo testado com a maior concentração de ouabaína. **** = valor de $p < 0,001$.

Gráfico 2. Resultado do ensaio de MTT - 48 horas



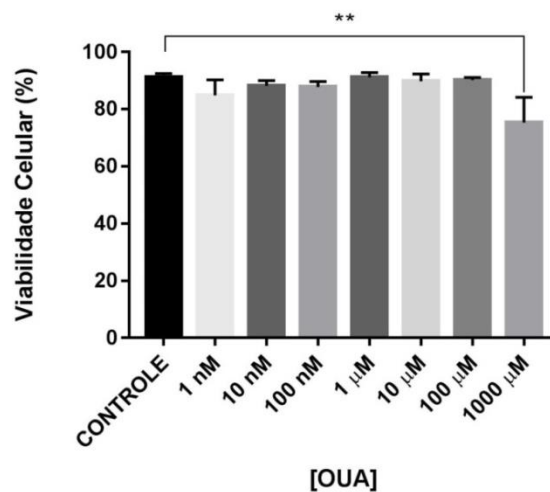
No tempo de 48 horas, houve redução de viabilidade celular de 49,3% apenas no grupo testado com a maior concentração de ouabaína. **** = valor de $p < 0,001$.

Os resultados também mostram que não houve variações significativas na viabilidade entre o período de 24 e 48 horas.

5.2 Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de trypan

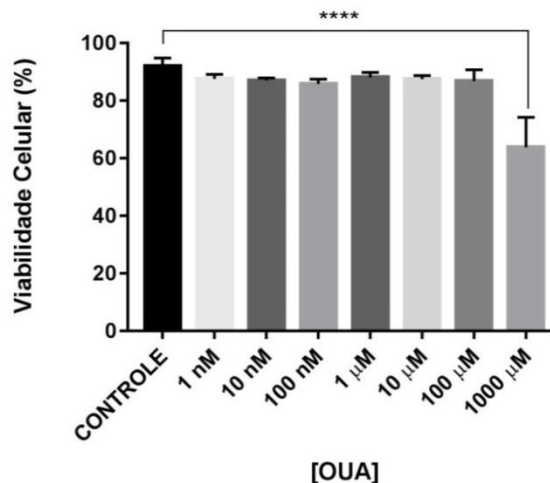
Semelhantemente ao ensaio de MTT, apenas no grupo testado com a maior concentração de OUA (1000 μM) houve redução, com significância estatística, da viabilidade celular. A redução foi de 15,8% em 24 horas, e 28,1% em 48 horas. Não houve alterações significativas nos outros grupos testados (Gráfico 3 e 5).

Gráfico 3. Resultado do método de exclusão por azul de trypan – 24 horas



No tempo de 24 horas, houve redução de viabilidade celular de 15,8% apenas no grupo testado com a maior concentração de ouabaína. ** = valor de $p < 0,05$.

Gráfico 4. Resultado do método de exclusão por azul de trypan - 48 horas



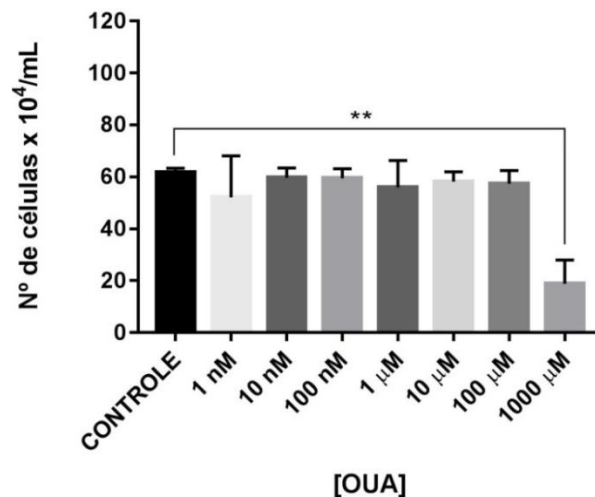
No tempo de 48 horas, houve redução de viabilidade celular de 28,1% apenas no grupo testado com a maior concentração de ouabaína. **** = valor de $p < 0,0005$.

Os resultados também mostram que não houve variações significativas na viabilidade entre o período de 24 e 48 horas.

5.3 Concentração celular pelo método de exclusão por azul de trypan

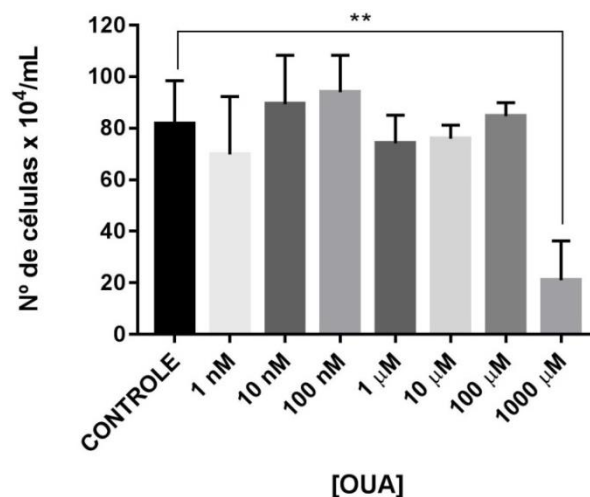
Entre o período de 24 e 48 horas, houve cerca de 30% de aumento na concentração de células viáveis em todos os grupos testados, excetuando o grupo da maior concentração (1000 μM) que manteve a concentração em 5×10^5 células/poço entre esse período (Gráfico 5 e 6).

Gráfico 5. Resultado indicando a concentração de células viáveis - 24 horas



No tempo de 24 horas, houve redução na concentração de células viáveis de 30% apenas no grupo testado com a maior concentração de ouabaína. ** = valor de $p < 0,05$.

Gráfico 6. Resultado indicando a concentração de células viáveis - 48 horas



No tempo de 48 horas, houve redução na concentração de células viáveis de 60% apenas no grupo testado com a maior concentração de ouabaína. ** = valor de $p < 0,05$.

Com 24 horas de incubação a concentração de células viáveis no grupo de maior concentração (1000 μM) foi cerca de 60% menor comparada à do grupo controle, apresentando diferença estatística. Além disso, no tempo de 48 horas houve aproximadamente 75% de redução na concentração de células viáveis.

5.4 Análise indireta da produção de óxido nítrico (NO) e ensaio imunoenzimático para mensuração de citocinas

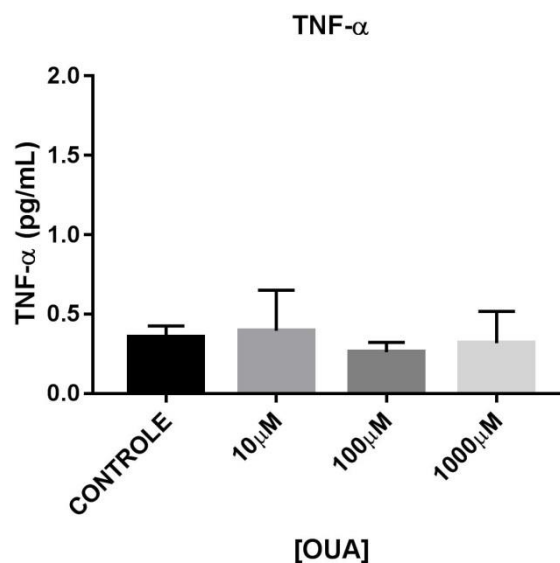
5.4.1 Produção de óxido nítrico (NO)

As células não são capazes de produzir, de forma basal, uma quantidade de óxido nítrico mensurável pelo ensaio utilizado nesse trabalho, assim como a ouabaína, nas diferentes concentrações utilizadas (dados não mostrados), tanto no tempo de 24 como 48 horas.

5.4.2 TNF- α

Foi detectada uma baixa quantidade de TNF- α produzida por todos os grupos experimentais, incluindo o grupo controle. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Gráfico 7).

Gráfico 7. Resultado do ensaio imunoenzimático: produção de TNF- α

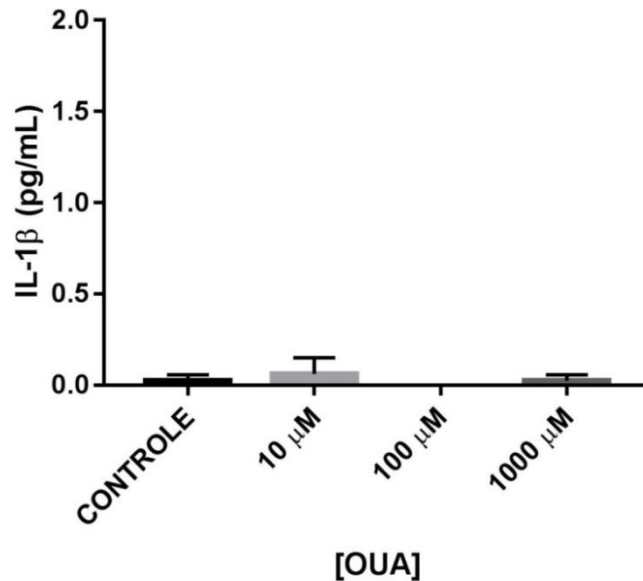


Células do tumor de Ehrlich produzem de forma basal baixa quantidade de TNF- α , entretanto a OUA não foi capaz de modular a sua produção, *in vitro*, nas células estudadas.

5.4.3 IL-1 β

Foi detectada uma efêmera produção de IL-1 β no grupo controle e nos grupos testados com OUA nas concentrações 10 e 1000 μ M (Gráfico 8).

Gráfico 8. Resultado do ensaio imunoenzimático: produção de IL-1 β



Células do tumor de Ehrlich produzem de forma basal baixa quantidade de IL-1 β , entretanto a OUA não foi capaz de modular a sua produção, in vitro, nas células estudadas.

5.4.2 IL-6

Não foi detectada a produção de IL-6 por nenhum dos grupos experimentais, incluindo o grupo controle (dados não mostrados).

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos já demonstraram que inflamações crônicas desencadeiam ou tornam indivíduos susceptíveis ao surgimento e progressão de vários tipos de câncer (COUSSENS; WERB, 2002; DIAKOS et al, 2014; MANTOVANI et al, 2008). Nesse contexto, as células do sistema imune cooperam para a carcinogênese, entre elas, os macrófagos. Essas células migram para o tecido afetado, onde produzem e secretam diversas substâncias que favorecem o surgimento e perpetuação de células transformadas (PALERMO-NETO, 2003; POLVERINI, 1997; TSUTSUI, 2005). Sendo assim, as moléculas com atividade anti-inflamatória são potenciais inibidores do processo de carcinogênese por interferirem em vias que são vitais para o seu desencadeamento e manutenção (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; JONES et al., 1999; SALEEM, 2009; ULRICH; BIGLER; POTTER, 2006; WON et al., 2005).

Como já foi citado, existem vários trabalhos publicados na literatura científica que gradualmente explanam a atividade anti-inflamatória da OUA em diversos modelos experimentais (DE VASCONCELOS et al., 2011; CAVALCANTE-SILVA et al., 2017, 2019; GALVÃO et al., 2017; JACOB et al., 2013; LEITE et al., 2015; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003). Adicionalmente, dois trabalhos realizados por nosso grupo, buscaram compreender o papel fisiopatológico da OUA no processo de carcinogênese através do modelo experimental de Ehrlich na sua forma ascítica (SALMERON, 2018) e sólida (CALADO, 2019). Foi observado nesses trabalhos que a OUA era capaz de modular negativamente o desenvolvimento tumoral em ambos os modelos experimentais, levantando questionamentos pertinentes sobre uma possível atividade antineoplásica desse glicosídeo nas células do tumor de Ehrlich. Com o intuito de investigar e tentar elucidar o mecanismo pelo qual a OUA retardou a progressão dos tumores, este trabalho foi elaborado para avaliar a citotoxicidade desse glicosídeo em células do tumor de Ehrlich, isoladas *in vitro*.

As concentrações de OUA utilizadas neste trabalho foram escolhidas baseadas nas concentrações em que os digitálicos são capazes de inibir a bomba Na^+/K^+ ATPase, 10^{-8} a 10^{-9} M, pois especulava-se a possibilidade da OUA atuar como agente antineoplásico através da ativação de via apoptótica pela ativação de caspases-3, decorrentes da ligação da OUA na subunidade α da bomba (GOTO et al., 1992; BORTNER et al., 1997). Quanto à escolha de testar concentrações de

OUA maiores que 10^{-8} , foi baseada em dados na literatura referente à incapacidade da OUA em inibir a bomba Na^+/K^+ ATPase em baixas concentrações, assim como os outros digitálicos, dessa forma causando apenas modificações conformacionais na bomba que poderiam interferir em processos vitais da célula como motilidade, crescimento e proliferação (AIZMAN et al., 2001; FONTANA et al., 2013).

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular, tanto através do método de redução de MTT quanto exclusão por azul de tripan, revelaram que nas células do tumor de Ehrlich apenas a maior concentração testada (1000 μM) foi capaz de diminuir a viabilidade celular nos dois tempos analisados, sugerindo uma resposta dose-dependente. Essa resposta dose-dependente também foi observada por Johansson e colaboradores (2001) que avaliou a citotoxicidade de cinco glicosídeos, entre eles a ouabaína, em várias linhagens de células tumorais.

Além disso, em ambos os tempos testados, a concentração celular viável foi significativamente menor apenas no grupo de 1000 μM , quando comparado com o controle. A concentração celular foi reduzida em aproximadamente 60% no tempo de 24 horas, e reduzida em 75% no tempo 48 horas, confirmando que a OUA tem efeito citotóxico sobre as células nessa concentração. Através dessa observação, é possível conjecturar o possível mecanismo que levou a OUA a modular negativamente o desenvolvimento tumoral nos experimentos anteriores realizados *in vivo*.

Apesar da OUA ter reduzido o volume tumoral nos modelos experimentais de Ehrlich *in vivo* (CALADO, 2019; SALMERON, 2018), essa redução provavelmente não está associada com a citotoxicidade do glicosídeo em células de Ehrlich. Matematicamente, a concentração de OUA utilizada nos experimentos *in vivo* se aproxima de 96 μM /dose e nessa concentração a OUA não demonstrou citotoxicidade para as células de Ehrlich nos testes conduzidos *in vitro*. O mais provável é que a OUA tenha modulado negativamente o desenvolvimento do tumor devido a sua atividade anti-inflamatória.

Salmeron (2018) descreveu em seu trabalho que a OUA foi capaz de alterar o perfil de células inflamatórias no microambiente tumoral, no modelo experimental de Ehrlich ascítico, provocando uma redução de 81% no número de neutrófilos e 55% no número de macrófagos, comparado com o grupo tumor não tratado com o digitálico. A redução da migração de células do sistema imune inato para o microambiente tumoral é um dos mecanismos da ação anti-inflamatória da OUA (DE

VASCONCELOS et al., 2011; LEITE et al., 2015) que acaba, indiretamente, retardando a progressão tumoral (TSUTSUI et al., 2005). Além disso, um estudo realizado por nosso grupo demonstrou que a OUA inibe a ativação das proteínas NF- κ B e p-38 (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2014), ambas de grande importância para o processo carcinogênico, principalmente no estágio de promoção (KHOUL et al., 2013).

Outra evidência que sustenta a hipótese de que a OUA não é citotóxica em baixas concentrações para as células de Ehrlich, são os trabalhos que relatam que células de roedores são cerca de 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos citotóxicos da OUA comparado com células humanas (CALDERON-MONTAÑO et al., 2014a; CALDERON-MONTAÑO et al., 2014b; GUPTA; CHOPRA; STETSKO, 1986). A literatura científica relata que a concentração de OUA citotóxica para células humanas, cancerosas ou não, varia entre 2 nM à 150 nM (BIELAWSKI et al., 2006; CALDERON-MONTAÑO et al., 2014a; MANKOVITZ et al., 1974; WINNICKA et al., 2007). Essa disparidade é explicada devido a uma diferença na isoforma da subunidade α 1 da bomba Na⁺/K⁺-ATPase que torna as células murinas menos sensíveis à OUA (AKIMOVA et al., 2015).

Sobre o mecanismo de ação que desencadeou a redução da viabilidade celular e concentração de células no grupo de 1000 μ M, existem duas possibilidades: a primeira envolve clássica inibição da bomba Na⁺/K⁺ ATPase que resulta na redução das concentrações de íons potássio no citoplasma concomitante com a elevação das concentrações de íons cálcio no citoplasma da célula desencadeando a morte celular por apoptose, através da ativação de caspases-3 (BORTNER et al., 1997); e a segunda possibilidade, proposta por Valente e colaboradores (2003), envolve a inibição da bomba Na⁺/K⁺ ATPase, ou alteração na sua cinética, por meio da OUA, de modo que haja um aumento das concentrações de Na⁺ junto com a redução da concentração de K⁺ no citoplasma da célula. Dessa forma, células com baixa quantidade de glutatona inibem a despolarização da membrana plasmática causando um aumento da expressão de tirosina quinase e proteína Ras, além de estimular a produção de íons superóxido, induzindo a célula a apoptose.

Analisando os outros resultados obtidos dos experimentos, é possível observar que não houve produção de nitrito pelas células do tumor de Ehrlich. Esse teste foi realizado, pois há um relato na literatura de uma linhagem murina de um

adenocarcinoma, denominada TA 3, que é capaz de sintetizar nitrito a partir de L-arginina mediante estimulação com INF- γ associado com lipopolissacarídeo (LPS) e/ou fator de necrose tumoral (TNF). A produção de nitrito e seus derivados por essas células inibe a enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pela conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, dessa forma inibindo a síntese de DNA nessas células, conseqüentemente inibindo sua proliferação (LEPOIVRE et al., 1990). O intuito do teste era avaliar se as células de Ehrlich, sendo também um adenocarcinoma murino, sintetizavam níveis basais de nitrito, haja vista que não há esse dado na literatura. Caso fosse comprovada a produção de nitrito por essas células, este poderia estar sendo modulado positivamente pela maior concentração de OUA, ajudando a explicar a redução da viabilidade celular e concentração celular, além de caracterizar um novo mecanismo de ação da OUA nas células estudadas. É importante salientar que neste trabalho não houve estimulação das células para a produção de nitrito. Esse parâmetro pode ser avaliado em trabalhos futuros, para verificar o efeito da produção de nitrito pela OUA em células do tumor de Ehrlich estimuladas.

Por fim, foram analisadas as produções de citocinas pró-inflamatórias, pois algumas linhagens de células tumorais possuem a capacidade de sintetizar algumas citocinas, sendo a de maior relevância para o desenvolvimento do câncer a IL-1 β , contribuindo para a formação do microambiente tumoral e progressão da carcinogênese (MANTOVANI et al., 2008; CRUSZ; BLAKWILL, 2015). Foi constatada a produção de TNF- α e IL-1 β . Entretanto, a produção das citocinas foi muito baixa e não houve diferenças significativas entre os grupos analisados na presença de OUA. Novamente, é importante ressaltar que não houve estimulação das células em nenhum dos grupos avaliados, portanto apenas a produção basal das citocinas foi avaliada. Outros mecanismos de estimulação celular para a produção de citocinas poderiam ser avaliados para estudar a modulação pela OUA nesse modelo. Ainda é possível conjecturar que, embora células tumorais não sejam especializadas para a produção de citocinas, a produção delas em baixíssimas concentrações pode ser suficiente para influenciar os estágios de iniciação ou promoção do câncer.

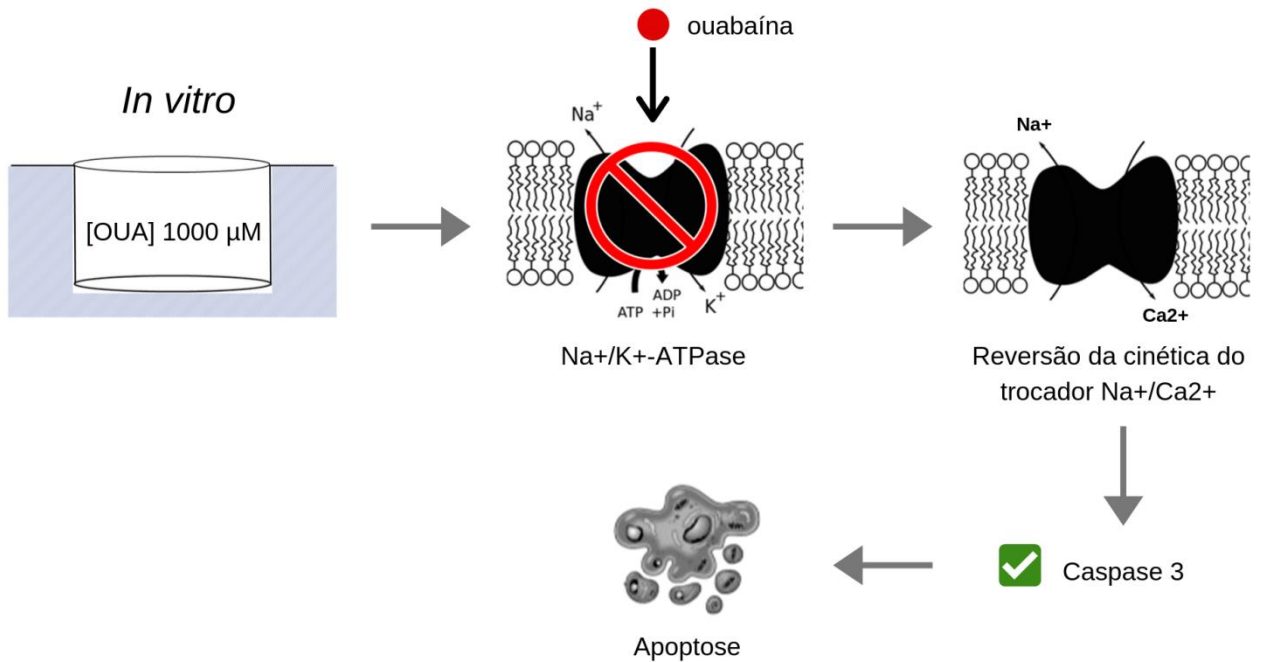
Finalmente, o efeito modulador negativo causado pela OUA e observado anteriormente no modelo in vivo, pode estar relacionado com o seu papel anti-inflamatório nas células do sistema imunológico. Diversos trabalhos realizados por

nosso grupo demonstraram a ação anti-inflamatória desse digitálico através da redução do nível das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α no modelo experimental de inflamação induzida por *Leishmania amazonenses* (JACOB et al., 2013), IL-1 β e TNF- α no modelo experimental de peritonite (LEITE et al., 2015), e IL-4, IL-13 e IFN- γ no modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica (GALVÃO et al., 2017). Além disso, também demonstramos a redução da migração de diversas células inflamatórias como eosinófilos no modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica (GALVÃO et al., 2017), neutrófilos no modelo experimental de peritonite (LEITE et al., 2015), e neutrófilos e macrófagos no modelo experimental de Ehrlich (SALMERON, 2018).

Adicionalmente, Leite e colaboradores (2015) observaram que a OUA foi capaz de reduzir em 33% o exsudato plasmático no modelo experimental de peritonite em camundongos; a presença de exsudato plasmático é uma das características da inflamação aguda e contribui para a formação do edema no sítio inflamado. Considerando essas informações, é possível sugerir que a redução da massa tumoral dos grupos tratados com OUA em 8,1% no modelo experimental *in vivo* ascítico relatado por Salmeron (2018) e 17% no modelo experimental sólido relatado por Calado (2019) podem, novamente, estar associadas à atividade anti-inflamatória da OUA.

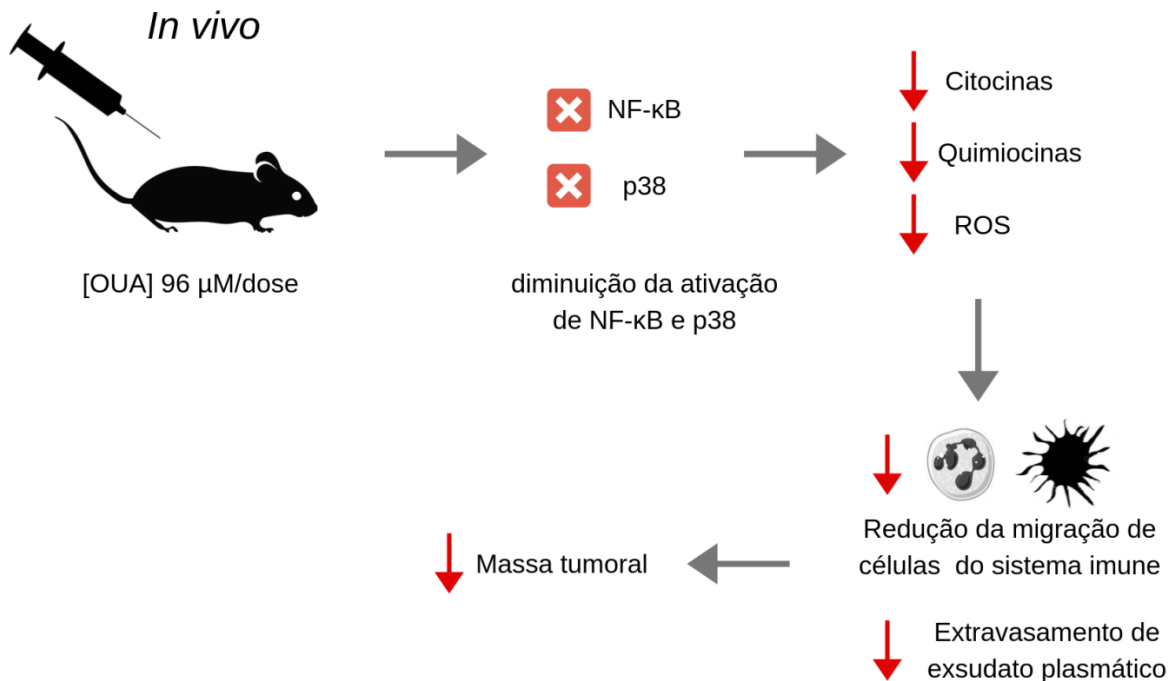
Dessa forma, esse trabalho ajuda a compreender os efeitos da OUA nas células do tumor de Ehrlich quando testados *in vitro* e, dessa forma, compreender a sua influência no processo de carcinogênese, especificamente no modelo experimental de Ehrlich *in vivo*. Portanto, sugere-se que nos experimentos *in vitro*, na concentração de 1000 μM , a OUA aja inibindo a Na^+/K^+ -ATPase, conseqüentemente revertendo a cinética do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, resultando no aumento de cálcio intracelular que desencadeia a apoptose via ativação de caspase-3 (Figura 5); adicionalmente, sugere-se que nos experimentos realizados *in vivo*, devido a baixa concentração de OUA na dose administrada nos animais (96 μM /dose), a OUA aja diminuindo a ativação de p38 e NF- κB , conseqüentemente diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, dessa forma impedindo a migração de células e o extravasamento de exsudato plasmático para o microambiente tumoral, conseqüentemente reduzindo o a massa tumoral nos camundongos (Figura 6).|

Figura 5. Proposta do possível mecanismo de ação da ouabaína em células do tumor de Ehrlich, na concentração de 1000 μM , para os experimentos *in vitro*



Sugere-se que na concentração de 1000 μM a ouabaína iniba a Na⁺/K⁺-ATPase, conseqüentemente revertendo a cinética do trocador Na⁺/Ca²⁺, resultando no aumento de cálcio intracelular que desencadeia a apoptose das células tumorais via ativação de caspase-3.

Figura 6. Proposta do possível efeito da ouabaína no modelo experimental de Ehrlich *in vivo*



A concentração de ouabaína na dose administrada em camundongos é inferior à dose citotóxica nos experimentos *in vitro*. Sugere-se que, nessa concentração, a ouabaína diminua a ativação de NF- κB e p38 no animal, conseqüentemente reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), dessa forma reduzindo a migração de células do sistema imune e o extravasamento de exsudato plasmático para o microambiente tumoral. Como resultado é observado a redução da massa tumoral nos camundongos.

7 CONCLUSÃO

A ouabaína não apresenta citotoxicidade *in vitro* em células do tumor de Ehrlich em concentrações abaixo de 1000 μM , devido à resistência das células murinas a esse glicosídeo conferida pela isoforma $\alpha 1$ da bomba Na^+/K^+ -ATPase presente em roedores. Sendo assim, sugere-se que a inibição da progressão tumoral observada nos experimentos *in vivo* ocorreu devido à atividade anti-inflamatória da ouabaína e não por atividade citotóxica da mesma; além disso, sugere-se que nos teste *in vitro*, na concentração de 1000 μM , a OUA provoque apoptose nas células de Ehrlich via caspase 3. Foi constatado que células de Ehrlich não produzem nitrito de forma basal, entretanto produzem uma pequena concentração de citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, no entanto sem diferenças estatísticas entre os grupos testados. Este estudo reafirma a atividade anti-inflamatória da ouabaína sem desconsiderar o seu potencial antitumoral em células humanas, que são mais sensíveis a esse hormônio. Estes resultados ajudam a compreender o papel fisiopatológico da ouabaína no modelo experimental de Ehrlich e conjecturar seu papel em oncopacientes humanos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Anjali et al. Radiation induced oxidative stress: I. Studies in Ehrlich solid tumor in mice. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 223, n. 1-2, p. 71-80, 2001.
- AKIMOVA, Olga A. et al. Critical role of the α 1-Na⁺, K⁺-ATPase subunit in insensitivity of rodent cells to cytotoxic action of ouabain. **Apoptosis**, v. 20, n. 9, p. 1200-1210, 2015.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC: The Global Bioresource Center**, 2019. Ehrlich-Lettre ascites. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/CCL-77.aspx#culturemethod>>. Acesso em: 04 de ago. de 2019.
- ANAND, Preetha et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.
- AIZMAN, Oleg et al. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13420-13424, 2001.
- AMIRIFARD, Nasrin et al. Relationship between HER2 proto-oncogene status and prognostic factors of breast cancer in the west of Iran. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 1, p. 295-298, 2016.
- ANNER, Beatrice M. et al. Interaction of hypothalamic Na, K-ATPase inhibitor with isolated human peripheral blood mononuclear cells. **Bioscience reports**, v. 14, n. 5, p. 231-242, 1994.
- AUBREY, Brandon J.; STRASSER, Andreas; KELLY, Gemma L. Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 5, p. a026062, 2016.
- ARCHERS, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 2, p. 349-360, 1993.
- BABA, Alecsandru Ioan; CĂTOI, Cornel. **Comparative oncology**. Bucharest: Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- BAUER, N.; MÜLLER-EHMSSEN, J.; KRÄMER, U.; HAMBARCHIAN, N.; ZOBEL, C.; Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs - Effects of β -Blockade and AngiotensinConverting Enzyme Inhibition. **Hypertension**, pp. 1024-1028, 2005.
- BAUER, Natali et al. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of β -blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 1024-1028, 2005.
- BAYLIN, Stephen B.; JONES, Peter A. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer**, v.

11, n. 10, p. 726, 2011.

BIELAWSKI, Krzysztof; WINNICKA, Katarzyna; BIELAWSKA, Anna. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 7, p. 1493-1497, 2006.

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-C1387, 1993.

BLAUSTEIN, M. P.; JUHASZOVA, M.; GOLOVINA, V. A. The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: a new hypothesis. **Clinical and experimental hypertension**, v. 20, n. 5-6, p. 691-703, 1998.

BORTNER, Carl D.; HUGHES, Francis M.; CIDLOWSKI, John A. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32436-32442, 1997.

BURNET, Macfarlane et al. Cancer-a Biological Approach. IV. **British Medical Journal**, p. 841-7, 1957.

CALADO, Maria Beatriz Silva. **Interferência da ouabaína no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, 2019.

CALDERON-MONTANO, J. M.; BURGOS-MORON, E.; LOPEZ-LAZARO, M. The in vivo antitumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact. **Oncogene**, v. 33, n. 22, p. 2947, 2014a.

CALDERÓN-MONTAÑO, José Manuel et al. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed research international**, v. 2014, 2014b.

CHANVORACHOTE, Pithi; PONGRAKHANANON, Varisa. Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 304, n. 3, p. C263-C272, 2012.

CARVALHO, Deyse et al. Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

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.

CAVALCANTE-SILVA, Luiz Henrique Agra et al. Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils. **Inflammopharmacology**, p. 1-7, 2019.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. **Nature**, v. 225, n. 5234, p. 734, 1970.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860, 2002.

CRUSZ, Shanthini M.; BALKWILL, Frances R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 12, n. 10, p. 584, 2015.

DAGLI, Maria Lúcia Zaidan; GUERRA, José Luiz; SALDIVA, Paulo Hilário Nascimento. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**, v. 1989.

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

WARDENER, H. E. Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis, which follows the administration of intravenous saline in the dog. **Clin Sci**, v. 21, p. 249-258, 1961.

DIAKOS, Connie I. et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 11, p. e493-e503, 2014.

DOLCET, Xavier et al. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows archiv**, v. 446, n. 5, p. 475-482, 2005.

DORIS, P. A.; STOCCO, D. M. An endogenous digitalis-like factor derived from the adrenal gland: studies of adrenal tissue from various sources. **Endocrinology**, v. 125, n. 5, p. 2573-2579, 1989.

DVORAK, Harold F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **Journal of clinical oncology**, v. 20, n. 21, p. 4368-4380, 2002.

ECHEVARRIA-LIMA, Juliana et al. Ca²⁺ mobilization induced by ouabain in thymocytes involves intracellular and extracellular Ca²⁺ pools. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1386-1392, 2003.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mausetumoren. **Berliner Klinischer Ochschrift**, v. 28, p. 871-874, 1906.

ESTEVEs, Mabel B. et al. Ouabain exacerbates activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 2, p. 281-292, 2005.

EVANGELISTA, Laura et al. The role of radiolabeled prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography for the evaluation of renal cancer. **European urology focus**, 2018.

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

1997.

FONTANA, Jacopo M. et al. Calcium oscillations triggered by cardiotonic steroids. **The FEBS journal**, v. 280, n. 21, p. 5450-5455, 2013.

FRAJACOMO, Fernando Tadeu Trevisan et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life sciences**, v. 162, p. 47-53, 2016.

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

GARCÍA-LAFUENTE, Ana et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537-552, 2009.

GIOVANNUCCI, E. The prevention of colorectal cancer by aspirin use. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 53, n. 7, p. 303-308, 1999.

GREENBERG, E. R. et al. Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 11, p. 912-915, 1993.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREENHOUGH, Alexander et al. The COX-2/PGE 2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 377-386, 2009.

GREENSTEIN, Jesse P. **Biochemistry of cancer**. Elsevier, 2016.

GUERRA, José Luiz; MARIANO, Mário. **Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich**. 1983. (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

GOLDSBY R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE B. A. **Kuby Immunology**, 4 ed. W. H. Freeman and Company. 2000.

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

GUPTA, Radhey S.; CHOPRA, Arvind; STETSKO, Dawn K. Cellular basis for the species differences in sensitivity to cardiac glycosides (digitalis). **Journal of cellular physiology**, v. 127, n. 2, p. 197-206, 1986.

HAMLIN, 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. 6259-6263, 1991.

HAMLIN, John M. et al. 11-Hydroxylation in the biosynthesis of endogenous ouabain: Multiple implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, n. 1, p. 685-693, 2003

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HUANG, Yao-Ting et al. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. **Biochemical pharmacology**, v. 67, n. 4, p. 727-733, 2004.

HUBBI, Maimon E.; SEMENZA, Gregg L. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 309, n. 12, p. C775-C782, 2015.

HYNDMAN, Iain Joseph. The Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 1, p. 63-69, 2016.

IARC – International Agency for Research on Cancer, 2018. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>. Acesso em: 07/07/2019.

INCA – Instituto Nacional de Câncer, 2018a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 07/07/2019.

INCA – Instituto Nacional de Câncer, 2018b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-causa-cancer>>. Acesso em: 07/07/2019.

INCA – Instituto Nacional de Câncer, 2018b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 07/07/2019.

INCA – Instituto Nacional de Câncer, 2019a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 06/07/2019.

INCA – Instituto Nacional de Câncer, 2019b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>>. Acesso em: 06/07/2019.

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, 2013

JONES, Michael K. et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nature medicine**, v. 5, n. 12, p. 1418, 1999.

KATO, Yasumasa et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. **Cancer**

cell international, v. 13, n. 1, p. 89, 2013.

KIM, Ryungsa; EMI, Manabu; TANABE, Kazuaki. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1-14, 2007.

KOUL, Hari K.; PAL, Mintu; KOUL, Sweaty. Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. **Genes & cancer**, v. 4, n. 9-10, p. 342-359, 2013.

KUDO, Tamotsu; NARISAWA, Tomio; ABO, Shichisaburo. Antitumor activity of indomethacin on methylazoxymethanol-induced large bowel tumors in rats. **GANN Japanese Journal of Cancer Research**, v. 71, n. 2, p. 260-264, 1980.

KUNE, Gabriel A.; KUNE, Susan; WATSON, Lyndsey F. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. **Cancer research**, v. 48, n. 15, p. 4399-4404, 1988.

LAREDO, J.R.; SHAH, Z.R.; LU, B.P.; HAMILTON, J.M. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension**, pp 401 – 407, 1997.

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

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

LEPOIVRE, Michel et al. Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 24, p. 14143-14149, 1990.

LI, Hanchen; FAN, Xueli; HOUGHTON, JeanMarie. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 805-815, 2007.

LICHTSTEIN, David et al. Biosynthesis of digitalis-like compounds in rat adrenal cells: hydroxycholesterol as possible precursor. **Life sciences**, v. 62, n. 23, p. 2109-2126, 1998.

LINGREL, Jerry B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na, K-ATPase. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 395-412, 2010.

LIU, Ning et al. Inhibition of cell migration by ouabain in the A549 human lung cancer cell line. **Oncology letters**, v. 6, n. 2, p. 475-479, 2013.

LOEWENTHAL, Hans; JAHN, Gertrud. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische

Einwirkungen. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 37, n. 1, p. 439-447, 1932.

MANKOVITZ, R.; BUCHWALD, M.; BAKER, R. M. Isolation of ouabain-resistant human diploid fibroblasts. **Cell**, v. 3, n. 3, p. 221-226, 1974.

MANN, John. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143, 2002.

MANTOVANI, Alberto et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436, 2008.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

WHO – World Health Organization, 2018. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 06/07/2019.

ONUICHIC, Ana Cláudia; CHAMMAS, Roger. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

ORLOV, Sergei N. et al. Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16545-16552, 1999.

OZASLAN, Mehmet et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PALERMO-NETO, João; DE OLIVEIRA MASSOCO, Cristina; DE SOUZA, Welker Robespierre. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

POLVERINI, P. J.; COTRAN, R. S.; GIMBRONE, M. A.; UNANUE, E. R. Activated macrophages induce vascular proliferation. **Nature**, v. 269, p.804-806, 1977.

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

RALL, William F.; FAHY, Gregory M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. **Nature**, v. 313, n. 6003, p. 573, 1985.

RIZZO, M.S. **Colonização preferencial e disseminação do tumor transplantável de ehrlich em camundongos**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, Dissertação (Doutorado), 2000.

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, Sandra; DOS SANTOS, Neusa Fernandes; RUMJANEK, Vivian M. Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy. **Bioscience Reports**, v. 26, n. 2, p. 159-169, 2006.

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.

RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra et al. Effect of ouabain on NFκB and p-38 activation in macrophages: a new biotechnological application. In: **BMC proceedings**. BioMed Central, 2014. p. P260.

SAAD, Entsar A.; HASSANIEN, Mohamed M.; EL-LBAN, Faten W. Nickel (II) diacetyl monoxime-2-pyridyl hydrazone complex can inhibit Ehrlich solid tumor growth in mice: A potential new antitumor drug. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 484, n. 3, p. 579-585, 2017.

SALEEM, Mohammad. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer letters**, v. 285, n. 2, p. 109-115, 2009.

SAITO, Motonobu et al. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. **Cancer research**, v. 75, n. 11, p. 2264-2271, 2015.

SALMERON, Amanda Costa Ayres. **Análise do pré-tratamento com ouabaína nos parâmetros inflamatórios do tumor ascítico de Ehrlich**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, 2018.

SIGIURA, K. Tumor transplantation. In: WILLIAN, I.G. Methods of animal experimentation. London: **Academic Press**, 1965. v. 2. p. 171-222.

SILVA, Istéfani Luciene et al. Qa-2 expression levels is related with tumor- infiltrating lymphocytes profile during solid Ehrlich tumor development. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 750-756, 2017.

SMITH, Judith A. et al. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. **Gynecologic oncology**, v. 98, n. 1, p. 141-145, 2005.

STUELTEN, Christina H. et al. Acute wounds accelerate tumorigenesis by a T cell-dependent mechanism. **Cancer research**, v. 68, n. 18, p. 7278-7282, 2008.

SUH, Okhee; METTLIN, Curtis; PETRELLI, Nicholas J. Aspirin use, cancer, and polyps of the large bowel. **Cancer**, v. 72, n. 4, p. 1171-1177, 1993.

SYMCHYCH, T. V. et al. Anticancer effect and immunologic response to xenogeneic embryonic proteins in mice bearing Ehrlich solid carcinoma. **Experimental**

oncology, 2017.

THAPLIYAL, Anupama; KRISHEN KHAR, Roop; CHANDRA, Amrish. AgNPs loaded microemulsion using gallic acid inhibits MCF-7 breast cancer cell line and solid ehrlich carcinoma. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, p. 1-25, 2019.

TSUTSUI, Shinichi et al. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. **Oncology reports**, v. 14, n. 2, p. 425-431, 2005.

THUN, Michael J.; NAMBOODIRI, Mohan M.; HEATH JR, Clark W. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 23, p. 1593-1596, 1991.

THUN, Michael J.; HENLEY, S. Jane; GANSLER, Ted. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. In: **Novartis Foundation symposium**. Chichester; New York; John Wiley; 1999, 2004. p. 6.

TYMIAK, Adrienne A. et al. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 8189-8193, 1993.

ULRICH, Cornelia M.; BIGLER, Jeannette; POTTER, John D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 2, p. 130, 2006.

Valente, Raphael C., et al. "Mechanisms of ouabain toxicity." **The FASEB Journal** 17.12 (2003): 1700-1702.

WALLACE, J. Nutrition and botanical modulation of the inflammatory cascade-eicosanoids, cylooxygenases and lipoxygenases – As an adjunct in cancer therapy. **Integrative Cancer Therapies**, v. 11, pp. 7-37, 2002.

WENCESLAU, Camilla Ferreira. **Efeito da administração crônica a longo prazo de ouabaína sobre a pressão arterial e a reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência de rato: possíveis mecanismos envolvidos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

WINNICKA, Katarzyna et al. Apoptosis-mediated cytotoxicity of ouabain, digoxin and proscillaridin A in the estrogen independent MDA-MB-231 breast cancer cells. **Archives of pharmacal research**, v. 30, n. 10, p. 1216-1224, 2007.

WINNICKA, Katarzyna et al. Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1131-1140, 2008.

WON, Shen-Jeu et al. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 1, p. 103-112, 2005.

YAMADA, Hisao et al. Histological study on ouabain immunoreactivities in the mammalian hypothalamus. **Neuroscience letters**, v. 141, n. 2, p. 143-146, 1992.

GLOSSÁRIO

Adsorvido	Que sofreu adsorção; Que foi retido em uma superfície sólida ou líquida por interação físico-química.
<i>American Type Culture Collection</i>	Organização sem fins lucrativos que coleta, armazena e distribui microorganismos de referência padrão, linhas de células e outros materiais para pesquisa e desenvolvimento.
Antineoplásico	Substância utilizada para destruir células neoplásicas e/ou malignas tendo como finalidade evitar ou inibir a proliferação, crescimento e disseminação de tumores.
Apoptose	Evento de morte celular, geneticamente programada e controlada, envolvendo diversas alterações morfológicas no citoplasma e núcleo.
Biodisponibilidade	Termo farmacocinético que descreve a velocidade e o grau com que uma substância ativa ou sua forma molecular terapeuticamente ativa é absorvida a partir de um medicamento e se torna disponível no local de ação.
Cancerígeno	Agente de natureza química, física ou biológica capaz de produzir câncer ou de favorecer seu aparecimento.
Canceroso	Que sofre de câncer; que está acometido com câncer.
Carcinogênese	Processo de formação do câncer.
Carcinogênico	Que produz ou tende a produzir câncer.
Catalítico	Que envolve ou causa catálise.
Cicloxygenase	Enzima responsável pela produção de mediadores biológicos chamados de prostanóides.
Cinase	Grupo de enzimas que transfere grupos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia para moléculas alvo-específicas.
Citocinas	Designação genérica para várias substâncias secretadas por células do sistema imune que controlam respostas imunes.

Citotoxicidade	Capacidade intrínseca de uma substância em promover alterações metabólicas nocivas em determinada célula ou sua morte.
Citotóxico	Que é tóxico para células.
Criotubo	Pequeno tubo utilizado para resfriamento de amostras em temperaturas ultrabaixas.
Cromogênico	Que produz cor; que produz pigmentos; que produz matéria corante.
Efusão	Escoamento de um fluido dos seus vasos ou reservatórios naturais para uma cavidade ou para os tecidos.
Farmacocinético	Parâmetro farmacológico que diz respeito à reação interativa que se observa entre um organismo e determinada droga.
Farmacodinâmico	Parâmetro farmacológico que diz respeito à ação dos medicamentos e de substâncias químicas no organismo.
Imunogenicidade	Capacidade de uma substância/agente de provocar uma resposta imune.
<i>In vitro</i>	Expressão do latim para representar processos e/ou experimentos biológicos realizados fora de sistemas vivos; realizado em ambiente artificial e controlado.
<i>In vivo</i>	Expressão do latim para representar processos e/ou experimentos biológicos realizados em sistemas vivos; realizado dentro ou em tecido vivo.
Incidência	Termo da estatística que se refere à frequência ou à quantidade com que algo ocorre.
Metástase	Deslocamento de células cancerosas, por via sanguínea ou linfática, do foco original para focos secundários.
Minorar	Tornar menor; reduzir.
Mitigar	Diminuir; reduzir; abrandar.

Mitógeno	Substância que estimula a proliferação celular.
Murino	Oriundo ou pertencente de ratos.
Oncologia	Especialidade da medicina que estuda e trata neoplasias; estudo do câncer.
Oncológico	Relativo ou pertencente à oncologia.
Pleomórfico	Capacidade de variar sua forma de acordo com o período do ciclo de vida ou das condições ambientais.
Prevalência	Termo da estatística que se refere ao número total de casos existentes numa determinada população e num determinado momento temporal.
Primordial	Que é essencial; imprescindível; relevante; importante.
Prostaglandinas	Ácidos graxos modificados, frequentemente derivados de lipídeos da membrana plasmática, dotados de atividade biológica, que atuam apenas na própria célula produtora ou em células adjacentes através de sinalização parácrina.
Retículo sarcoplasmático	Retículo endoplasmático de células musculares especializado no armazenamento de íons cálcio.
Tween	Surfactantes não-iônicos.