



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



**DAVI AZEVEDO FERREIRA**

**PERFIL IMUNOMODULADOR DO  $\gamma$ -BENZILIDENO DIGOXINA 8 (BD-8) EM  
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS**

**João Pessoa-PB**

**2024**

**DAVI AZEVEDO FERREIRA**

**PERFIL IMUNOMODULADOR DO  $\gamma$ -BENZILIDENO DIGOXINA 8 (BD-8) EM  
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito obrigatório de conclusão do **Mestrado**, para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**.

Área de concentração: **Farmacologia**.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Rodrigues Mascarenhas

**João Pessoa-PB**

**2024**

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

F383p Ferreira, Davi Azevedo.  
Perfil imunomodulador DO ? -benzilideno digoxina 8  
(BD-8) em macrófagos peritoneais murinos / Davi Azevedo  
Ferreira. - João Pessoa, 2024.  
73 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Imunomodulação. 2. Inflamação. 3. Zymosan. 4.  
Fagocitose. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II.  
Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



# PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

Ata da 496ª (quadringentésima nonagésima sexta) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Davi Azevedo Ferreira**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e oito de agosto do ano de dois mil e vinte e quatro (28/08/2024), na Sala 2 do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Davi Azevedo Ferreira**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Naiara Naiana Dejani, Ph.D em Imunologia Básica e Aplicada, Márcia Regina Piuvezam, Ph.D em Microbiologia, e Sandra Rodrigues Mascarenhas, Ph.D em Fisiologia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Sandra Rodrigues Mascarenhas, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Davi Azevedo Ferreira**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**PERFIL IMUNOMODULADOR DO  $\gamma$ -BENZILIDENO DIGOXINA 8 (BD-8) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS**”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Davi Azevedo Ferreira** legalmente habilitado(a) a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.ª Dr.ª Sandra Rodrigues Mascarenhas (Orientadora)

Prof.ª Dr.ª Naiara Naiana Dejani (Examinadora)

Prof.ª Dr.ª Márcia Regina Piuvezam (Examinadora)

Davi Azevedo Ferreira (Discente)



*Aos meus pais Juanbelia Wanderlei de Azevedo Ferreira e Lêdo César Ferreira da Silva; aos meus avós (in memoriam) e a toda minha família e amigos.*

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter iluminado e trilhado toda a minha caminhada até aqui, trazendo-me ao papel tão primordial que é de cuidar do outro, doando-me para proporcionar saúde a outras vidas.

Aos meus pais, Juanbelia Wanderlei de Azevedo Ferreira e Lêdo César Ferreira da Silva, por não medirem esforços para garantir a realização dos meus sonhos e planos de vida, tendo, muitas vezes, abdicando dos seus próprios sonhos e vontades para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu irmão, Gabriel Azevedo Ferreira, por estar sempre comigo, sendo, além de irmão, um amigo e companheiro nas dificuldades enfrentadas em nossas vidas.

Aos meus avós, Maria José Wanderlei de Azevedo (*in memoriam*) e Antônio Azevedo Filho (*in memoriam*), e Irene Batista da Silva (*in memoriam*) e Ademar Ferreira da Silva (*in memoriam*), por serem base familiar e de todos os ensinamentos que me tonam um ser humano digno.

Aos meus padrinhos Liliana Maria Ferreira Monteiro e Luís Gomes Monteiro, por estarem sempre presentes nos momentos importantes da minha vida.

A minha tia avó, Maria de Fátima Wanderlei de Souza, por servir de inspiração na entrada na carreira farmacêutica e nos conselhos ditos a mim até agora na minha vida.

As minhas tias Regina Lígia Wanderlei de Azevedo e Adriana Wanderlei de Azevedo, por serem fonte de resiliência, carinho e amor, além de sempre acreditarem em mim e no meu futuro, me apoiando sempre.

A minha irmã do coração, Isana Bronzeado Guimarães, por sempre estar comigo, nas horas difíceis e felizes, sempre me apoiando em tudo, te amo demais.

Aos meus amigos de laboratório, Anna Beatriz Araujo Medeiros, Mariana Mendonça Soares, Mateus Bernardo da Silva Leite, Gabriela Carolina S. L. De Oliveira, Éssia de Almeida Lima, Deyse Cristina Madruga carvalho, Daniel Wilson Arruda Magalhães, Noêmia Nielly Amaral Nogueira, Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva, José Marreiro de Sales Neto e Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha, por sempre estarem comigo nas horas difíceis de experimentos! Como também nas horas boas, na hora do cafezinho rs, do lanchinho. Vocês foram primordiais para a minha caminhada até agora, e espero que possam fazer parte diversas conquistas minhas.

A minha professora de graduação, Camila de Albuquerque Montenegro, por ter acreditado em mim na minha graduação na UFCG, me impulsionando no caminho científico, bem como servindo de ponte para que eu pudesse estar aonde estou hoje.

A minha orientadora, Sandra Rodrigues Mascarenhas, fonte de inspiração de profissional e pesquisadora, bem como de um ser humano de muita luz, sabendo levar a vida com mais leveza. Muito obrigado por ter me dado esta oportunidade de ser seu orientando, e que essa parceria perdure por vários anos!

A banca examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Regina Piuvezam e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Naiara Naiana Dejaní, por ocupar um pouco do seu tempo aprimorando meu trabalho, bem como enriquecendo o trabalho, tornando-o mais robusto.

Meus sinceros e profundos agradecimentos a todos vocês! Todos citados acima foram e são primordiais em minha vida!

*“Somos assim. Sonhamos o voo, mas tememos as alturas.*

*Para voar é preciso amar o vazio.*

*Porque o voo só acontece se houver o vazio.*

*O vazio é o espaço da liberdade, ausência de certezas.*

*Os homens querem voar, mas temem o vazio.*

*Não podem viver sem certezas.*

*Por isso trocam o voo por gaiolas.*

*As gaiolas são o lugar onde as certezas moram [...]*

**Rubem Alves (Trecho do livro: *Religião e Repressão*)**

## RESUMO

Os Esteroides Cardiotônicos (ECTs), são compostos naturais que apresentam várias atividades biológicas e que possuem a capacidade de interagir e gerar inibição na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. A secreção de algum desses esteroides (marinobufagina e ouabaína) é estimulada pelo aumento da concentração plasmática de sódio, angiotensina II e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Os ECTs apresentam a capacidade de gerar modulações na atividade do sistema imunológico, atuando no processo inflamatório, modulando moléculas como a Proteínas Kinases Ativadas por Mitógenos (MAPK) p38, CD18 e do Fator Nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B). O novo ECT semissintético, BD-8, é derivado da digoxina. No entanto não se conhece o efeito biológico desse novo composto. Com isso, o presente estudo objetivou investigar a atividade imunomoduladora do BD-8 *in vitro* e desvendar os possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade. Para isso, camundongos *Swiss* fêmeas foram previamente estimulados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de tioglicolato para a realização da cultura de macrófagos peritoneais. As células foram estimuladas com zymosan (ZYM) (0,2 mg/mL) e/ou tratadas com diferentes concentrações do BD-8 (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M). As células foram submetidas a um ensaio de MTT (Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio), para determinação da citotoxicidade, além de serem submetidas a ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO), pelo ensaio usando solução de Griess. A dosagem de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10) foi feita pelo ensaio de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche. A capacidade fagocítica foi feita por dois ensaios, ambos em placa de 24 poços (5x10<sup>6</sup> células/poço) e analisada a quantidade de ZYM fagocitado, sendo considerado com atividade fagocítica quando apresentava mais de três partículas de ZYM fagocitadas; e o ensaio com partículas fluorescentes de RedZYM e posteriormente analisada as partículas fagocitadas por citômetro de fluxo. A sinalização celular, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-Akt, anti-mTOR, anti-iNOS, anti-p-p38, anti-p-ERK1/2, anti-p-NF- $\kappa$ B, anti-p-Src e anti-COX-2, as células foram ajustadas a 1x10<sup>6</sup> células/tubo de citômetro, e feita a leitura de 10.000 eventos em citômetro de fluxo. Como resultado, foi visto que o BD-8 não apresentou atividade citotóxica nas concentrações testadas de 10 e 1 $\mu$ M, e 100, 10 e 1nM. A produção de NO foi modulada negativamente pelo BD-8 nas concentrações de 1 $\mu$ M (19,40%) e 10 $\mu$ M (32,08%). O tratamento com o BD-8, na concentração de 10 $\mu$ M, foi capaz de reduzir em 17% o nível da citocina IL-1 $\beta$ , já na concentração de 100nM foi capaz de aumentar em 39% o nível da IL-10. A capacidade fagocítica do ZYM em macrófagos foi diminuída no grupo tratado na concentração de 10 $\mu$ M (13,5%), bem como, na mesma concentração, reduziu a atividade fagocítica (36%) de partículas de RedZYM. O BD-8 foi capaz de modular negativamente as vias: da iNOS, Akt/mTOR, p38/ERK, translocação de NF- $\kappa$ B e Src, porém não interferiu nas EROs e COX-2. Dessa forma, este trabalho contribui para um melhor entendimento do efeito biológico da BD-8 e do papel imunológico desse esteroide cardiotônico.

**Palavras-chave:** Imunomodulação. Inflamação. Zymosan. Fagocitose. Mecanismos de sinalização.

## ABSTRACT

Cardiotonic Steroids (CTS) are natural compounds with various biological activities that can interact with and inhibit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. The secretion of some of these steroids (marinobufagin and ouabain) is stimulated by increased plasma sodium concentration, angiotensin II, and adrenocorticotrophic hormone (ACTH). CTSs can modulate the immune system's activity, acting in the inflammatory process by regulating molecules such as Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) p38, CD18, and Nuclear Factor kappa-B (NF-κB). The new semi-synthetic CTS, BD-8, is derived from digoxin. However, the biological effect of this new compound is unknown. Therefore, the present study aimed to investigate the immunomodulatory activity of BD-8 *in vitro* and uncover the possible mechanisms involved in this activity. For this purpose, female Swiss mice were pre-stimulated with an intraperitoneal (i.p.) injection of thioglycolate to harvest peritoneal macrophages for culture. The cells were stimulated with zymosan (ZYM) (0.2 mg/mL) and/or treated with different concentrations of BD-8 (1nM, 10nM, 100nM, 1μM, 10μM, 100μM). The cells were subjected to an MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to determine cytotoxicity and an assay for nitric oxide (NO) measurement using the Griess solution. Cytokine levels (IL-1β, IL-6, TNF-α, and IL-10) were measured using a sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Phagocytic capacity was assessed by two assays, both in 24-well plates (5x10<sup>6</sup> cells/well) by analyzing the amount of ZYM phagocytosed, considered phagocytic when more than three ZYM particles were phagocytosed, and by an assay with RedZYM fluorescent particles subsequently analyzed by flow cytometry. For cellular signaling, cells were fixed, permeabilized, and stained with antibodies against Akt, mTOR, iNOS, p-p38, p-ERK1/2, p-NF-κB, p-Src, and COX-2. Cells were adjusted to 1x10<sup>6</sup> cells/tube and 10,000 events were read in a flow cytometer. Results showed that BD-8 did not exhibit cytotoxic activity at the tested concentrations of 10 and 1μM, and 100, 10, and 1nM. NO production was negatively modulated by BD-8 at concentrations of 1μM (19.40%) and 10μM (32.08%). Treatment with BD-8 at 10μM reduced IL-1β levels by 17%, while at 100nM, it increased IL-10 levels by 39%. The phagocytic capacity of ZYM in macrophages was decreased in the group treated with 10μM (13.5%), and at the same concentration, it reduced RedZYM particle phagocytic activity (36%). BD-8 negatively modulated the iNOS, Akt/mTOR, p38/ERK, NF-κB translocation, and Src pathways, but did not affect ROS and COX-2. Therefore, this study contributes to a better understanding of the biological effects of BD-8 and the immunological role of this cardiotonic steroid.

**Keywords:** Immunomodulation. Inflammation. Zymosan. Phagocytosis. Signaling Mechanisms.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Resposta inata aos PAMPs e DAMPs.....  | 21 |
| <b>Figura 2</b> - Detalhamento do processo inflamatório.....                                     | 22 |
| <b>Figura 3</b> - Vias de sinalização intracelular envolvendo o processo inflamatório.....       | 26 |
| <b>Figura 4</b> - Visão geral das vias do ácido araquidônico.....                                | 27 |
| <b>Figura 5</b> - Produção de NO.....  | 28 |
| <b>Figura 6</b> - Estrutura básica dos ECTs.....   | 29 |
| <b>Figura 7</b> - Síntese dos derivados $\gamma$ -benzilideno digoxina.....                      | 31 |
| <b>Figura 8</b> - Estrutura química do BD-8.....   | 32 |
| <b>Figura 9</b> - Estratégia de análise dos dados por citometria de fluxo.....                   | 43 |
| <b>Figura 10</b> - Efeito citotóxico da molécula BD-8 em macrófagos peritoneais murinos.....     | 46 |
| <b>Figura 11</b> - Modulação de óxido nítrico pela molécula BD-8.....                            | 47 |
| <b>Figura 12</b> - A molécula BD-8 modula a produção de citocinas em macrófagos peritoneais..... | 48 |
| <b>Figura 13</b> - Modulação da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais pela BD-8.....   | 49 |
| <b>Figura 14</b> - Modulação do BD-8 nos níveis de iNOS.....                                     | 50 |
| <b>Figura 15</b> - Modulação dos níveis de EROs pela BD-8.....                                   | 51 |
| <b>Figura 16</b> - Modulação mediada pelo BD-8 na fosforilação das moléculas Akt/mTOR.....       | 52 |
| <b>Figura 17</b> - Modulação do BD-8 na fosforilação das MAPKs p38 e ERK.....                    | 53 |
| <b>Figura 18</b> - Modulação da fosforilação do NF- $\kappa$ B p65.....                          | 54 |
| <b>Figura 19</b> - Efeito do BD-8 sobre os níveis de COX-2.....                                  | 55 |
| <b>Figura 20</b> - Efeito do BD-8 sobre os níveis de Src em macrófagos peritoneais murinos.....  | 56 |
| <b>Figura 21</b> - Potencial mecanismo de sinalização do efeito imunomodulador do BD-8.....      | 64 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico  
APCs - Células Apresentadoras de Antígenos  
ATP - Adenosina trifosfato  
Avidin-HRP - Avidina-peroxidase  
COX-1 - Ciclo-oxigenase 1  
COX-2 - Ciclo-oxigenase 2  
DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
E.P.M - Erro Padrão da Média  
ECTs - Esteroides Cardiotônicos  
ELISA - Ensaio imunoenzimático  
eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial  
ERK - Kinase Reguladora de Sinais Extracelulares  
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio  
FLA<sub>2</sub> - Fosfolipase A<sub>2</sub>  
GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos  
IFN- $\gamma$  - interferon-gama  
IL - Interleucina  
IL-12 - Interleucina 12  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta  
IL-6 - Interleucina 6  
iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível  
JNK - Kinase N-terminal c-Jun  
LPS - Lipopolissacarídeos  
MAPKs - Proteínas Kinases Ativadas por Mitógenos  
MHC - Complexo de Histocompatibilidade  
MTT - Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio  
NED - N-naftil-etilenodiamina  
NF- $\kappa$ B - Fator Nuclear kappa-B  
nNOS - Óxido Nítrico Sintase Neuronal  
NO - Óxido Nítrico  
OUA - Ouabaína

PAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

PBS - Salina Tamponada com Fosfato

PC - Fosfatidilcolina

PE - Fosfatidiletanolamina

PI - Fosfatidilinositol

PI<sub>3</sub>K - Fosfoinositídeo 3-quinase

PKB - Proteína quinase B

PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões

Src - quinase Src

TCRs - Receptores de Células T

TGF-β - Fator de Crescimento Transformante Beta

TLR2 - Receptor *toll-like* tipo 2

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alpha

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

ZYM - Zymosan

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.1 Inflamação.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.2 Óxido Nítrico e Óxido Nítrico Sintases.....</b>                               | <b>28</b> |
| <b>2.3 Os ECTs e os seu efeitos imunomodulatórios .....</b>                          | <b>29</b> |
| <b>2.4 Síntese das <math>\gamma</math>-benzilideno digoxina (BDs) .....</b>          | <b>31</b> |
| <b>2.5 Efeitos biológicos das BDs.....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>  | <b>36</b> |
| 2.1 Objetivo geral .....   | 36        |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 36        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>38</b> |
| 4.1 Material.....  | 38        |
| 4.1.1 Animais.....   | 38        |
| 4.1.2 Obtenção do BD-8 .....   | 38        |
| 4.2 Métodos .....  | 38        |
| 4.2.1 Cultura de macrófagos.....   | 38        |
| 4.2.2 Análise da viabilidade celular.....  | 39        |
| 4.2.3 Dosagem de óxido nítrico.....  | 39        |
| 4.2.4 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas .....                         | 40        |
| 4.2.5 Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos .....                         | 41        |
| 4.2.6 Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos por citometria de fluxo ..... | 41        |
| 4.2.7 Avaliação da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) .....           | 41        |
| 4.2.8 Análise da expressão de moléculas intracelulares por citometria de fluxo ..... | 42        |
| 4.2.9 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo .....                    | 42        |
| 4.2.10 Análise estatística .....   | 44        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>   | <b>46</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.1 Efeito do BD-8 na citotoxicidade celular .....  | 46        |
| 5.2 Efeito do BD-8 na produção de óxido nítrico.....  | 46        |
| 5.3 Efeito do BD-8 na produção de citocinas.....  | 47        |
| 5.4 Efeito do BD-8 na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais murinos .....                               | 48        |
| 5.5 Análise dos níveis da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) .....  | 50        |
| 5.6 Análise das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) .....  | 51        |
| 5.7 Análise dos níveis de Akt/mTOR.....   | 51        |
| 5.8 Análise da fosforilação das MAPKs p38 e ERK.....  | 52        |
| 5.9 Avaliação o efeito sobre os fatores de transcrição NF-κB .....  | 53        |
| 5.9 Avaliação o efeito na Ciclo-oxigenase 2.....  | 54        |
| 5.10 Avaliação o efeito na via Src .....  | 55        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>ANEXO A- Certificado de aprovação do projeto emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....</b> | <b>73</b> |
| <b>ANEXO B- Paper submetido na revista Cells, já em processo de revisão .....</b>                                 | <b>74</b> |

# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

Os esteroides cardiotônicos (ECTs) são compostos naturais que apresentam várias atividades biológicas e que possuem a capacidade de interagir e inibir a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Essa bomba é uma proteína responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio através da membrana plasmática, utilizando a hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) como fonte de energia (Faraj *et al.*, 2023).

A secreção de algum desses esteroides (marinobufagina e ouabaína) é estimulada pelo aumento da concentração plasmática de sódio, angiotensina II e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Diversas evidências demonstram que a liberação desses ECTs pode se alterar de acordo com o estado fisiológico ou patológico do organismo. Esses esteroides têm suas produções aumentadas em pacientes hipertensos, pacientes com insuficiência cardíaca e em mulheres grávidas. Dessa forma, essas substâncias endógenas vêm sendo estudadas por suas habilidades em interferir no mecanismo de regulação da homeostasia (Blaustein; Hamlyn, 2024; Daoussis *et al.*, 2020).

Assim como os ECTs exógenos, os endógenos também são capazes de interagir com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Diversos estudos têm demonstrado que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase não atua apenas no equilíbrio iônico celular, mas também como um importante transdutor de sinal, modulando outras atividades celulares, como secreção de mediadores de proliferação celular e diferenciação (Xu *et al.*, 2023).

Baixas concentrações de ouabaína, sem a capacidade para inibir o transporte iônico de sódio e potássio, foram capazes de promover alterações conformacionais na bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Esse processo, por sua vez, favoreceu a interação da bomba com a proteína quinase Src e, dessa forma, resultou na ativação de vias de sinalização que regulam processos como: crescimento e proliferação celular (Rognant *et al.*, 2022); apoptose (Hafner; Schmiech; Lang, 2021) e expressão de vários genes, tais como, c-fos e c-jun (Kravtsova *et al.*, 2019).

Além dos efeitos cardiovasculares, o uso dos ECTs vem sendo estudado no tratamento de diversas patologias, como o câncer, doenças neurodegenerativas, alergias, fibroses, entre outros (El-Seedi *et al.*, 2022). Numerosos estudos têm confirmado a ação antiproliferativa e efeitos apoptóticos desses compostos em vários tipos de neoplasias, como câncer de mama (Barbalata *et al.*, 2020) e pulmão (Mijatovic *et al.*, 2006); melanoma (Newman *et al.*, 2006), leucemia (Masuda *et al.*, 1995) e neuroblastoma (Kulikov *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudos sugerem que os ECTs desempenham também atividade imunomoduladora (Takada *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2005).

O sistema imunológico é constituído por órgãos, células e moléculas que são capazes de manter ou restabelecer a homeostasia do organismo (Wilson; Trumpp, 2006). Esse sistema, entre várias outras funções, desempenha um papel fundamental no reconhecimento rápido e eliminação de microrganismos patogênicos por diferentes processos, como a indução da inflamação. A inflamação é uma resposta fisiológica que pode ser desencadeada quando ocorre o reconhecimento de um agente lesivo, infeccioso ou não. Nesse contexto, o sistema imune utiliza receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para reconhecer os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e ao dano celular (DAMPs). Esses receptores, quando ativados, podem desencadear uma cascata de sinalização intracelular que favorece o desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda (Janeway; Medzhitov, 2002).

Durante o processo inflamatório agudo, fenômenos vasculares e celulares levam ao surgimento dos quatro sinais cardinais da inflamação: dor, calor, rubor e edema, podendo ser acompanhados ou não de perda da função do tecido ou órgão afetado. Sabe-se que os sinais cardinais da inflamação resultam da vasodilatação (calor e rubor); da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (dor); do acúmulo de leucócitos e do aumento do fluido intersticial (edema) e, eventualmente, inibição do reflexo muscular e rompimento da estrutura do tecido (perda da função) (Aller *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2004). Esse processo é fisiologicamente importante tanto na defesa do hospedeiro, como na reparação tecidual, no entanto, se esse processo for persistente, pode evoluir para um processo crônico com possível dano tecidual. Dessa forma, a regulação da resposta inflamatória, seja pela inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios e/ou pela estimulação de mediadores anti-inflamatórios, consiste em um evento fundamental na homeostasia do organismo (Sherwood; Toliver-kinsky, 2004).

Diante disso, várias células participam da resposta imunológica, dentre elas os macrófagos. Essas são células que podem ser originadas a partir dos monócitos sanguíneos, e também há uma população de macrófagos residentes, que recebem denominações específicas dependendo do tipo de tecido onde são encontrados (Gordon, 1995). Os que residem nos tecidos produzem baixos níveis de mediadores inflamatórios, entretanto, quando expostos a sinais ativadores como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e/ou produtos fúngicos, como o zymosan (ZYM), se tornam ativados e com capacidade de produzir altos níveis de mediadores da inflamação (Fujiwara; Kobayashi, 2005). Os macrófagos são essenciais para o processo inflamatório, tendo como funções a fagocitose, a apresentação de antígenos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-1 $\beta$ , assim como é eficaz na liberação de espécies reativas de

oxigênio e nitrogênio, desempenhando papéis fundamentais na iniciação, manutenção e resolução do processo inflamatório (Willoughby *et al.*, 2000).

A molécula em estudo, o BD-8, é um ECT, derivado da digoxina. O BD-8, faz parte de um copilado de derivados, oriundos da BD-21, uma molécula sintetizada a partir da digoxina. A BD-21 é um derivado sintético da digoxina que apresenta em sua estrutura um grupo estireno adicional no carbono C21 do anel da lactona, na qual possui diversos efeitos biológicos já descritos na literatura, como inibição de edema de pata em camundongos e redução de células inflamatórias e a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além de reduzir os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Pessôa *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2018). No entanto, não se conhece o papel da BD-8 no sistema imunológico. Com isso, buscou-se investigar os efeitos imunomoduladores da molécula BD-8, dentro de um contexto *in vitro*.

# FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



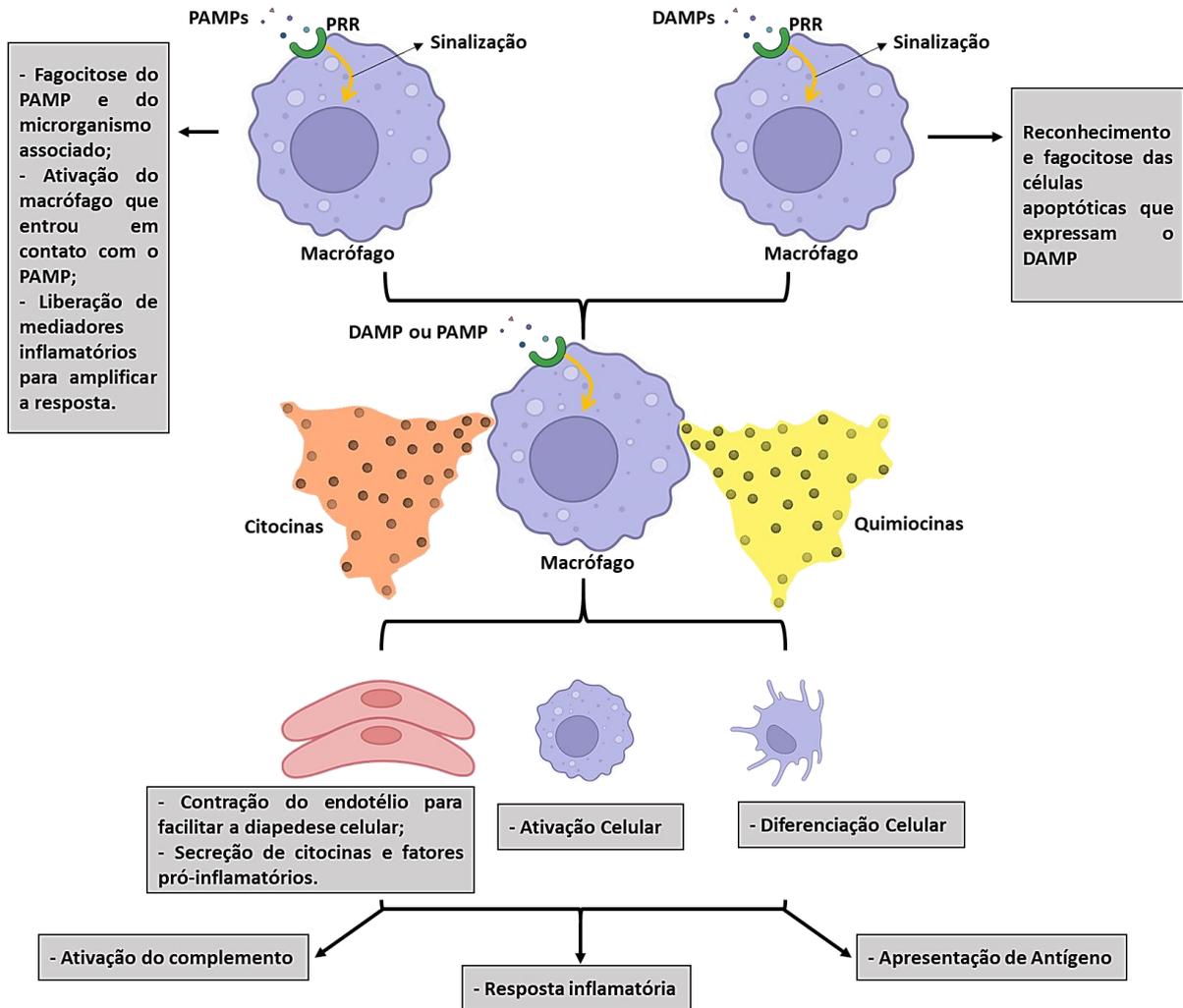
## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Inflamação

O processo inflamatório corresponde à ativação do sistema imunológico e é capaz de reestabelecer a homeostase do organismo, tecidos e órgãos. Dentro desse contexto, fornece proteção contra agentes do ambiente, reforçando a defesa do organismo e a integridade funcional e estrutural de tecidos e órgãos (Medzhitov, 2021). Porém, quando ocorre uma desregulação deste processo inflamatório, há uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e da migração de células, o que pode ocasionar a perda de função definitiva do local inflamado (Megha *et al.*, 2021).

A resposta inflamatória inicia-se com a ativação do sistema imune inato, que reconhece Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs). Quando reconhecido o PAMP ou DAMP pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), por intermédio do seu Receptor de Reconhecimento Padrão (PRR), ocorre a ativação da resposta inata mediada principalmente por macrófagos e neutrófilos (Figura 1) (Ma; Jiang; Zhou, 2024; Masumoto *et al.*, 2021).

**Figura 1.** Resposta inata aos PAMPs e DAMPs



**Fonte:** Próprio autor, 2024. Esquema exemplificando como ocorre a resposta inata frente a um reconhecimento de um agente infeccioso ou a algum dano tecidual. Macrófagos reconhecem o PAMP ou DAMP pela interação com o PRR, codificam o padrão identificado geram uma sinalização para produção de citocinas e quimiocinas, que recrutará mais células para conter a infecção por quimiotaxia, levando a ativação e diferenciação celular, contração endotelial para facilitar a passagem de células para o local lesionado/infectado, ativando o sistema complemento, gerando uma resposta inflamatória ou uma apresentação de antígeno.

A inflamação pode ser definida como uma variável crítica para diversas doenças, a exemplo das doenças infecciosas. A resposta inflamatória pode ser aumentada pelo contínuo acúmulo e ativação de componentes celulares imunológicos, levando a uma resposta inflamatória exacerbada e descontrolada, causando ruptura de tecidos e aumento da produção de tecido fibroso (Kolb, 2022).

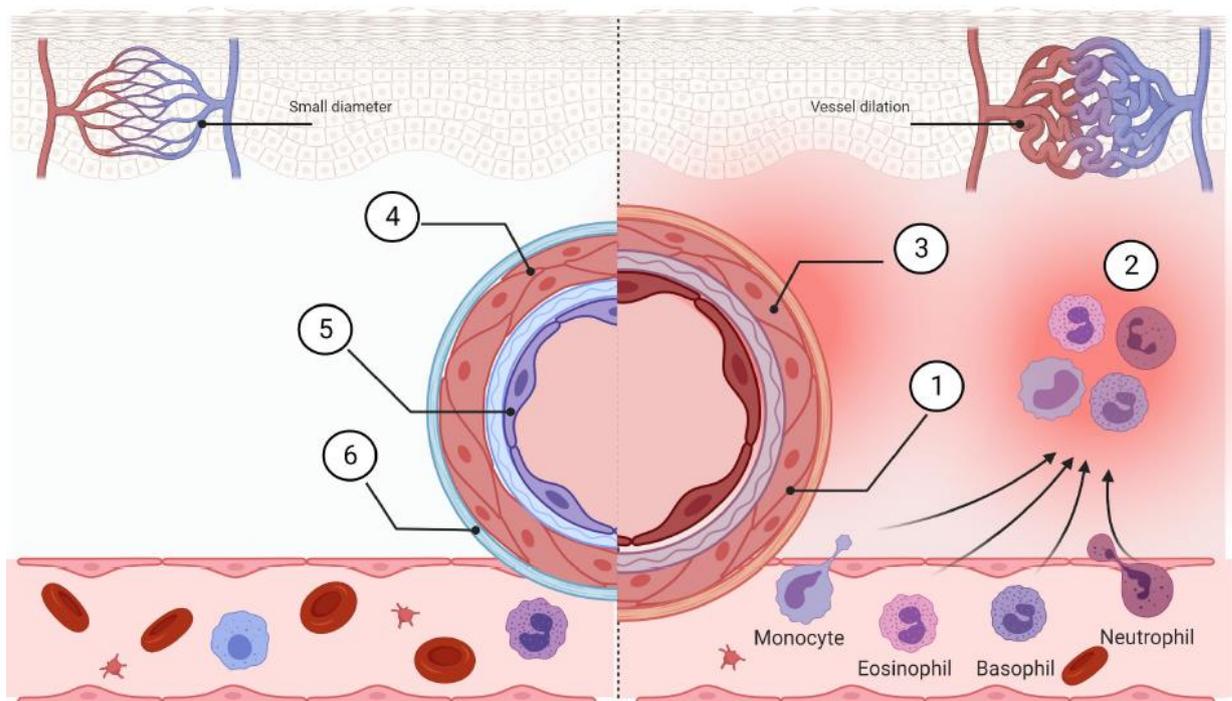
O processo inflamatório engloba a liberação de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, que gera uma espécie de processo compensatório, como as citocinas,

desencadeando a dor, calor rubor, edema e possivelmente perda de função do tecido ou órgão, compondo assim os cinco sinais cardinais da inflamação (Kolb, 2022).

Os sinais cardinais da inflamação são resultado coletivo da liberação das citocinas, quimiocinas, fragmentos do sistema complemento e aminas vasoativas pelos macrófagos e mastócitos após o contato com o patógeno. Todos os mediadores inflamatórios corroboram para o recrutamento de neutrófilos e das proteínas plasmáticas para o foco da infecção e local em processo inicial de inflamação, pois, por quimiotaxia ocorre esse recrutamento de neutrófilos da corrente sanguínea (Soares *et al.*, 2023)

Essas características constituem o resultado coletivo da liberação de citocinas, quimiocinas, fragmentos do complemento e aminas vasoativas, liberadas pelos macrófagos e mastócitos após contato inicial com o antígeno. Todos os mediadores inflamatórios recrutam neutrófilos e proteínas plasmáticas para o local inflamado, induzindo vasodilatação dos capilares e vasos sanguíneos localizados próximos do foco de infecção, favorecendo a migração neutrofílica e monocítica por diapedese para o local da inflamação, por quimiotaxia (Figura 2) (Kolb, 2022; Strzelec *et al.*, 2023).

**Figura 2** - Detalhamento do processo inflamatório.



**Fonte:** Strzelec *et al.*, 2023. Comparação de tecido normal e tecido inflamado. Moléculas pró-inflamatórias, como prostaglandinas, histamina, bradicinina e NO, causam vasodilatação no tecido inflamado, aumentando o fluxo sanguíneo (1), permitindo a migração de células para o local inflamado, pelo aumento da permeabilidade vascular, oriunda da vasodilatação (2). Localmente, ocorre aumento da sensibilidade e dor (3). A entrada no estado de tecido

normal ocorre pela mudança de perfil celular, como no caso de macrófagos de perfil M2, e moléculas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), diminuindo permeabilidade (4) e fenótipo de células endoteliais (5). Com isso, ajuda a inibir o extravasamento de células imunológicas (6).

O processo de migração de leucócitos do endotélio dos vasos sanguíneos para o local da inflamação, é denominado de diapedese. Esse processo inclui a expressão de moléculas de adesão, expressas tanto pelos leucócitos em processo de migração, como pelas células endoteliais. Ativado o processo inflamatório, ocorre a migração de neutrófilos, como mencionado anteriormente, com subsequente migração de monócitos. Do mesmo modo, há migração posterior de linfócitos oriundos de tecidos linfoides. Essa migração de linfócitos do sistema linfático, leva ao favorecimento da interação entre o linfócito e o antígeno, bem como promove a disseminação de células efectoras (Filippi, 2019; Grönloh; Arts; Buul, 2021).

A migração em grande quantidade de neutrófilos para o sítio inflamado, pode levar a lesões teciduais, liberando mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e citocinas, como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), Fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ). As citocinas presentes no local inflamado, induzem o fim da atividade neutrofílica e o reconhecimento dos corpos apoptóticos pelos macrófagos, que darão continuidade a resposta inflamatória (Reglero-real *et al.*, 2021).

Uma vez ativada, a resposta inflamatória se desenvolve rapidamente. A vasodilatação ocorre em segundos e a migração de leucócitos pode ocorrer em horas ou minutos logo após ativação do processo inflamatório, liberando componentes do sistema imunológico, como anticorpos, proteínas do sistema complemento, neutrófilos e monócitos, no sítio inflamado (Cavaillon *et al.*, 2021).

As respostas celulares no processo inflamatório ocorrem por uma diversidade de cascatas de sinalizações celulares, que comandam todas as atividades das células presentes no sítio de inflamação. A maioria dos receptores localizados na superfície celular, usam proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como é o caso da p38, da cinase reguladora de sinais extracelulares 1/2 (ERK 1/2) e a cinase N-terminal c-Jun (JNK), bem como faz uso de fatores nucleares, como o Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), envolvida no mecanismo de cascata de transdução de sinalização, aumentando a transcrição de fatores pró-inflamatórios, como no caso da IL-1 $\beta$  (Yeong *et al.*, 2022). As vias de sinalização da ERK 1/2, regulam a expressão de citocinas, envolvendo mecanismos transcricionais e pós-transcricionais em macrófagos (Groft *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2023). Já na via da JNK, a mesma possui três isoformas, a JNK 1, JNK 2 e JNK 3. As isoformas JNK 1 e 2 são amplamente expressas em tecidos, enquanto a JNK 3

é restrita a tecidos neuronais, testículos e os miócitos cardíacos. Os macrófagos, quando ativados, expressam JNK 1 e 2, possuindo assim um papel pró-inflamatório. Além das ERK 1 e 2 e as JNKs, a p38 exerce um papel inflamatório, além de estar envolvida em mecanismos de retroalimentação, regulando a resposta inflamatória (Westenberger *et al.*, 2021).

O NF- $\kappa$ B é formado pelas subunidades p50 e p65, ativada por estresse celular, dano tecidual, citocinas e quaisquer desordem em determinado tecido. Esse fator está relacionado aos processos inflamatórios, regulando o processo de diapedese de leucócitos para o local da inflamação (Chen *et al.*, 2023), bem como a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório, como os genes que codificam a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e TNF- $\alpha$ . O NF- $\kappa$ B é ativado dentro do processo inflamatório na presença de sinais externos, embora as vias de sinalização envolvendo o NF- $\kappa$ B sejam altamente controladas em condições basais. O processo de ativação do NF- $\kappa$ B envolve uma cascata de processos, primeiramente ocorre o reconhecimento do sinal, como infecções bacterianas e fúngicas, pelos PRRs, como no caso dos receptores do tipo *toll*, além de receptores com domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (Nagahawatta *et al.*, 2022).

Além das moléculas e vias citadas, existe a PI<sub>3</sub>K (Fosfoinosítideo 3-quinase)/Akt/mTOR tem sido entendida como uma via de sobrevivência em células eucarióticas, onde a serina/treonina quinase Akt é uma via chave dentro de uma resposta inflamatória. Conhecidas também como proteína quinase B (PKB), as Akts são uma família de serinatreonina quinases, as quais estão envolvidas em muitos processos fisiológicos do organismo que são essenciais para a homeostase. As células eucarióticas expressam de forma intracelular três isoformas de Akt, que são extremamente relacionadas: a AKT1 (PKBa), a Akt2 (PKBb) e a Akt3 (PKBg), sendo todas codificadas por genes distintos. Em especial a Akt1 é essencial para a inflamação aguda, exercendo funções como a regulação da permeabilidade vascular, controlando a diapedese. O processo de ativação da Akt depende da fosfoinosítide-3,4,5-P3, na qual gera o produto da fosfoinosítida-3-quinase (PI<sub>3</sub>K). Quando ocorre a interação da fosfoinosítide-3,4,5-P3 com o domínio plestrina (PH), acaba promovendo a translocação para a membrana plasmática, fosforilando em dois locais: Thr308 por PDK1 e Ser473, pelo complexo de proteínas contendo mTOR, SIN1, Rictor e Gbl. Em suma, apenas com a fosforilação completa em Ser473 e Thr 308 pode exibir suas funções mencionadas anteriormente (Reyes-Gordillo *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2019; Palumbo *et al.*, 2021).

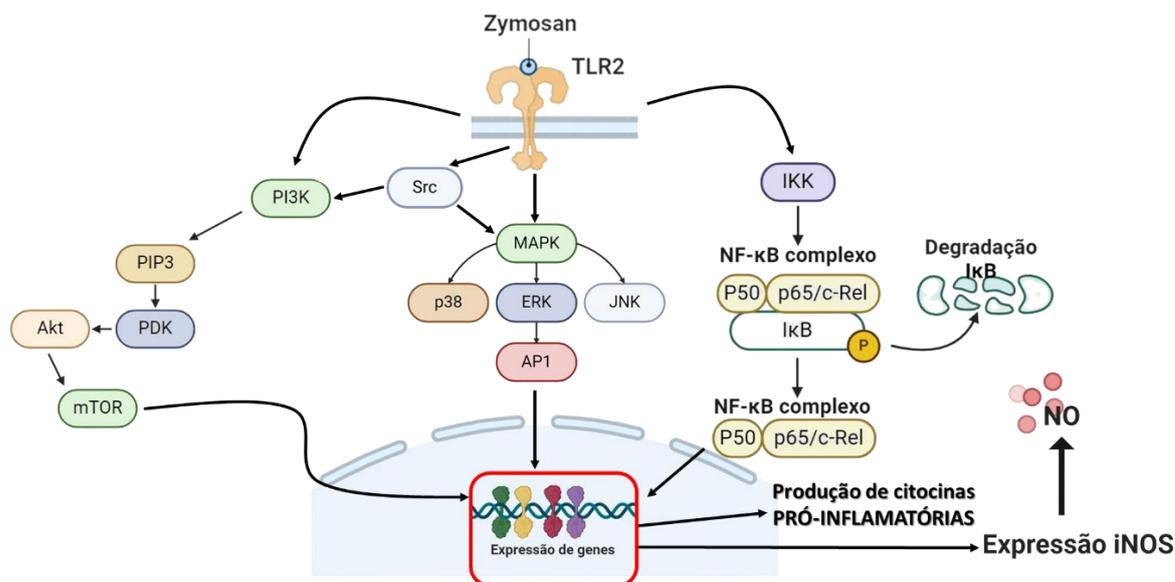
Em estudo desenvolvido por Bao *et al.* (2020), foi demonstrado que a via de sinalização PI<sub>3</sub>K/Akt/mTOR/RhoA afeta a capacidade fagocitária dos macrófagos, modulando as alterações do citoesqueleto no processo de fagocitose. Foi demonstrado pelos pesquisadores

que o mTOR diminuiu a capacidade fagocítica dos macrófagos, e bloqueou o rearranjo adequado do citoesqueleto para a fagocitose, podendo assim, trazer uma resolubilidade melhor para um processo inflamatório (Figura 3).

As tirosinas quinases não receptoras intracelulares da família Src, também desempenham um papel importante dentro do processo inflamatório e de distúrbios imunomediados (Szilveszter; Németh; Mócsai, 2019). As quinases da família Src, além do envolvimento no processo inflamatório, desempenham diversas outras funções na maquinaria celular, como a proliferação celular, diferenciação, apoptose, migração celular, envolvidas na sinalização de integrinas e lectinas do tipo C (Szilveszter; Németh; Mócsai, 2019), e no metabolismo celular (Ortiz *et al.*, 2021). A Src também pode ativar mecanismos de sinalização intracelular por meio da *small G-protein* Ras (Figura 3), que com o processo de ativação pela ligação ao trifosfato de guanosina (GTP), a Ras desencadeia a fosforilação via quinases RAF, MEK e ERK, levando a transcrição de fatores que promovem a ativação de genes envolvidos na proliferação. A Ras pode também entrar na via da PI<sub>3</sub>K, ativando-a (Figura 3B) (Zhao; Luo, 2022).

A Src pode sinalizar para ativação tanto da via da Akt/mTOR, como pela via das MAPKs (Figura 3). A ativação de ambas as vias, leva ao recrutamento de proteínas intracelulares, como a p38/ERK/JNK e Akt/mTOR, que culmina na ativação e/ou aumento da expressão de genes responsáveis de produzir mediadores do processo inflamatório, como a produção de citocinas e enzimas, como a IL-1 $\beta$  e a enzima iNOS (Araujo *et al.*, 2019).

**Figura 3** - Vias de sinalização intracelular envolvendo o processo inflamatório.



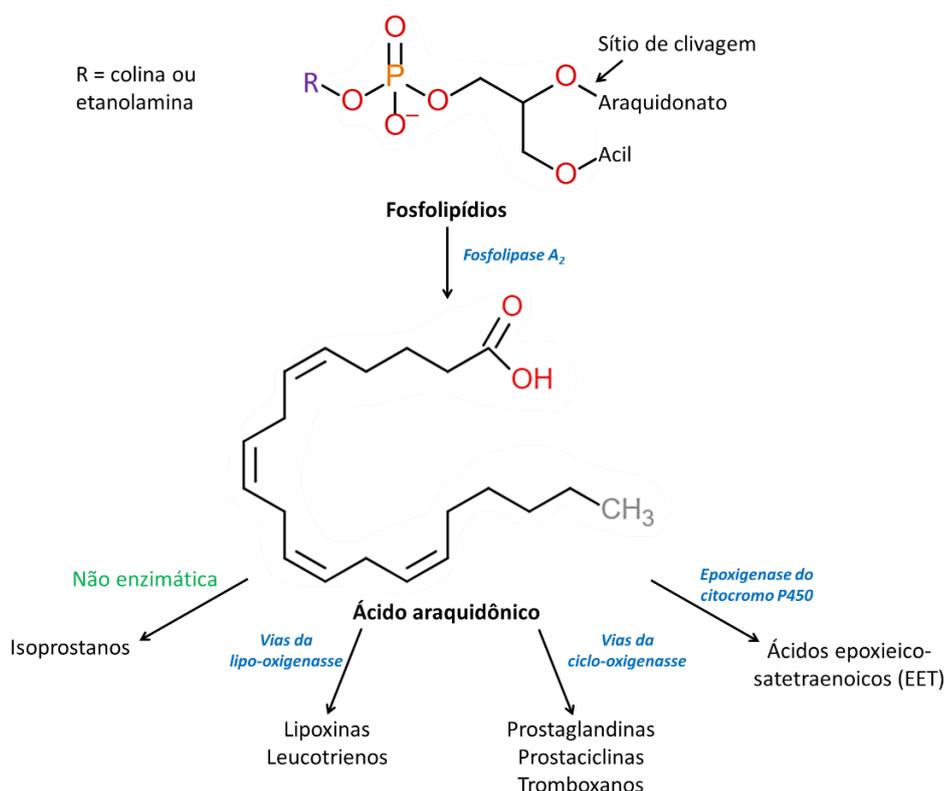
**Fonte:** Próprio autor, 2014. A ligação de estímulos inflamatórios em seus receptores, ativa a célula, que irá desempenhar seu papel dentro de um contexto de inflamação. Como exemplo, tem-se a ligação de partículas de zymosan em seu receptor do tipo toll-like 2 (TLR2), que levará a ativação de vias envolvidas no processo inflamatório, como a via da PI3K, que levará a ativação de Akt/mTOR e do NF- $\kappa$ B, bem como a via das MAPKs, que são a p38, ERK e JNK. Além disso, pode ativar também a via da Src, que ela pode levar a ativação da via das MAPKs e da PI3K. A ativação dessas vias, culminam na expressão de genes, que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como pode levar a produção de enzimas, como é o caso da iNOS, que produzirá o óxido nítrico.

Ainda no contexto da inflamação, existe a cascata do ácido araquidônico, importante molécula que acentua esse processo. O ácido araquidônico é o precursor da maioria dos eicosanoides, não existindo como um ácido graxo livre, obtido assim por um processo de esterificação dos fosfolipídios de membrana, predominantemente fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI) (Figura 3). Esse processo de esterificação ocorre pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), na qual existe em duas isoformas, a fosfolipase A<sub>2</sub> secretora (FLA<sub>2s</sub>), ligadas a membrana, e fosfolipases A<sub>2</sub> citoplasmáticas (FLA<sub>2c</sub>) solúveis. As isoformas da fosfolipase A<sub>2</sub> relevantes para a inflamação são estimuladas por citocinas (como TNF- $\alpha$ , Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )). O ácido araquidônico é convertido pelas enzimas ciclo-oxigenases, lipooxigenases ou epoxigenases do citocromo, sendo a enzima envolvida que vai determinar a classe de eicosanoide produzido (Figura 4) (Yu; Lao; Zheng, 2016; Goradel *et al.*, 2019)

As ciclo-oxigenases levam a formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Nos seres humanos, são encontradas duas formas de ciclo-oxigenases, a ciclo-

oxigenase 1 (COX-1) e a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), diferindo quanto a localização celular, perfil de regulação, expressão tecidual e exigência de substrato. A COX-1 é expressa de forma constitutiva, atuando em atividades fisiológicas e de manutenção, como a homeostasia vascular, manutenção do fluxo sanguíneo renal e gastrointestinal, função renal, proliferação da mucosa intestinal e como antitrombogênica. Já a COX-2, está envolvida dentro dos processos inflamatórios, febre, dor, transdução de estímulos dolorosos na medula espinal, mitogênese, adaptação renal ao estresse, ovulação, placentogênese e contrações uterinas no trabalho de parto (Nagaraju; El-Rayes, 2019; Janarthanan; Adalarasan, 2019).

**Figura 4** - Visão geral das vias do ácido araquidônico.



**Fonte:** Adaptado de Golan, 2014. A fosfolipase A<sub>2</sub> atua nos fosfolípídios fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI) para liberar ácido araquidônico. Além disso, o ácido araquidônico insaturado é usado como substrato para a conversão de ciclooxigenase, lipoxigenase e epoxigenase. A via da ciclo-oxigenase produz prostaglandinas, prostacilinas e tromboxanos. Lipoxigenase, leucotrienos e lipoxinas. A via da epoxigenase produz ácido epoxieicosatetraenóico (EET). A peroxidação não enzimática do ácido araquidônico produz isoprostano. A fosfolipase A<sub>2</sub> cliva a ligação éster (“local de clivagem”) indicada pela seta, liberando ácido araquidônico.

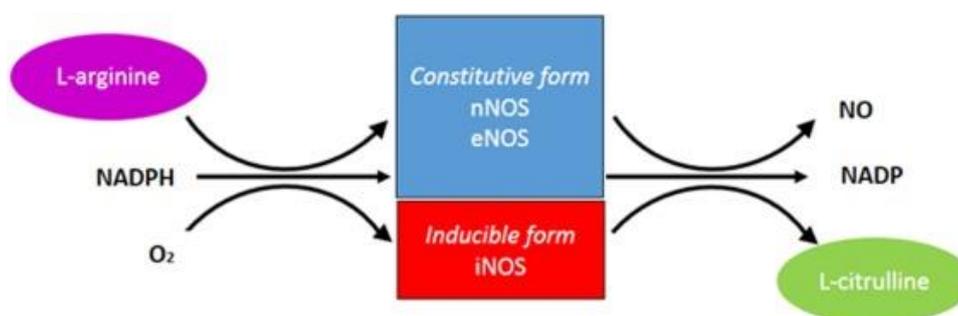
## 2.2 Óxido Nítrico e Óxido Nítrico Sintases

O NO é uma molécula na sua forma gasosa, solúvel em água e passa livremente através das membranas celulares. O NO endógeno é um importante efetor e molécula de transdução de sinais em vários processos celulares fisiológicos, como a vasodilatação, respostas imunes, neurotransmissão, apoptose, reprodução, regulação da transcrição gênica, tradução de mRNAs e modificações pós-traducionais de proteínas. Vale salientar também, que essas ações fisiológicas ocorrem em concentrações muito baixas, variando de pico-nanomolar, já as concentrações mais elevadas de NO, levam a um processo de estresse oxidativo (Andrabi *et al.*, 2023).

O NO é produzido de forma endógena, regulada pela oxidação do grupo L-arginina, e pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), encontradas de forma constitutiva, representadas pelo óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase neural (nNOS), e na forma induzível, sendo a óxido nítrico sintase induzível iNOS (Ghasemi, 2019).

A síntese do NO, ocorre pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina. Esse processo de síntese é mediado pela família de isoformas, as NOS, na qual são semelhantes pelo fato de todas produzirem NO e outras moléculas biológicas, como a L-citrulina, através da L-arginina e outros cofatores, como a Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina na sua forma reduzida (NADPH) (Figura 5).

**Figura 5** - Produção de NO.



**Fonte:** Lind *et al.*, 2017. **Legenda:** A produção de NO e L-citrulina são catalisadas pelas isoformas de NOS e seus outros cofatores associados.

O NO, dentro do contexto dos processos inflamatórios, funciona como uma molécula pró-inflamatória, como também anti-inflamatória, e seus níveis e locais de liberação são regulados rigorosamente. Durante o processo inflamatório, monócitos se deslocam para o sítio inflamado, se diferenciando, devido a liberação de citocinas, em macrófagos, fagocitando células lesionadas e/ou agentes patogênicos. As citocinas pró-inflamatórias liberadas aumentam

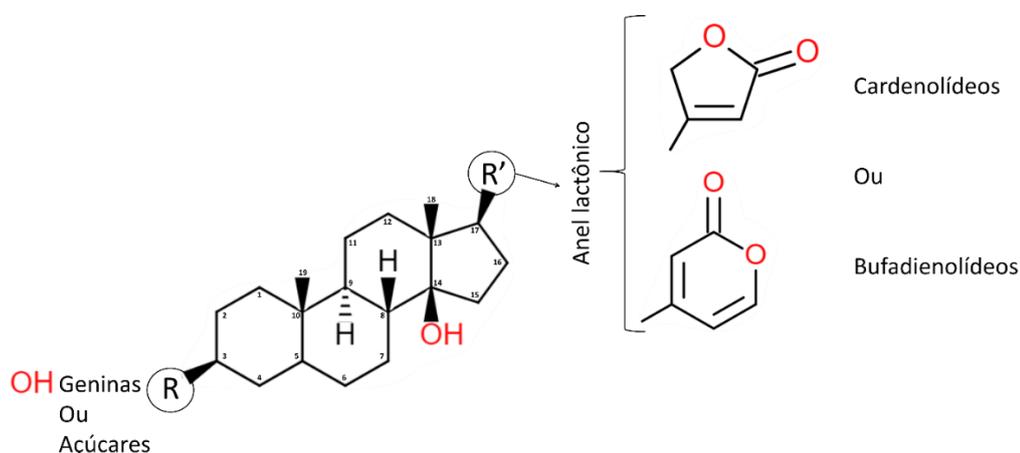
a expressão da enzima iNOS em macrófagos, neutrófilos e granulócitos, promovendo a grande liberação de NO no sítio inflamado. Dependendo do local e do tipo da célula, a produção de NO favorece a inflamação ou a resolução da mesma. Baixos níveis de eNOS estimulam moléculas pró-inflamatórias, como a COX-2 e NF- $\kappa$ B. Níveis elevados de eNOS, reduzem o estresse oxidativo, a inflamação, enquanto a iNOS induz o estresse e o processo inflamatório (Ghasemi, 2019; Andrabi *et al.*, 2023).

Além disso, o NO e as demais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, possuem papel importante no contexto fisiológico do hospedeiro. Esses mediadores possuem propriedades antimicrobianas, participando diretamente do processo inflamatório, pois estão envolvidos em dano tecidual/celular e ativação de diversas vias inflamatórias (Lind *et al.*, 2017).

### 2.3 Os ECTs e os seus efeitos imunomodulatórios

Os ECTs apresentam como estrutura geral um núcleo esteroidal conservado, com um anel lactônico localizado na posição C17 $\beta$ , podendo conter, ou não, uma porção glicosídica ou geninas, contendo uma ou mais unidades de açúcares na posição C13 $\beta$ . De forma classificatória, os esteroides são divididos em dois grupos, os cardenolídeos, contendo um anel lactônico de cinco membros, e os bufadienolídeos, com um anel lactônico de seis membros (Figura 6) (Blaustein; Hamlyn, 2024).

**Figura 6** - Estrutura básica dos ECTs.



**Fonte:** Adaptado de Mijatovic; Kiss, 2013. **Legenda:** Núcleo básico de um esteroide, o ciclopentanoperidrofenantreno, e as adições para formação de um ECT. Na sua posição C17 $\beta$ , onde se encontra o R', são adicionados anéis lactônicos de cinco ou seis membros, dando a classificação de um ECT, podendo ser cardenolídeo ou bufadienolídeo, respectivamente. Adicionado na posição C13 $\beta$ , moléculas glicosiladas ou geninas. Tais modificações nessas posições, levam a formação de ECT, como a OUA e a marinobufagenina.

Vários estudos do nosso grupo já demonstraram o efeito dos esteróides cardiotônicos na inflamação. Observou-se que a ouabaína (OUA), em um modelo de peritonite induzida por zymosan, resultou em uma redução no número total de células e nas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Leite *et al.*, 2015). Além disso, estudos demonstraram que a OUA reduz a ativação de MAPK p38, CD18 e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Cavalcante-Silva *et al.*, 2021; Cavalcante-Silva *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2015). Além disso, a ouabaína apresentou atividade anti-inflamatória, reduzindo o edema de pata de rato induzido por carragenina, composto 48/80 e zymosan, e inibindo a migração celular em HAS induzida por concanavalina A (Vasconcelos *et al.*, 2011).

Outro estudo do grupo mostrou que o tratamento com ouabaína reduz a inflamação alérgica pulmonar, onde este esteroide inibe a migração celular induzida pela ovabumina, reduz os linfócitos CD3+, reduz os níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  e as alarminas IL-33 e TSLP. Além disso, esse esteroide reduziu o nível sérico de IgE específica para ovalbumina no lavado broncoalveolar e a ativação da p38 MAPK (Galvão *et al.*, 2017; Galvão *et al.*, 2022). Além disso, no modelo de infecção com Zika vírus, a ouabaína demonstrou atividade antiviral contra esse vírus (Carvalho *et al.*, 2022) e foi capaz de modular a citocina IL-6 (dados do grupo ainda não publicados).

Além da ouabaína, também foi observada atividade anti-inflamatória de outro ECT, a marinobufagina, na redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  *in vitro* e redução da migração *in vivo* de células polimorfonucleares (PMNs) e citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 na cavidade peritoneal (Carvalho *et al.*, 2019). Adicionalmente, um outro ECT, a digoxina, também apresenta efeito imunomodulador, pela capacidade em inibir as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 em células mononucleares do sangue periférico estimuladas por LPS (Ihenetu *et al.*, 2008).

Vários estudos já demonstraram os efeitos dos esteróides cardiotônicos na neuroinflamação. Em um modelo de doença de Alzheimer, a digoxina reduziu os níveis cerebrais de TNF- $\alpha$  e a morte neuronal, e a marinobufagina reduziu os níveis da proteína precursora amilóide e IL-6 (Erdogan *et al.*, 2022; Fox *et al.*, 2022). Além disso, outros estudos demonstraram que a ouabaína também tem papel na neuroinflamação, no qual *in vivo* reduz a ativação e posterior translocação de NF- $\kappa$ B, levando à redução na expressão de iNOS e IL-1 $\beta$  (Kinoshita *et al.*, 2014). ) e *in vitro* reduz a liberação de IL-1 $\beta$  em astrócitos estimulados por LPS (Forshammar *et al.*, 2011).

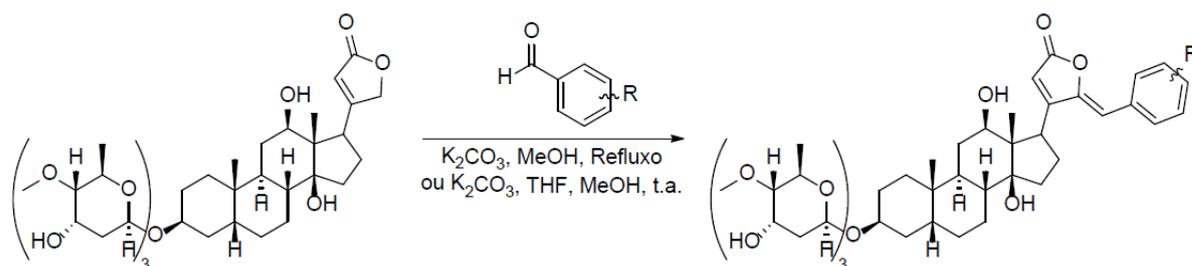
## 2.4 Síntese das $\gamma$ -benzilideno digoxina (BDs)

A semi-síntese dos esteroides foi realizada a partir da digoxina, todos com diversos grupos substituintes ao nível do anel lactônico. Os derivados foram divididos em três principais grupos para prosseguimento das análises (Figura 7B): o grupo modelo, o grupo com substituinte éter e o grupo com substituintes eletronegativos não oxigenados. O grupo com substituinte éter ainda foi subdividido em C1, C4 e C6 de acordo com o tamanho da cadeia carbônica dos substituintes.

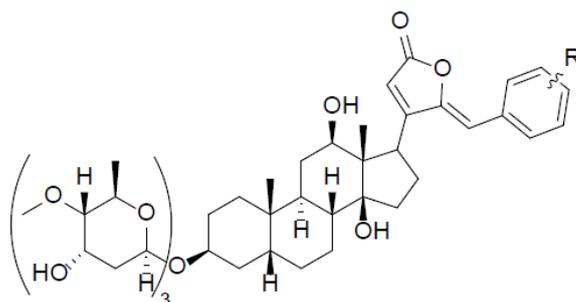
Aldeído (1,8 mmol), digoxina (0,469g, 0,6 mmol),  $K_2CO_3$  anidro ( 0,249g, 1,8 mmol) foram adicionados a 60 ml de metanol num balão de fundo redondo . Após agitação durante 6 horas a  $70^\circ C$ , o solvente foi evaporado num evaporador rotativo. O produto bruto foi diluído com 20 ml de água e extraído com acetato de etila quente (3 x 30 ml). A camada orgânica foi lavada com salmoura, seca sobre  $Na_2SO_4$  anidro e concentrada sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica ( $CH_2Cl_2$  / MeOH 11 :1). Após purificação, o produto puro foi diluído em THF, precipitado com hexano e concentrado sob pressão reduzida para dar os derivados  $\gamma$ -benzilideno digoxina, dentre eles, o BD-8 (Figura 7A).

**Figura 7** - Síntese dos derivados  $\gamma$ -benzilideno digoxina.

**A**



**B**

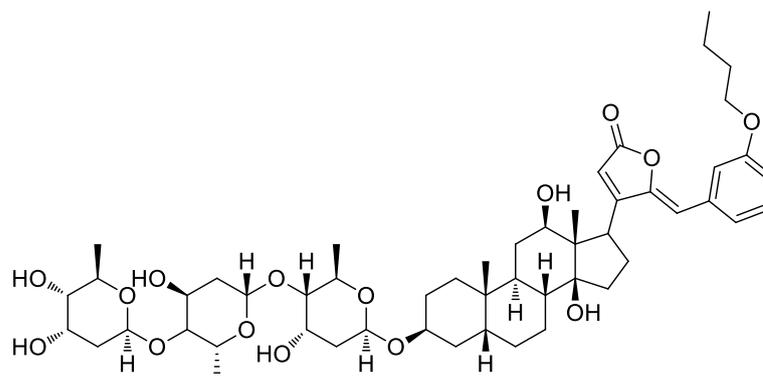


| Template    | Ether substituents               | Non-oxygen electronegative substituents     |
|-------------|----------------------------------|---|
| 21-BD R = H | (C1) BD-1 R = 4-OCH <sub>3</sub> | BD-2 R = 2,3-diCl                           |
|             | (C4) BD-7 R = 4-OBu, 3-OMe       | BD-3 R = 4-F                                |
|             | BD-8 R = 3-OBu                   | BD-4 R = 4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
|             | BD-9 R = 4-OBu                   | BD-5 R = 3-NO <sub>2</sub>                  |
|             | BD-10 R = 2-OBu                  |   |
|             | (C6) BD-13 R = 4-OMe             |   |
|             | BD-14 R = 3-OMe                  |   |
|             | BD-15 R = 4-OMe, 3-OMe           |   |
|             | BD-16 R = 2-OMe                  |   |

**Fonte:** Pessôa *et al.*, 2018. **Legenda:** A - Processamento geral para síntese de derivados da digoxina. B - Divisão dos grupos e subgrupos conforme a estrutura de cada derivado. Grupo Modelo, com a BD-21. Substituintes Éter, com seus subgrupos C1, C4 e C6, e os substituintes eletronegativos não oxigenados.

O BD-8 entra dentro do grupo de substituintes éter e do subgrupo C4, sendo adicionado um radical -oxibutano no terceiro carbono do anel aromático adicionado (-3-OBu) (Figura 7B e Figura 8).

**Figura 8** - Estrutura química do BD-8



Chemical Formula: C<sub>52</sub>H<sub>76</sub>O<sub>15</sub>  
Molecular Weight: 941,151

**Fonte:** Pessôa *et al.*, 2018.

## 2.5 Efeitos biológicos das BDs

Os ECTs sintetizados por nossos colaboradores foram testados quanto à sua habilidade de modular as isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase transfectadas em células da linhagem Sf9 através do sistema de expressão baculovírus. Foi observado que alguns compostos foram capazes de modular a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com boa seletividade para uma isoforma específica, tanto estimulando quanto inibindo a atividade da enzima. Além disso, foram realizadas análises *in silico*, especificamente a ancoragem molecular, de compostos

selecionados no intuito de explicar essas modulações, procurando por interações nos sítios de ligação dos ECTs. A BD-4, BD-8 e BD-13 demonstraram uma alta seletividade para a isoforma  $\alpha_2$ , estimulando sua atividade, enquanto a BD-14 e BD-15 mostraram boa seletividade para a isoforma  $\alpha_3$ , também estimulando sua atividade. Assim, foi demonstrado uma classe de ECTs capazes de modular a atividade de isoformas específicas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, com possibilidades de superar os efeitos colaterais e tóxicos, no âmbito das aplicações clínicas, provocados pela ligação dos ECTs em várias isoformas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Pessoa *et al.*, 2018). Além disso, esses compostos foram testados para verificar sua atividade tumoral e apresentaram efeitos tóxicos para as células tumorais que não foram relacionados com os seus efeitos inibitórios da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ou da modulação da sua expressão, demonstrando que os efeitos tóxicos clássicos dos ECTs não estão envolvidos para os derivados  $\gamma$ -benzilidenos da digoxina (Alves *et al.*, 2015).

Dentre os compostos mais estudados a 21-benzilideno digoxina (BD-21) é a que possui a maior gama de estudos realizados. A BD-21 é um derivado sintético da digoxina que apresenta em sua estrutura um grupo estireno adicional no carbono C21 do anel da lactona. A adição do grupo estireno no anel lactônico, fornece a BD-21 características diferentes das observadas para outros ECTs, provavelmente porque o grupo aromático adicional pode promover um impedimento estérico no sítio de ligação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Por essa razão, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase possui uma menor afinidade por BD-21, em relação a digoxina e ouabaína. Foi demonstrado que além da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, a BD-21 pode ter outros alvos celulares como Pdr5p, uma proteína da família de transportadores ABC de *Saccharomyces cerevisiae*, que teve sua atividade inibida por BD-21 e não pela digoxina. Esses dados sugerem que BD-21 poderia atuar como um medicamento para reverter o fenótipo de tumores resistentes a múltiplas drogas (Rocha *et al.*, 2014).

Avaliando o potencial antitumoral da BD-21 em células de carcinoma uterino e carcinoma de cólon (HeLa e RKO) verificou-se que essa substância apresenta uma citotoxicidade menor (2,2  $\mu\text{M}$ ) em relação a digoxina (56,2  $\mu\text{M}$ ) e que não apresenta toxicidade para as células normais (MDCK). Adicionalmente, a BD-21 induziu a morte de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) e células HeLa, por apoptose. Mesmo apresentando uma baixa citotoxicidade, a BD-21 apresentou resultados interessantes que motivaram a continuação dos estudos com essa molécula. A BD-21 modulou as junções oclusivas aumentando a expressão de claudina-4 e ZO-1, e inibindo a expressão de claudina-2. Dessa forma a BD-21 pode fortalecer as junções oclusivas, podendo regular características importantes na metástase como: migração, transformação, proliferação e invasão celular (Rocha *et al.*, 2014).

Uma análise dos efeitos anti-inflamatórios da BD-21 também foi realizada. A administração oral de BD-21 (0,3 mg/kg) demonstrou uma inibição significativa e prolongada do edema da pata. A análise histológica demonstrou uma redução nas células inflamatórias e na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nas almofadas plantares 6h após a administração de carragenina. A BD-21 (0,3 mg/kg) também reduziu os níveis do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) 2 e 4 h após a carragenina. Adicionalmente, a BD-21 demonstrou atividade antinociceptiva, inibindo contorções abdominais em todas as doses testadas. Porém, no teste da formalina, a BD-21 não apresentou atividade antinociceptiva. Além disso, no teste de toxicidade aguda, a BD-21 não causou sintomas de toxicidade ou mortalidade. Esses resultados demonstram que estes novos ECTs possuem um grande potencial como fármacos anti-inflamatórios (Vieira *et al.*, 2018).

Recentemente também foram realizados experimentos de neuroproteção com os compostos que tinham uma maior especificidade pela isoforma  $\alpha 3$ . O intuito do trabalho foi avaliar o uso da digoxina e seus derivados semissintéticos BD-14, BD-15 e BD-16, frente a indução isquêmica química parcial seguida de reperfusão em células de neuroblastoma murino, Neuro-2a (N2a). A isquemia química foi induzida por azida sódica em diferentes concentrações, para posterior seleção da concentração ideal; a reperfusão foi induzida por 24 horas trocando o meio isquêmico por meio de cultivo. O efeito neuroprotetor após o pré-tratamento das células com os esteroides a serem testados, demonstraram um aumento da viabilidade das células em concentrações nanomolares. Na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e expressão da isoforma  $\alpha 1$  da enzima, os esteroides digoxina e BD-15 demonstraram capacidade de modular diretamente a atividade da enzima, aumentando seus níveis de expressão e atividade (de Souza Goncalves *et al.*, 2019).

Diante dos resultados já estabelecidos dos derivados da digoxina, as  $\gamma$ -benzilidenos digoxinas, bem como dos efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores já descritos de diversos ECTs, esse trabalho busca investigar o papel imunomodulador do derivado da digoxina, BD-8, em modelo *in vitro* de macrófagos peritoneais murino estimulados com partículas fúngicas, o zymosan.

# **OBJETIVOS**

---

---



### 3. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade imunomoduladora do BD-8 *in vitro* e os possíveis mecanismos envolvidos.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do BD-8 da citotoxicidade celular e na produção de óxido nítrico estimulado com o zymosan;
- Estudar o efeito do BD-8 na produção de citocinas, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 por macrófagos peritoneais murinos estimulados por zymosan;
- Investigar o efeito do BD-8 na capacidade fagocítica dos macrófagos frente a partículas de zymosan;
- Mensurar os níveis de expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS);
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Analisar o efeito do BD-8 nas vias Akt/mTOR, NF- $\kappa$ B, MAPK p38/ERK, Ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e Src.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---

---



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados camundongos *swiss* albino fêmeas com idade de 6 a 8 semanas. Os animais foram fornecidos pela Unidade Produtora de Animais (UPA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e foram mantidos com livre acesso a água e dieta controlada à base de ração em uma sala com temperatura entre  $21\pm 1^\circ\text{C}$  e ciclos claro/escuro de 12h. Os animais foram manuseados conforme o protocolo nº 5274120522 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - UFPB (ANEXO A).

#### 4.1.2 Obtenção do BD-8

O BD-8 foi semissintetizada a partir de modificações químicas da digoxina pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Nanoestrutura da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), coordenado pelo Prof. Dr. José Augusto Ferreira Perez Villar (Pessoa *et al.*, 2018).

Na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a amostra foi solubilizada em DMSO em uma concentração de 5 mg/mL e armazenada no freezer ( $-20^\circ\text{C}$ ). Para os experimentos, foram feitas diluições sucessivas com meio de cultura RPMI-1640 Medium (1X) (Gibco) suplementado com soro fetal bovino SFB para obtenção das seis concentrações de BD-8 testadas (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 100 nM, 10 nM e 1 nM), sendo essas concentrações baseadas em experimentos anteriores com outro ECT, a marinobufagina (Carvalho *et al.*, 2019).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Cultura de macrófagos

Para a realização da cultura de macrófagos peritoneais, os animais foram previamente estimulados com uma injeção intraperitoneal de tioglicolato (2 mL) (Sigma-Aldrich) a 4%. Após quatro dias, os animais foram eutanaseados, para obtenção dos macrófagos peritoneais, por meio de deslocamento cervical. Posteriormente, foi realizado o lavado peritoneal, onde 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 Medium (1X) (Gibco) (estreptomicina: 10 mg/mL, penicilina: 6 mg/ml, e canamicina: 2 mg/mL) gelado foi inserido na cavidade peritoneal com auxílio de seringas e, após 30 segundos de massagem, o lavado foi recuperado. A suspensão de células obtida a partir da lavagem peritoneal foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ,

sendo posteriormente feito o descarte do sobrenadante e o pellet ressuspenso em 2 mL de meio RPMI-1640 Medium (1x) (Gibco), suplementado com 10% de SFB. Em seguida, foi realizada a contagem celular e análise da viabilidade com o corante Azul de Tripán sob câmara de Neubauer.

Após isso, as células peritoneais foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço para realização dos experimentos envolvendo a viabilidade e dosagem de NO, em placas de 24 poços a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço para posteriores ensaios de fagocitose e em placa de 6 poços a uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  células/poço para posterior ensaio de citometria. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas com meio de cultura RPMI-1640 Medium (1X) (Gibco) suplementado com SFB em estufa de CO<sub>2</sub> (atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C) após isso, os grupos foram divididos em controle (apenas meio RPMI-1640), estimuladas com ZYM (concentração de 0,2 mg/mL), BD-8 (100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM e 1 nM) e a associação do ZYM com o BD-8. Posteriormente, as células foram incubadas novamente em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas para em seguida serem submetidas aos protocolos experimentais.

#### 4.2.2 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo do método de MTT. Esse método é baseado na capacidade das enzimas mitocondriais (desidrogenases) de células viáveis transformar o sal de tetrazólio (MTT), de cor amarela, no seu derivado formazan azul (cor violeta). Dessa maneira, quanto maior a intensidade da cor violeta, mais células metabolizam o MTT em cristais de formazan e assim, maior a viabilidade celular (Mosmann, 1983).

Após coleta do sobrenadante, foi adicionado à placa uma solução contendo 10% do MTT em meio RPMI a mesma foi incubada por 4 h em estufa de CO<sub>2</sub>. Após esse procedimento, todo o sobrenadante foi removido e foram adicionados 100 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados. Por fim, a viabilidade celular foi quantificada por meio da medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de placas.

#### 4.2.3 Dosagem de Nitrito

A produção de NO foi avaliada *in vitro* a partir da determinação de seu produto de degradação mais estável, o nitrito, pelo método colorimétrico indireto conhecido como reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Nesse método, os nitritos, quando presentes na amostra, reagem com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio.

Este sal então reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) para formar um composto azo estável de cor violeta, que pode então ser analisado em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm.

Para isso, 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes resultantes do cultivo com os macrófagos peritoneais murinos. Esse reagente é constituído da mistura 1:1 de duas soluções A e B, preparadas imediatamente antes do uso. A solução “A é composta por 0,1 % (p / v) de naftiletlenodiamina em 5 % (v / v) de ácido fosfórico e a solução B com 1 % de p-aminobenzenossulfonamina (p / v) em ácido fosfórico 5 % (v / v). Após 10 minutos de reação à temperatura ambiente, a leitura foi feita utilizando um comprimento de onda de 540nm em um leitor de placa. Os resultados em nitrito em  $\mu\text{M}$  foram determinados por meio da comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.2.4 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

Após o tempo de 24 horas em cultura celular, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, de acordo com as informações do fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc). Inicialmente, as placas de ELISA foram sensibilizadas com os anticorpos de captura anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 e anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-10, diluídos em tampão fosfato pH 6.5 (Coating Buffer 1X) e incubadas overnight a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de tween 20 (PBS) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente, as placas foram lavadas em PBST, foram adicionadas as amostras de sobrenadantes a serem analisadas, após isso, as placas foram incubadas novamente overnight a 4°C e terminado o período de incubação, foram lavadas em PBS e o anticorpo de detecção referente a cada citocina foi adicionado, em seguida as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas em PBS, o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionado e foram incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, foi adicionada a solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e após 15 minutos essa reação foi interrompida com a solução de parada (ácido fosfórico 1M) e realizada a leitura em leitor de placa a 450 nm.

#### 4.2.5 Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos

Macrófagos peritoneais previamente obtidos como descrito anteriormente (item 4.2.1), plaqueados em placas de 24 poços contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro e, após a adesão (2 horas), foram incubadas durante 24 horas com diferentes concentrações de BD-8 (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM e 1nM). Após isso, o conteúdo dos poços foi aspirado e adicionou-se o zymosan na concentração de 0,2mg/mL, sendo a placa novamente incubada por 40 min. Após esse período, os poços foram novamente lavados com PBS a fim de remover o excesso de partículas não fagocitadas e adicionou-se 300 $\mu$ L de paraformaldeído 4% overnight. Por fim, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente dos poços e, coradas pelo método panótico rápido. As lamínulas coradas foram então montadas em lâminas de microscopia com auxílio do Bálsamo do Canadá e visualizadas no microscópio óptico, com a objetiva de imersão 100x. O percentual de fagocitose foi estimado pela contagem de partículas de zymosan fagocitadas em 100 macrófagos, sendo considerado macrófagos com atividade fagocítica aumentada aqueles que apresentavam pelo menos 3 partículas de zymosan internalizadas (Zuliani; Gutiérrez; Teixeira, 2018).

#### 4.2.6 Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos por citometria de fluxo

As células foram colocadas em placas estéreis de 24 poços, sendo plaqueadas  $5 \times 10^5$  células/poço e incubadas por 2hr com meio RPMI-1640 em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 37°C. Após o período de incubação, os poços foram lavados com PBS para remoção das células não aderentes. As células aderidas foram ainda incubadas em um volume final de 300  $\mu$ L, contendo meio RPMI-1640 na presença ou ausência do BD-8, na concentração de 10  $\mu$ M (Concentração essa a de melhor viabilidade e que diminuiu mais os níveis de óxido nítrico) por 24hrs a 37°C. Posteriormente, após 24hr, as células previamente tratadas, foram desafiadas com o Red-Zymosan pHrodo™, partícula fúngica na qual emite fluorescência somente quando ocorre a fagocitose, e foram incubadas por 40 min a 37°C. Após isso, os poços foram lavados com PBS, para remoção de resíduos do poço e partículas não aderidas, e foram colocadas no gelo por 40 min, para desaderência das células. Por fim, as células foram soltas com scraper, passadas para um tubo de citômetro e lidas no citômetro de fluxo.

#### 4.2.7 Avaliação da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços de fundo plano ( $5 \times 10^5$  células) e incubados durante 2 h. Em seguida, as células foram tratadas com BD-8 (10  $\mu$ M). Após 24 h de incubação, as células foram estimuladas com ZYM (0,2 mg/mL) e incubadas por 40 min.

Em seguida, as células foram marcadas com CellRox™ Green, de acordo com as instruções do fabricante. Finalmente, as células foram suspensas em PBS e avaliadas utilizando um citômetro de fluxo. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido para cada amostra.

#### 4.2.8 Análise da expressão de moléculas intracelulares por citometria de fluxo

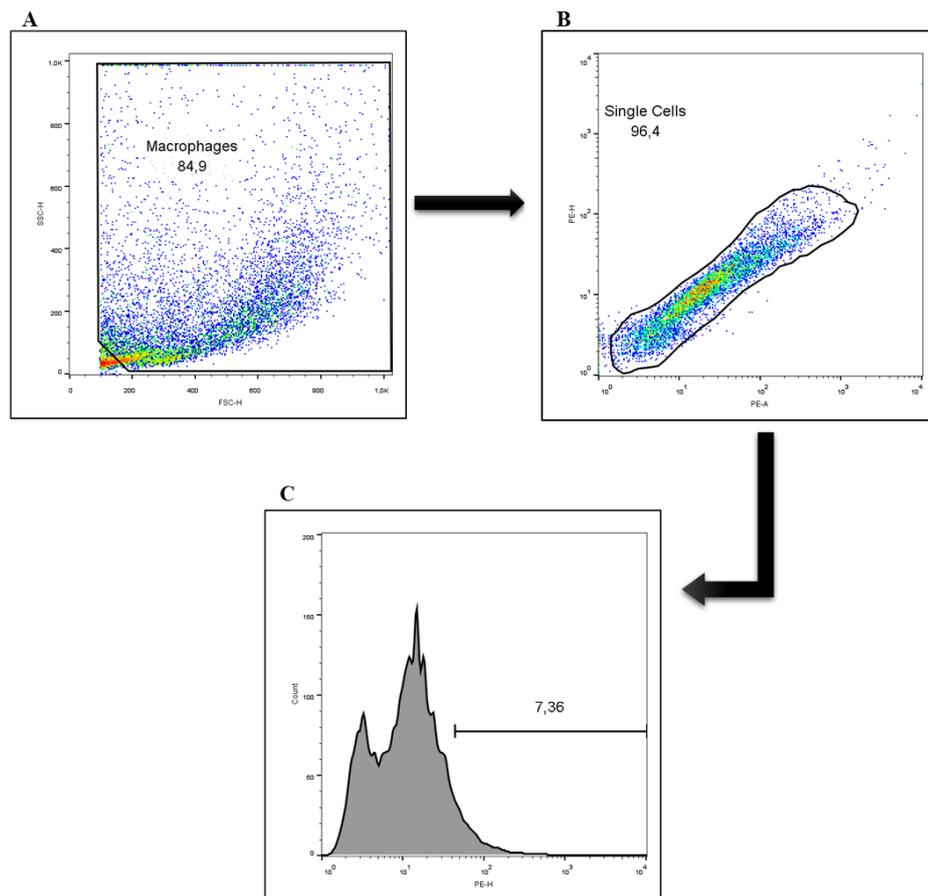
As células provenientes da cultura de macrófagos em placa de 6 poços ( $1,5 \times 10^6$  células/poço), foi retirado o sobrenadante e descartado, adicionado 1,5 mL de PBS (salina tamponada com fosfato) gelado por poço e as placas ficaram no gelo por 40 min, para ajudar na desaderência das células. Posteriormente, as células foram soltas com o auxílio de um raspador de células, passadas para eppendorfs e centrifugadas por 5 min/1500 rpm/4°C e posteriormente contadas com o auxílio da câmara de Neubauer, coradas com azul de tripan e posteriormente plaqueadas em placas de 96 poços de fundo U, a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço. Após isso, a placa foi centrifugada a 300g/6min e em seguida o sobrenadante foi desprezado e adicionado a cada poço da placa 100µL de CD16/32, a fim de bloquear as ligações inespecíficas das células e posteriormente colocadas no gelo para otimizar este bloqueio. Posteriormente, foi adicionado 100µL de Cytifix (BD Cytifix™) a fim de fixar as células. Após de 30 min em estufa de CO<sub>2</sub>, a placa foi novamente lavada e após centrifugação e descarte do sobrenadante, foi adicionado 150µL de Perm Buffer (BD Phosflow™) em cada poço, promovendo permeabilização celular, e a placa foi novamente para o gelo por 30 min. Após esse tempo, a placa foi lavada e então feita a marcação com os anticorpos específicos anti-Akt, anti-mTOR, anti-iNOS, anti-p-p38, anti-p-ERK1/2, anti-p-NF-κB, anti-p-Src e anti-COX-2 (Invitrogen-Thermo fisher), e colocados no gelo novamente por 30 min. Depois do decorrer deste tempo, foi adicionado 200µL de PBS e centrifugado a 300g/6min e descartado posteriormente o sobrenadante. Por fim, as células já marcadas com seus respectivos anticorpos, foram lavadas novamente e ajustadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/tubo de citômetro e feita a leitura em citômetro de fluxo.

#### 4.2.9 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo foi realizada a partir da quantificação da fluorescência dos anticorpos que foram marcados nas células. O citômetro de fluxo utilizado para análise dos dados celulares foi o BD FACSCanto II, no qual possui três lasers: o azul (488nm, resfriado a ar, 20 mW no estado sólido), vermelho (633 nm, 17 mW HeNe) e violeta (405 nm, estado sólido de 30 mW). Durante a obtenção dos dados, coletou-se 10.000 eventos, para posterior obtenção da avaliação dos macrófagos.

Posteriormente, para análise dos dados, foi feita a avaliação dos gráficos tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC), onde foi feito um *gate* na região de interesse de análise (Figura 9A). Em seguida, foi realizada a obtenção das *single cells* com avaliação dos gráficos marcação no canal A vs. marcação no canal H (Exemplo: PE-A vs. PE-H), com a finalidade de refinar mais análise, pela discriminação dos dupletos celulares (Figura 9B). Após isso, as células foram analisadas quanto a intensidade de fluorescência e % de células marcadas, em gráfico do tipo histograma (Figura 9C).

**Figura 9** - Estratégia de análise dos dados por citometria de fluxo.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2024. **A** - Os macrófagos foram analisados e visualizados em um gráfico do tipo dot-plot, de tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC), feito o gate, excluindo a maioria dos debris celulares. **B** - Com a obtenção dos gates dos macrófagos, foi realizada o gate nas single cells, para exclusão dos dupletos celulares. **C** - Em seguida, foi feito um gráfico de histograma, onde pode ser observada a intensidade de fluorescência e a % de células marcadas.

#### 4.2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. e analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido de pós-teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de  $p \leq 0,05$ . Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e para a análise dos dados obtidos no citômetro de fluxo foi utilizado o Software FlowJo versão 10.

# **RESULTADOS**

---

---

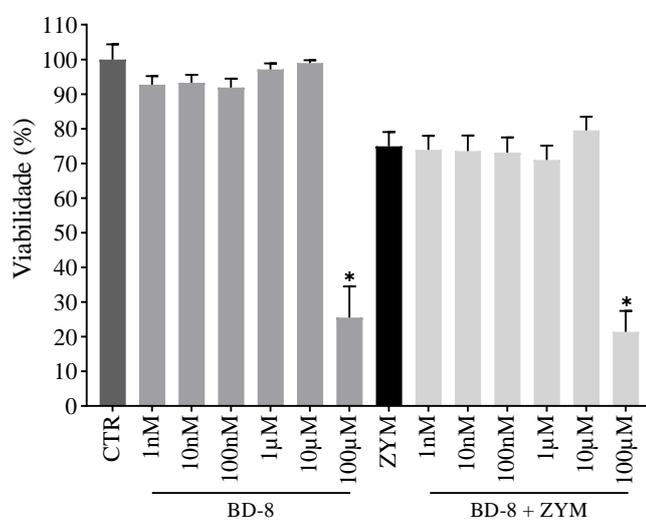


## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito do BD-8 na citotoxicidade celular

Na análise da citotoxicidade do BD-8 em macrófagos peritoneais murinos, na presença e ausência de zymosan, observou-se que, dentre as concentrações testadas (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM), apenas a maior concentração, 100 µM, apresentou redução da viabilidade celular. Essa redução foi observada tanto no grupo BD-8 sozinha, com redução de 70% na viabilidade, como no grupo de células com tratamento com a substância BD-8 e o zimosan (Grupo BD-8 + Zymosan), com redução de 76% na viabilidade (Figura 10). Dessa forma, a concentração de 100 µM foi retirada dos demais experimentos realizados.

**Figura 10** - Efeito citotóxico da molécula BD-8 em macrófagos peritoneais murinos.



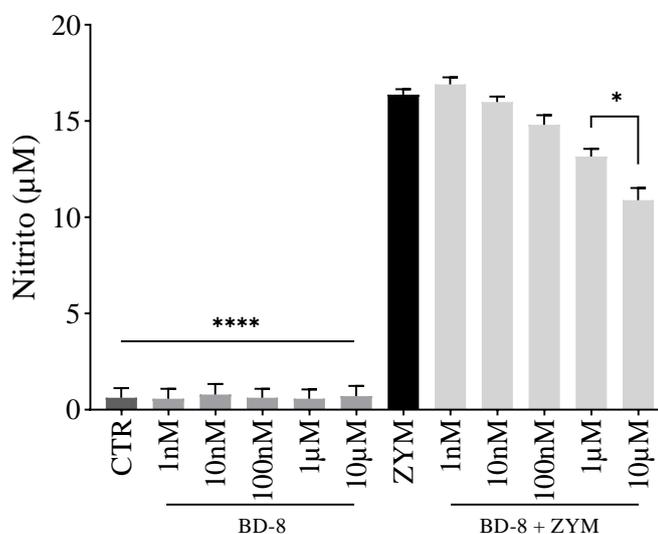
**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2024. **Legenda:** Macrófagos tratados com as diferentes concentrações do BD-8 (1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM, 100µM), na ausência e presença do zymosan (0,2mg/ml). O sobrenadante foi removido dos poços, após incubação, e adicionado 100µL de MTT. Após 4hrs de reação, os cristais de formazan obtidos, foram diluídos em DMSO. Os dados numéricos foram apresentados em média ± e.p.m e sendo realizada a análise de variância (ANOVA) oneway, seguido de pós-teste de Tukey. \*\*\*\* - ( $p < 0.0001$ ) significativo em relação ao grupo controle. CTR: Controle; ZYM: Zymosan; BD-8 + ZYM: BD-8 em associação com o zymosan.

### 5.2 Efeito do BD-8 na produção de óxido nítrico

Os níveis de NO também foram avaliados nos sobrenadantes da cultura de macrófagos. Como esperado, os macrófagos peritoneais estimulados com ZYM apresentaram níveis elevados de NO (94,7%) em comparação com o grupo controle (Figura 11). O tratamento com

BD-8 (1 e 10 $\mu$ M) reduziu os níveis de NO em 19% e 32%, respectivamente. No entanto, outras concentrações não alteraram os níveis de NO.

**Figura 11** - Modulação de óxido nítrico pela molécula BD-8.

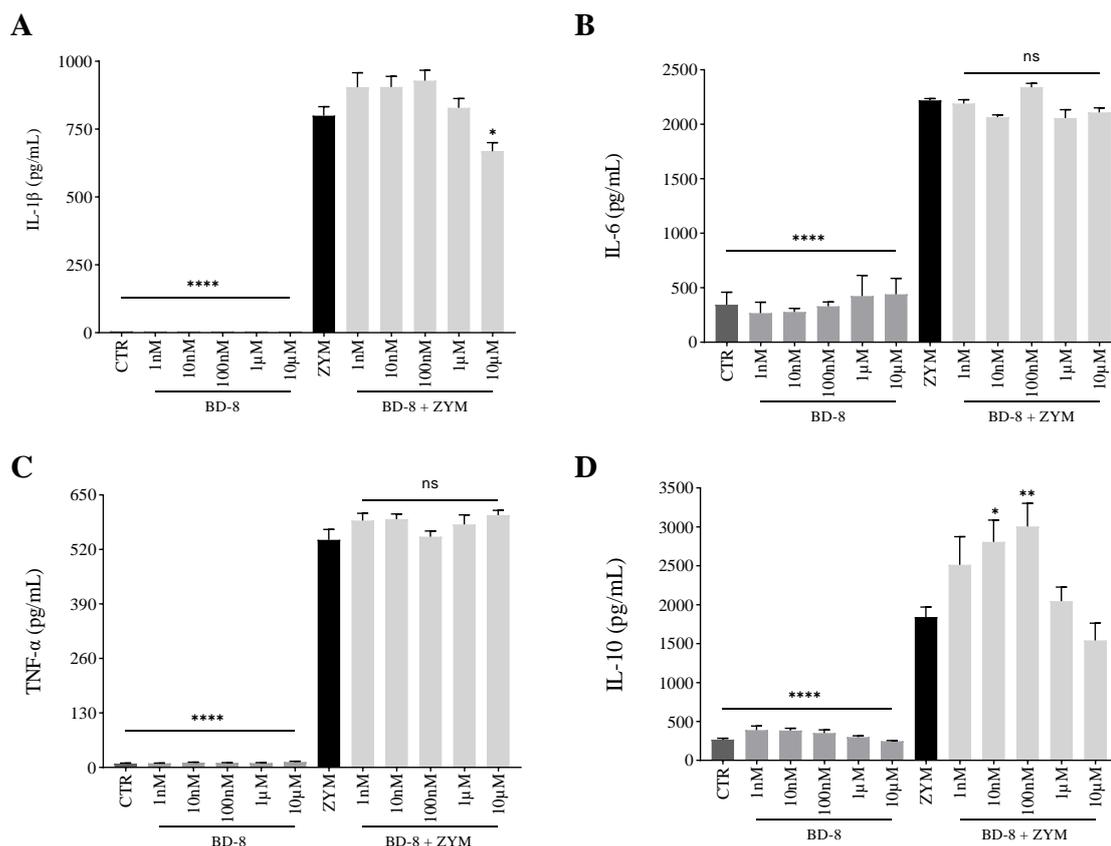


**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com BD-8 (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) na ausência ou presença de zymosan (0,2 mg/ml). Após 24 h, a produção de óxido nítrico foi determinada pelo reagente de Griess. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 10.0.0 usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. \*\*\*\* - ( $p < 0,0001$ ); \* - ( $p = 0,05$ ) significativo em relação ao grupo ZYM. CTR: Controle; ZYM: Zymosan; BD-8 + ZYM: BD-8 em associação com o zymosan.

### 5.3 Efeito do BD-8 na produção de citocinas

Os macrófagos peritoneais estimulados com ZYM apresentaram produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) em comparação ao grupo controle. O tratamento com BD-8 em 10 $\mu$ M reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  (12%;  $p = 0,03$ ), enquanto a IL-6 e o TNF- $\alpha$  não foram afetados. Além disso, o BD-8 aumentou a produção de IL-10, com resposta máxima na concentração de 100 nM (39,6%;  $p = 0,0002$ ) (Fig. 12 A-D). A maior concentração de BD-8 (10 $\mu$ M) demonstrou a maior redução de NO e IL-1 $\beta$ , sendo a principal concentração utilizada nos demais experimentos.

**Figura 12** - A molécula BD-8 modula a produção de citocinas em macrófagos peritoneais.



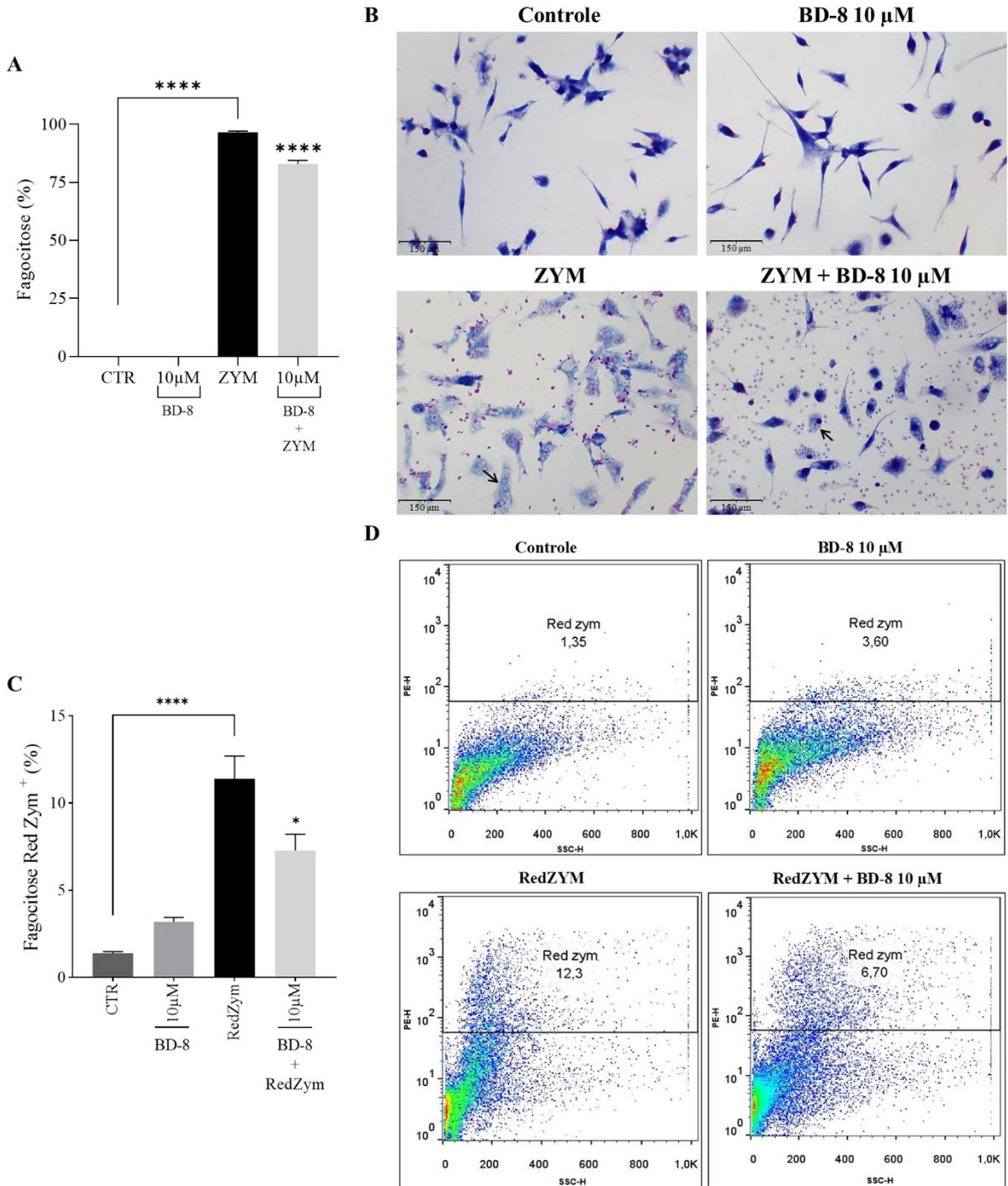
**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com BD-8 (1nM, 10nM, 100nM, 1μM e 10μM) na ausência ou presença de zymosan (0,2 mg/ml). Após 24 h, a liberação de IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α foi determinada por ensaio imunoenzimático. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 10.0.0 usando análise de variância unidirecional seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. \*\*\*\* - ( $p < 0,0001$ ); \*\* - ( $p = 0,01$ ); \* - ( $p = 0,05$ ) significativo em relação ao grupo ZYM. CTR: Controle; ZYM: Zymosan; BD-8 + ZYM: BD-8 em associação com o zymosan.

#### 5.4 Efeito do BD-8 na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais murinos

O ensaio da placa de fagocitose revelou um aumento na atividade fagocítica dos macrófagos estimulados com zymosan em comparação com o grupo controle (96,5%;  $p < 0,0001$ ) e uma diminuição na capacidade fagocítica em todas as concentrações no grupo tratado em comparação ao controle, com maiores reduções na concentração de 10μM (13,5%;  $p = 0,0002$ ), conforme mostrado na figura 13A, e as imagens representativas desse efeito biológico, são mostradas na figura 13B. Adicionalmente, macrófagos estimulados com Red zymosan e analisados por citometria de fluxo, apresentaram aumento na atividade fagocítica

em comparação ao controle (88%;  $p < 0,0001$ ), enquanto o tratamento com BD-8 na concentração de  $10\mu\text{M}$  reduziu a atividade fagocítica (36%;  $p = 0,0214$ ) ( Figura 13C e D).

**Figura 13** - Modulação da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais pela BD-8.



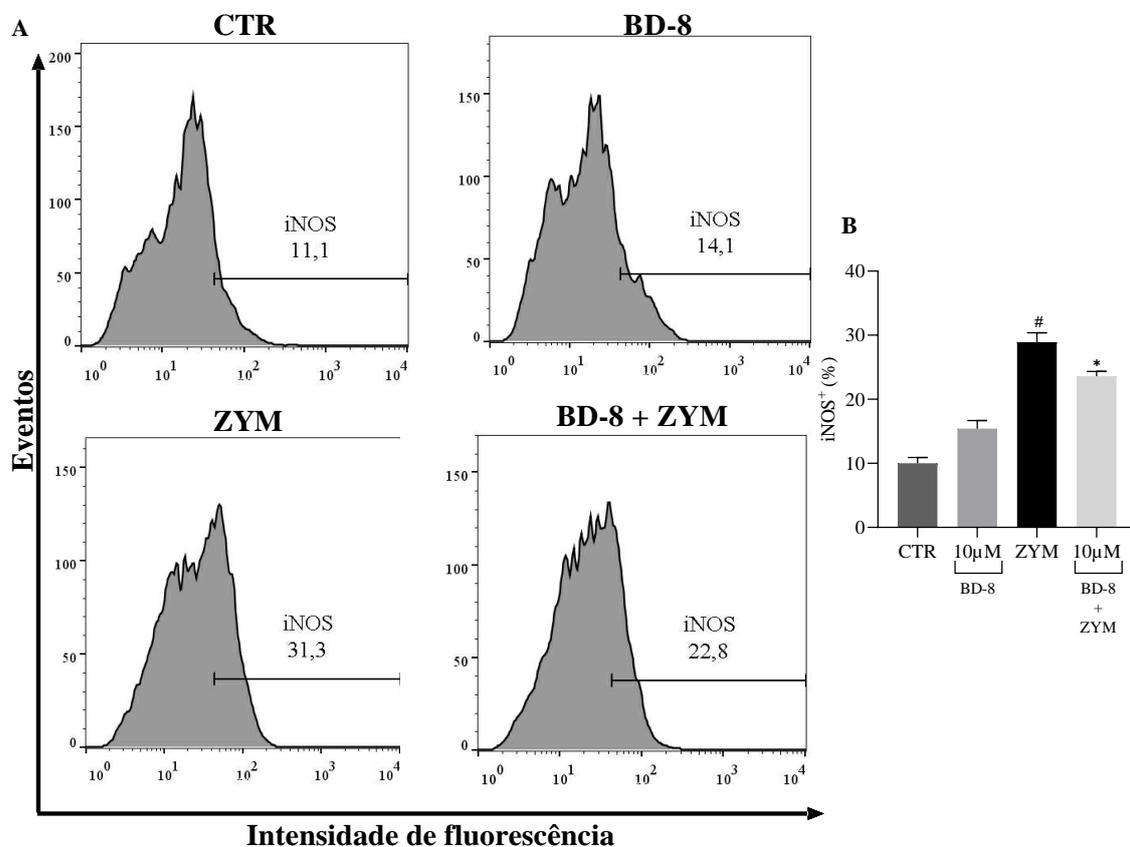
**Fonte:** Elaborado pelo Autor, 2024. **Legenda:** **A** - Ensaio de fagocitose em placa de 24 poços. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  spm. com  $n=4$  e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida de pós-teste de Tukey. #:  $p < 0,05$  - significativo em relação ao grupo controle; \*\*\*\* -

( $p < 0,0001$ ); \*\*\* - ( $p = 0,0002$ ), \*\* - ( $p = 0,002$ ), \* - ( $p = 0,018$ ). CTR: Controle; ZYM: Zymosan. **B** - Ensaio de fagocitose com Red Zymosan por citometria de fluxo. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  spm. com  $n = 4$  e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida de pós-teste de Tukey. #:  $p < 0,05$ , significativo em relação ao grupo controle; \* ( $p = 0,021$ ); Zym Vermelho: Zymosan Vermelho; CTR: Controle. **C** - Imagens representativas mostrando a expressão de partículas vermelhas de zymosan fagocitadas em dot-plots.

### 5.5 Análise dos níveis da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS)

O estímulo com zymosan aumentou a expressão de iNOS (65,4%;  $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo controle. Já no grupo tratado com BD-8, na concentração de  $10 \mu\text{M}$ , apresentou expressão reduzida da enzima iNOS (18,34%;  $p = 0,0412$ ) (Figura 14A e B)

**Figura 14** - Modulação do BD-8 nos níveis de iNOS.

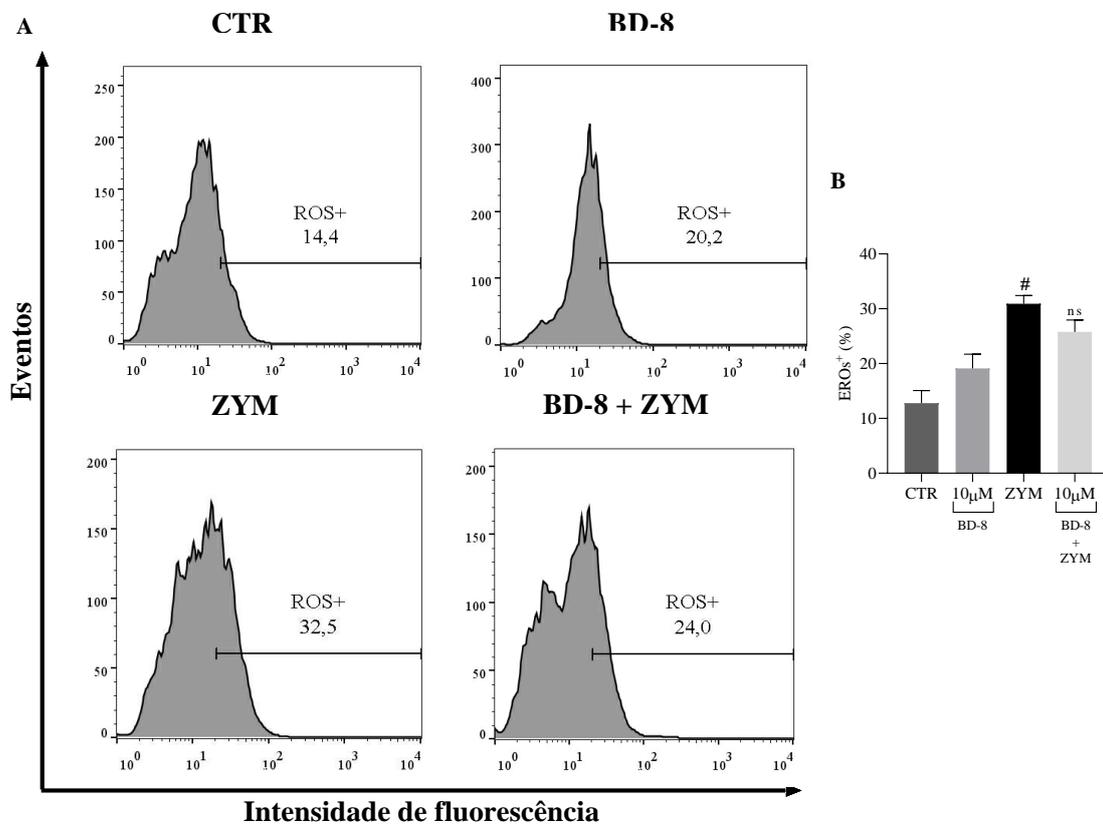


**Fonte:** Autoria própria, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais foram estimulados com zymosan na concentração de  $0,2 \text{ mg/ml}$  e tratados com BD-8 na concentração de  $10 \mu\text{M}$ . As células foram avaliadas por citometria de fluxo e marcadas com anticorpos Anti-iNOS. A. Histogramas de fluorescência. B. iNOS<sup>+</sup>. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  EPM com média  $n = 5$  e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. #  $p < 0,05$ , significativo em relação ao grupo controle; \*  $p < 0,05$ , significativo em relação ao grupo zymosan. CTR: Controle; ZYM: Zymosan.

## 5.6 Análise das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O estímulo com zymosan aumentou os níveis de EROs (58,9%;  $p < 0,0001$ ). No entanto, o BD-8 não modulou as EROs (Fig. 15A-B).

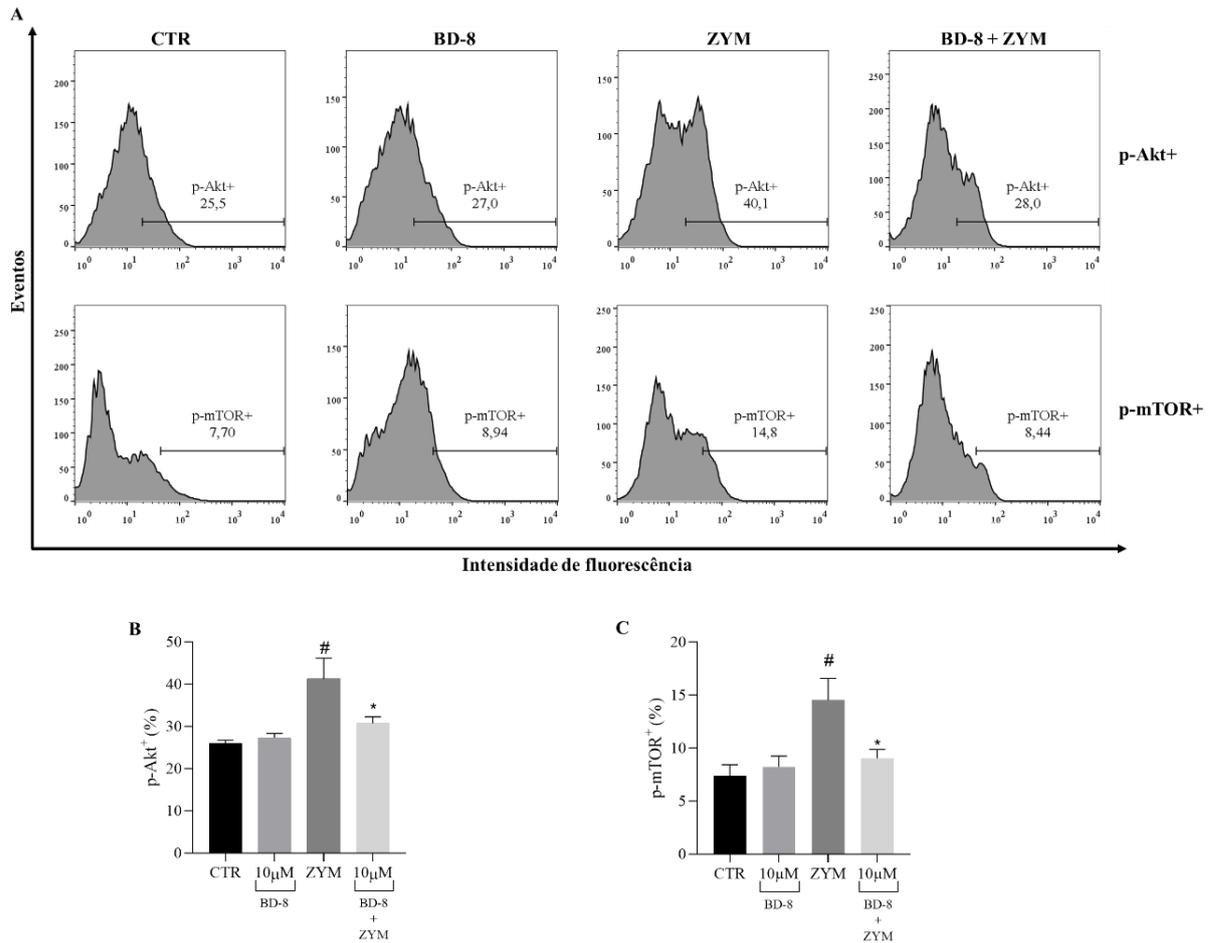
**Figura 15 - Modulação dos níveis de EROs pela BD-8.**



**Fonte:** Autoria própria, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais foram estimulados com zymosan na concentração de 0,2 mg/ml e tratados com BD-8 na concentração de 10 µM. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e marcadas com anticorpos Anti-ROS. A. Histogramas de fluorescência. B. EROs<sup>+</sup>. Os dados numéricos são apresentados como média ± EPM com média n=5 e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. #  $p < 0,05$ , significativo em relação ao grupo controle; \* $p < 0,05$ , significativo em relação ao grupo zymosan. CTR: Controle; ZYM: Zymosan.

## 5.7 Análise dos níveis de Akt/mTOR

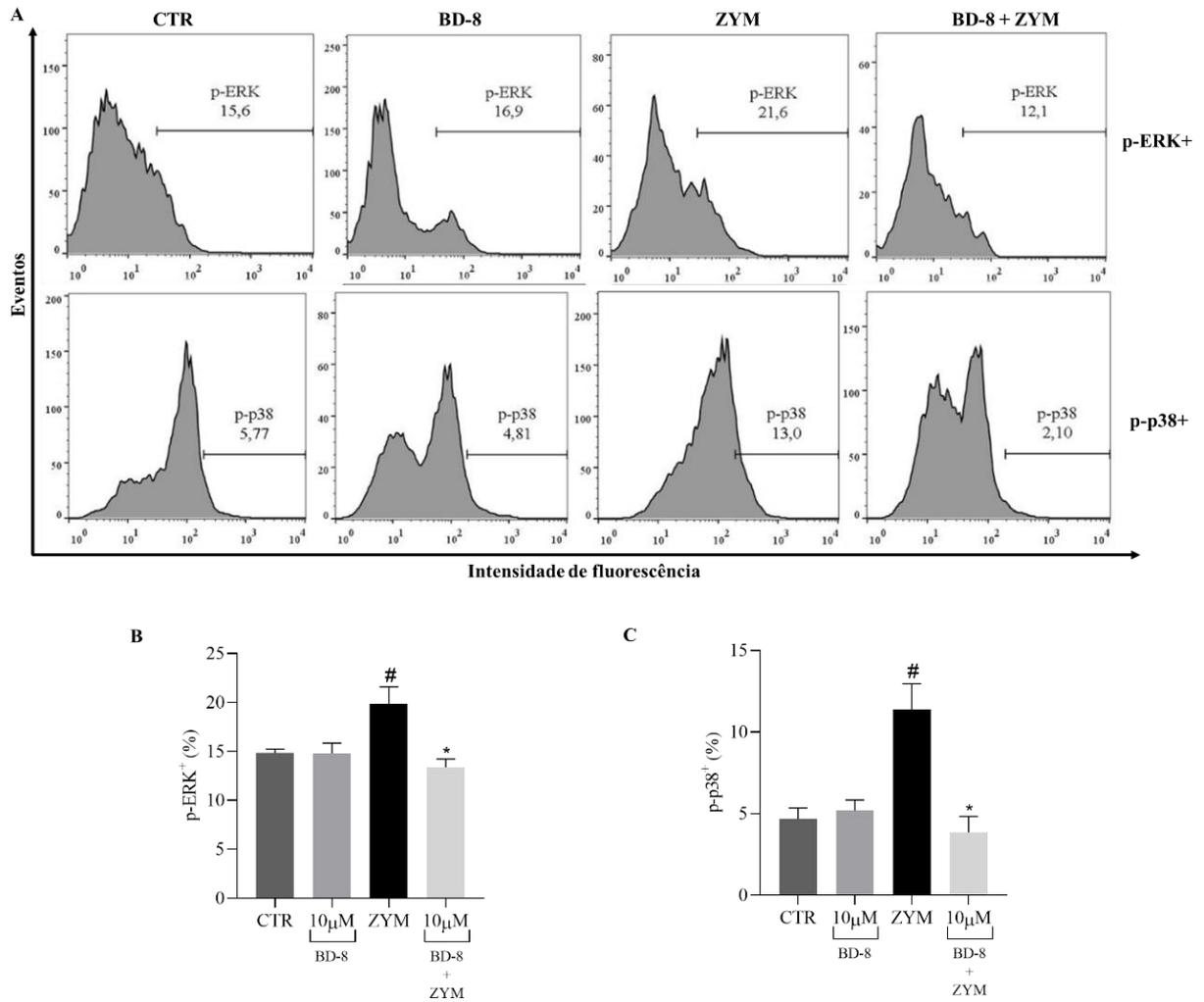
Para investigar o possível mecanismo de ação imunomodulador do BD-8, analisou-se a fosforilação de Akt e mTOR (Figura 16A). A estimulação com ZYM aumentou a fosforilação de Akt (37%;  $p = 0,001$ ) e mTOR (49,7%;  $p = 0,008$ ) em comparação ao grupo controle. Por sua vez, o grupo tratado com BD-8 apresentou redução da fosforilação de Akt (26%;  $p = 0,03$ ) e mTOR (38%;  $p = 0,03$ ) (Figura 16B e C).

**Figura 16 - Modulação mediada pelo BD-8 na fosforilação das moléculas Akt/mTOR.**

**Fonte:** Autoria própria, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais foram estimulados com zymosan na concentração de 0,2 mg/ml e tratados com BD-8 na concentração de 10  $\mu$ M. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e marcadas com anticorpos Anti-Akt e Anti-mTOR. A. Histogramas de fluorescência. B. p-Akt<sup>+</sup>. C. p-mTOR<sup>+</sup>. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  EPM com média n=5 e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. # p<0,05, significativo em relação ao grupo controle; \*p<0,05, significativo em relação ao grupo zymosan. CTR: Controle; ZYM: Zymosan.

### 5.8 Análise da fosforilação das MAPKs p38 e ERK

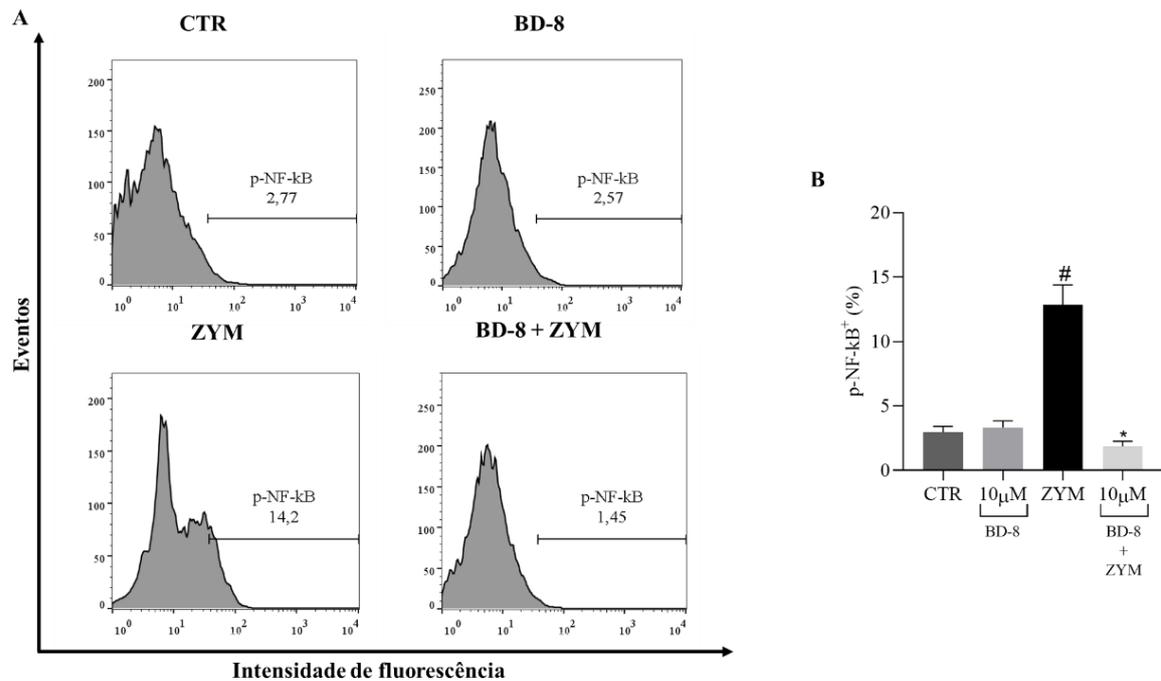
Para investigar o possível mecanismo de ação imunomodulador do BD-8, foi analisado a fosforilação de p38, ERK (Figura 17A). A estimulação com ZYM aumentou a fosforilação de p38 (58,8%; p=0,0006), ERK (25,2%; p=0,04) em comparação ao grupo controle. Por outro lado, o grupo tratado com BD-8 apresentou redução da fosforilação de p38 (66,1%; p=0,0002), ERK (32,7%; p=0,0128) (Figura 17B e C).

**Figura 17 - Modulação do BD-8 na fosforilação das MAPKs p38 e ERK.**

**Fonte:** Autoria própria, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais foram estimulados com zymosan na concentração de 0,2 mg/ml e tratados com BD-8 na concentração de 10  $\mu$ M. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e marcadas com anticorpos Anti-ERK e Anti-p38. A. Histogramas de fluorescência. B. p-ERK<sup>+</sup>. C. p-p38<sup>+</sup>. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  EPM com média n=5 e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. # p<0,05, significativo em relação ao grupo controle; \*p<0,05, significativo em relação ao grupo zymosan. CTR: Controle; ZYM: Zymosan.

### 5.9 Avaliação o efeito sobre os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B

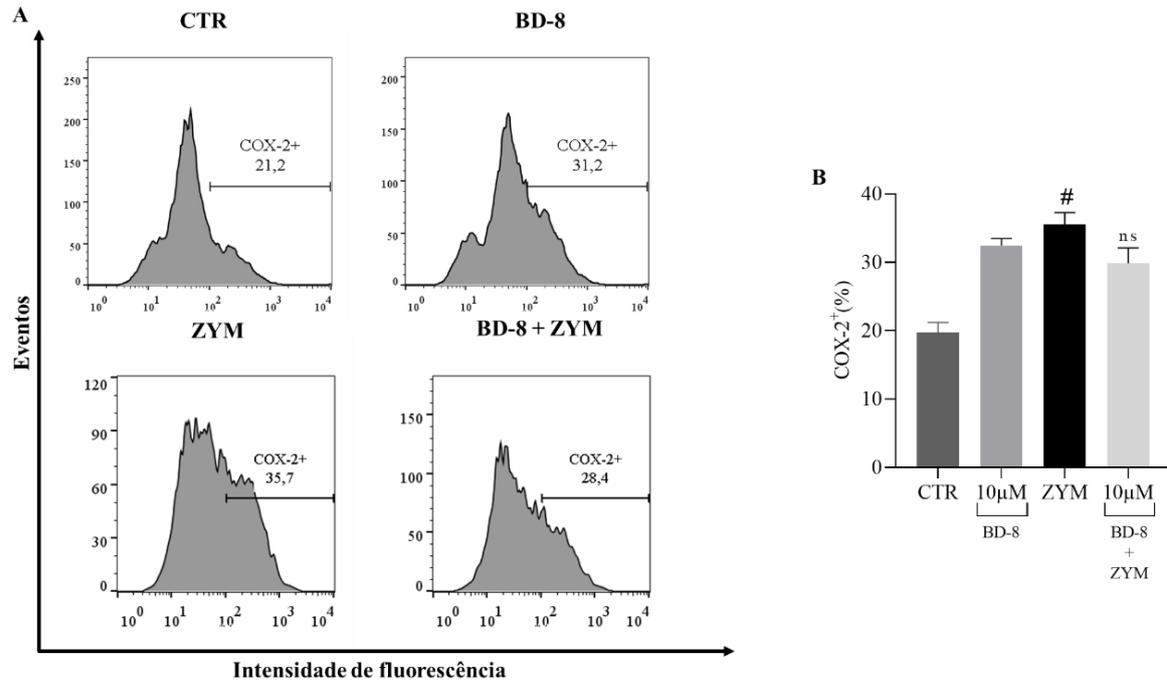
Para investigar o possível mecanismo de ação imunomodulador do BD-8, analisou-se a fosforilação de NF- $\kappa$ B (Figura 18A). A estimulação com ZYM aumentou a fosforilação do NF- $\kappa$ B p65 (76,5%; p<0,0001) em comparação ao grupo controle. No entanto, o grupo tratado com BD-8 apresentou diminuição da fosforilação do NF- $\kappa$ B p65 (85,8%; p<0,0001) (Figura 18B).

**Figura 18** - Modulação da fosforilação do NF- $\kappa$ B p65.

**Fonte:** Autoria própria, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais foram estimulados com zymosan na concentração de 0,2 mg/ml e tratados com BD-8 na concentração de 10  $\mu$ M. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e marcadas com anticorpos Anti-NF- $\kappa$ B. A. Histogramas de fluorescência. B. p-NF- $\kappa$ B p65<sup>+</sup>. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  EPM com média n=5 e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. # p<0,05, significativo em relação ao grupo controle; \*p<0,05, significativo em relação ao grupo zymosan. CTR: Controle; ZYM: Zymosan.

### 5.9 Avaliação o efeito na Ciclo-oxigenase 2

O estímulo com zymosan aumentou os níveis de COX-2 (44,5%; p=0,001). No entanto, o BD-8 não modulou COX-2 (Fig. 19A-B).

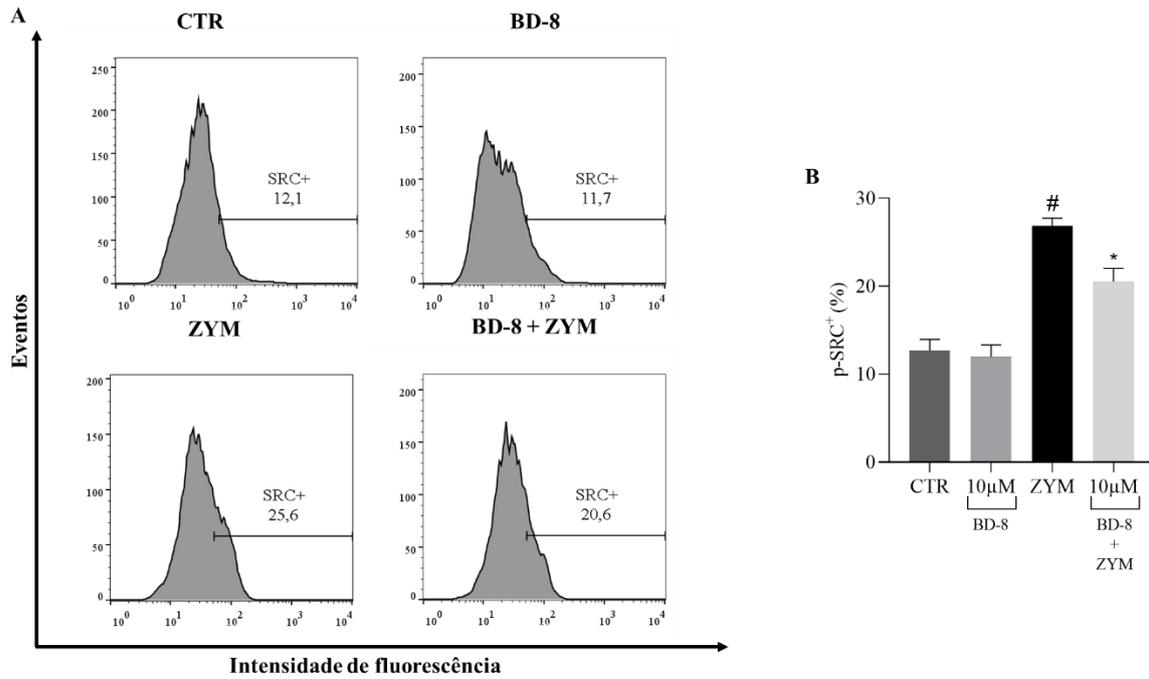
**Figura 19** - Efeito do BD-8 sobre os níveis de COX-2.

**Fonte:** Autoria própria, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais foram estimulados com zymosan na concentração de 0,2 mg/ml e tratados com BD-8 na concentração de 10 µM. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e marcadas com anticorpos Anti-COX-2<sup>+</sup>. A. Histogramas de fluorescência. B. COX-2<sup>+</sup>. Os dados numéricos são apresentados como média ± EPM com média n=5 e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. # p<0,05, significativo em relação ao grupo controle; \*p<0,05, significativo em relação ao grupo zymosan. CTR: Controle; ZYM: Zymosan.

### 5.10 Avaliação o efeito na via Src

Para investigar o possível mecanismo de ação imunomodulador do BD-8, analisou-se a fosforilação de Src (Figura 20A). A estimulação com ZYM aumentou a fosforilação de Src (53%; p<0,0001) em comparação ao grupo controle. O grupo tratado com BD-8 apresentou diminuição da fosforilação de Src (24%; p<0,0001) (Figura 20B).

**Figura 20** - Efeito do BD-8 sobre os níveis de Src em macrófagos peritoneais murinos.



**Fonte:** Autoria própria, 2024. **Legenda:** Macrófagos peritoneais foram estimulados com zymosan na concentração de 0,2 mg/ml e tratados com BD-8 na concentração de 10  $\mu$ M. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e marcadas com anticorpos Anti-p-Src<sup>+</sup>. A. Histogramas de fluorescência. B. p-Src<sup>+</sup>. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  EPM com média n=5 e foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. # p<0,05, significativo em relação ao grupo controle; \*p<0,05, significativo em relação ao grupo zymosan. CTR: Controle; ZYM: Zymosan.

# DISCUSSÃO



## 6. DISCUSSÃO

Os experimentos realizados demonstraram o papel do ECTs BD-8, molécula derivada da digoxina (Pessoa *et al.*, 2018). O presente trabalho faz parte de um projeto amplo, com a presença e parceria com diversas outras universidades federais do país, na qual possuem como objetivo elucidar os efeitos biológicos de todas as BDs, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos fármacos no mercado, com um melhor efeito e menor toxicidade.

Diversos trabalhos demonstram o potencial dos ECTs como compostos imunomoduladores. Porém, os efeitos biológicos do BD-8 com relação a resposta imune na inflamação ainda não foram elucidados. Dessa forma, foi demonstrado pela primeira vez, o efeito imunomodulador deste ECTs em macrófagos peritoneais murinos.

Para execução de todos os experimentos expostos deste trabalho, foi realizada previamente uma cultura de macrófagos peritoneais. Macrófagos presentes nos tecidos, possuem um papel importante dentro do processo inflamatório, bem como no reparo tecidual e reestabelecimento da homeostase. Dentro da cavidade peritoneal, existem dois tipos de macrófagos: Os macrófagos peritoneais grandes (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) e os macrófagos peritoneais pequenos (CD11b<sup>-</sup> F4/80<sup>-</sup> MHC-II<sup>+</sup>). Respectivamente, os primeiros garantem a homeostase da cavidade peritoneal, mantendo as condições fisiológicas do tecido, já o segundo se apresentam em maior quantidade após um estímulo inflamatório, se maturam de dois a quatro dias pós estímulo, controlando assim o processo infeccioso e/ou dano tecidual (Cassado; D'Império Lima; Bortoluci, 2015; Lu; Varley, 2013). Diante disso, dentro do processo metodológico da cultura, o uso do tioglicolado é aplicado como forma de estimular o microambiente da cavidade peritoneal, proporcionando assim um aumento do número de macrófagos peritoneais, dentro do período de quatro dias, antes da realização da cultura de células (Leijh *et al.*, 1984).

O tratamento com BD-8 em macrófagos peritoneais estimulados ou não com ZYM só foi tóxico na concentração mais alta de 100µM (Figura 9). As demais concentrações testadas de BD-8 (1nM, 10nM, 100nM, 1µM e 10µM) não demonstraram efeitos de citotoxicidade em macrófagos peritoneais. Desta forma, a maior concentração (100µM) foi descartada nos experimentos subsequentes. Estudos anteriores mostraram que a ouabaína em altas concentrações pode induzir a morte celular ao inibir a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Cavalcante-Silva *et al.*, 2017). Isto pode estar associado à baixa viabilidade dos macrófagos peritoneais observados na concentração de BD-8 de 100 µM. No entanto, outros estudos mostraram que concentrações nanomolares de esteróides cardiotônicos previnem a apoptose (Kolaczowska; Seljelid; Plytycz, 2001; Orellana, 2016). As concentrações de 1nM, 10nM, 100nM, 1µM e 10µM não

apresentaram efeitos de citotoxicidade, o que corrobora estudos anteriores do nosso grupo com a ouabaína e a marinobufagina (Kolaczowska *et al.*, 2010; Gantner *et al.*, 2003).

Os macrófagos desempenham diversas funções, como fagocitose e produção de óxido nítrico, que correspondem a eventos importantes durante a fase aguda da inflamação (Cavalcante-Silva *et al.*, 2017). Para induzir a fagocitose e a produção de óxido nítrico em macrófagos e avaliar o efeito do BD-8 na inflamação, foi utilizado o zymosan, um polissacarídeo da parede celular da levedura. ZYM é um polissacarídeo derivado de fungos que induz uma resposta inflamatória robusta em macrófagos (Kolaczowska; Seljelid; Plytycz, 2001; Kolaczowska *et al.*, 2010). A resposta inflamatória induzida por ZYM inicia quando o polissacarídeo se liga ao receptor Toll-like 2 (TLR2) e ao receptor de glucano dectina-1 presentes na superfície dos macrófagos. Então, a transdução de sinal intracelular desencadeada pelos receptores induz fatores de transcrição que regulam a expressão de genes relacionados à inflamação (Gantner *et al.*, 2003; Rahat *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2017). No presente estudo, o efeito imunomodulador do BD-8 foi estabelecido utilizando o modelo de macrófagos peritoneais murinos induzidos por ZYM. Uma das respostas iniciais à estimulação com ZYM é a produção de óxido nítrico (NO). Nossos dados demonstram que o BD-8 regula negativamente a produção de NO induzida por ZYM, bem como a expressão de iNOS induzida por ZYM. O iNOS produz continuamente óxido nítrico até ser degradado. A produção de iNOS é regulada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (Kleinert *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que outros esteroides cardiotônicos também modulam negativamente a expressão da enzima iNOS em modelos de inflamação articular em camundongos, usando um composto frugosídeo como grupo de tratamento para inflamação articular (Wang *et al.*, 2021).

Uma das principais funções dos macrófagos quando ativados pela ativação de sinais inflamatórios, como o zymosan, é a fagocitose. Além disso, o aumento do óxido nítrico durante a inflamação é um dos principais mediadores citotóxicos associados à fagocitose (Chakravorty; Hensel, 2003). Os resultados do presente estudo, mostraram que o zymosan aumentou a porcentagem de partículas fagocitadas por macrófagos, em comparação ao grupo controle (Figura 12A). Porém, quando tratado com BD-8 nas concentrações testadas (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM e 1 nM), foi possível observar uma redução significativa na porcentagem de partículas de zymosan fagocitadas em todas as concentrações testadas. Além disso, os resultados da fagocitose com o RedZymosan, mostrou um aumento da porcentagem de partículas fluorescentes de zymosan por macrófagos, em comparação com o grupo controle (Figura 12 B e C). Entretanto, no grupo tratado com o BD-8 na concentração de 10 $\mu$ M

(concentração escolhida para todos os protocolos com citometria de fluxo), observou-se uma diminuição da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais.

Um dos mediadores pró-inflamatórios envolvidos na atividade antimicrobiana liberados pelos macrófagos são as espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse oxidativo causado pelas ERO desempenha um papel fundamental no processo inflamatório e pode ativar vários fatores de transcrição associados a vias de sinalização no processo inflamatório (Sul; Ra, 2021). Apesar do BD-8 ter reduzido os níveis de NO, esse composto não foi capaz de modular as EROs. O BD-15, um derivado da digoxina, demonstrou um efeito neuroprotetor ao prevenir a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a peroxidação lipídica e outros fatores relacionados ao dano do estresse oxidativo (Huber *et al.*, 2022; Liu, 2020). Porém, nossos dados mostraram que o efeito imunomodulador do BD-8 não está relacionado às EROs, demonstrando que este composto pode desempenhar um papel diferente em relação ao estresse oxidativo que outros esteroides cardiotônicos.

Os macrófagos ativados também produzem uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , como parte da resposta inflamatória. Além disso, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, também podem ser produzidas para compensar a resposta pró-inflamatória e induzir a homeostase (Zhang; Na, 2007). A regulação negativa da produção de IL-1 $\beta$  induzida por ZYM e a regulação positiva de IL-10 após o tratamento com BD-8 indicam o perfil imunomodulador do BD-8. Estudos demonstraram que outros esteroides cardiotônicos também modulam negativamente os níveis de IL-1 $\beta$  em diferentes modelos de inflamação, como a marinobufagina, conforme descrito por Carvalho *et al* (2019) e a ouabaína, conforme descrito por Leite *et al* (2015). Como a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, a propriedade de modular positivamente esta citocina representa um mecanismo anti-inflamatório, pois esta citocina pode desempenhar funções reguladoras teciduais em processos inflamatórios, restringindo a resposta inflamatória exacerbada, modulando positivamente a imunidade inata e promovendo mecanismos de reparo tecidual (Ouyang; O'Garra, 2019).

A citocina IL-1 é primeiramente expressa em sua forma precursora, a pró-interleucina 1 (pró-IL-1), para então ser clivada e gerar a forma ativa (IL-1), tornando-se assim uma citocina ativa. (Fields; Günther; Sundberg, 2019). Em seguida, a forma ativa é secretada para o meio extracelular e desempenha diversas funções pró-inflamatórias como ativação e estimulação de células para sintetizar quimiocinas e outras citocinas como IL-2, IL-4 e IL-6 (BORASCHI *et al.*, 1996). A ação da IL-10 depende da conexão com seu receptor específico (IL-10R), iniciando a sinalização pela via JAK/STAT. A ativação da via JAK/STAT diminui diversas citocinas pró-inflamatórias (Carey; Tan; Ulett, 2012). Observamos que o BD-8 é capaz de

aumentar os níveis de IL-10 a 100nM. No entanto, mais estudos são necessários para compreender a via de sinalização.

A via de sinalização celular mediadas por Akt/mTOR é conhecida por desempenhar um papel em diversas funções celulares importantes, como o crescimento celular, proliferação e sobrevivência celular, bem como na resposta imune (Lv *et al.*, 2019). No presente estudo, o BD-8 foi capaz de inibir a via de sinalização Akt/mTOR, na concentração de 10 $\mu$ M testada. A ouabaína, um ECT, suprime a capacidade de crescimento e migração de células de glioma U-87MG, pela inibição da via de sinalização Akt/mTOR (Yang *et al.*, 2018). Entretanto, uma administração intracerebroventricular de ouabaína, modula positivamente a via mTOR (Kim *et al.*, 2013). Dessa forma, tal dado deste ECT, corrobora com o ECT em estudo, o BD-8, demonstrando e confirmando o efeito de modulação negativa na via Akt/mTOR. Porém, dependendo do local de ação, essa modulação pode ocorrer aumentando ou inibindo a via.

As vias de sinalização mediadas por MAPK p38 e ERK estão envolvidas em várias respostas intracelulares e codificam várias respostas biológicas, como inflamação, regulação do ciclo celular, morte celular, desenvolvimento celular e diferenciação (Coulthard *et al.*, 2009; Cuadrado; Nebreda, 2010). No presente estudo, o BD-8 modulou negativamente os mecanismos da via de sinalização MAPK p38 e ERK. Esses dados corroboram um estudo realizado com o esteroide cardiotônico ouabaína sobre a sinalização de neutrófilos e a resposta imune, mostrando que a ouabaína diminuiu a fosforilação da p38 em neutrófilos estimulados com ZYM (Cavalcante-Silva *et al.*, 2021).

Além da via Akt/mTOR e a sinalização mediada por MAPK p38 e ERK, nossos dados demonstraram que o BD-8 diminuiu os níveis de NF- $\kappa$ B p65. Este resultado corrobora um estudo realizado com bufalina, um esteroide cardiotônico que demonstrou inibir a atividade inflamatória nos tecidos pulmonares ao inibir o NF- $\kappa$ B p65 em macrófagos murinos, demonstrando assim seu efeito anti-inflamatório.(Zhakeer *et al.*, 2017). Além disso, esta redução nos níveis de NF- $\kappa$ B poderia estar relacionada à diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$  observada neste estudo. A citocina IL-1 $\beta$  tem sua produção e liberação estimulada pela ativação do NF- $\kappa$ B (Suarez; Buelvas, 2015). Da mesma forma, em um modelo de peritonite induzida por ZYM, a ouabaína foi capaz de reduzir a IL-1 $\beta$  inibindo a ativação do NF- $\kappa$ B (Leite *et al.*, 2015).

A COX-2 é uma enzima envolvida em diversos processos, como o processo inflamatório, da dor, febre e transdução de estímulos dolorosos na medula espinal. Um estudo com o ECT bufalina demonstrou a capacidade dessa substância em modular negativamente os

níveis de iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF-  $\alpha$  (Wen *et al.*, 2014). A molécula do presente estudo, o BD-8, entretanto, não foi capaz de modular a COX-2.

A Src é amplamente expressa em diversos tipos celulares e sua função vai depender da sua localidade dentro da célula. A Src pode se associar a membranas celulares, como a membrana plasmática, a membrana perinuclear e a membrana endossomal. As ações da Src nas células de mamíferos são pleiotrópicas, ou seja, uma única molécula de sinalização, pode controlar diversas características celulares, como a adesão, migração, invasão, proliferação, diferenciação e sobrevivência (Kumar; Jaggi; Singh, 2015). Tais dados justificam a modulação negativa de Src causada pelo BD-8 na concentração de 10 $\mu$ M, pelo fato da molécula em estudo está classificada dentro dos ECT. Apesar da modulação negativa, vários trabalhos demonstram que a ligação de esteroides cardiotônicos na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, favorece a interação da bomba com essa proteína quinase Src. Essa quinase ativada, levaria a subsequente fosforilação de várias tirosinas que iniciaria uma cascata de sinalização celular que regula processos como, crescimento, proliferação e motilidade celular (Barwe *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004). Além do mecanismo que envolve a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, foi descrito que os esteroides cardiotônicos interagem com o receptor nuclear relacionado ao ácido retinóico (ROR) - $\gamma$  dentro da célula (Leite *et al.*, 2020). Isto levanta a possibilidade do efeito imunomodulador do BD-8 estar parcialmente envolvido com a modulação do ROR- $\gamma$ , mas são necessários mais estudos para elucidar sua interação tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

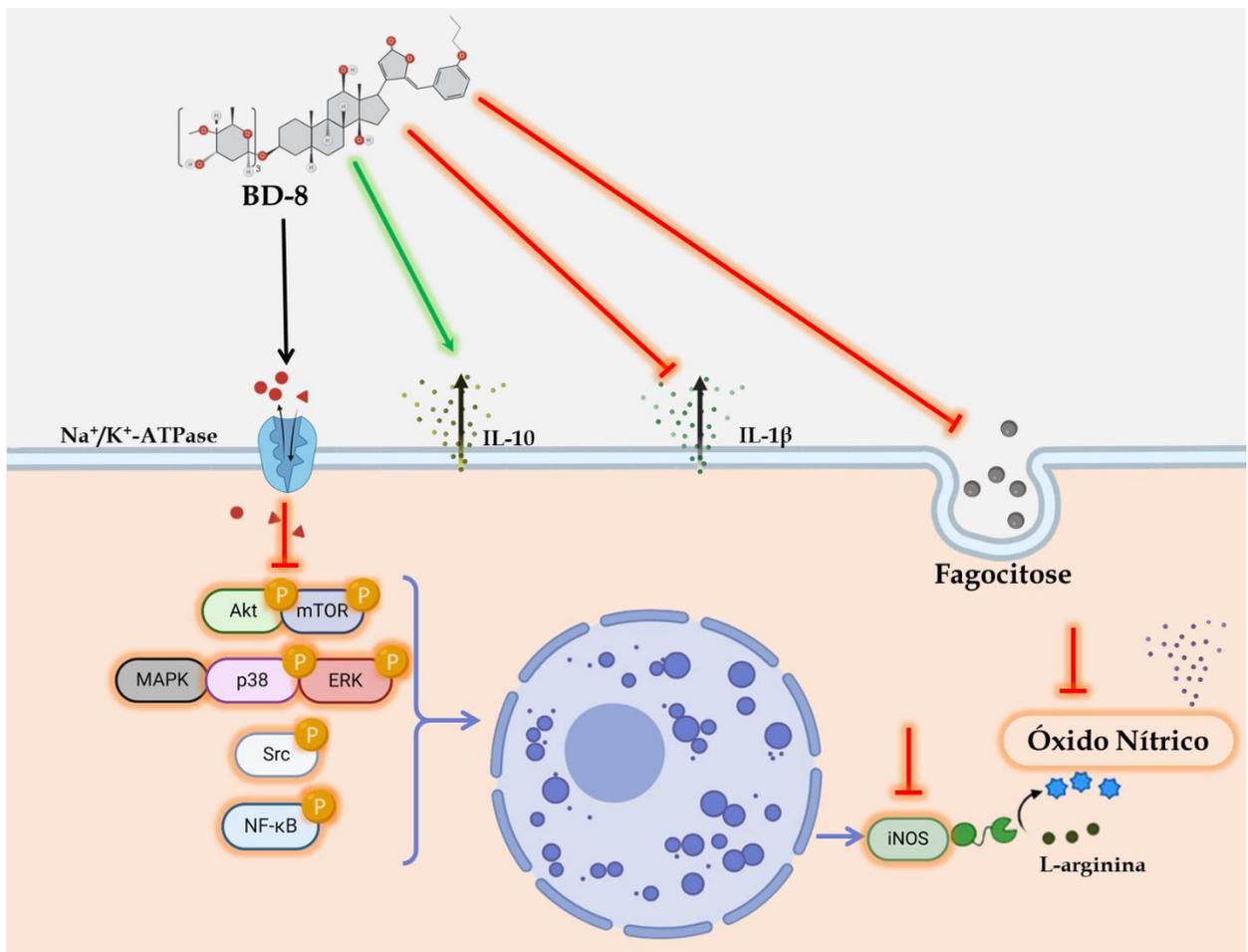
**CONCLUSÃO**



## 7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, pode-se dizer que a molécula BD-8 possui um efeito imunomodulador, *in vitro*, pela diminuição dos níveis de NO, citocina IL-1 $\beta$  e da capacidade fagocítica de macrófagos e aumento da IL-10. Tais efeitos do BD-8 podem ser explicados pela interação da molécula na inibição nas vias de sinalização: Inibição da enzima iNOS; Via de sinalização Akt/mTOR; Via das MAPKs p38 e ERK; Inibição da translocação do NF- $\kappa$ B p65 e da via de sinalização envolvendo a Src (Figura 21). Vale salientar, além disso, que mais estudos são necessários, para desvendar ainda mais os mecanismos de sinalizações celulares que dão a molécula BD-8 a propriedade de imunomodulação.

**Figura 21** - Potencial mecanismo de sinalização do efeito imunomodulador do BD-8.



**Fonte:** Elaborado pelo autor, 2024. Criado no biorender.com.

## REFERÊNCIAS

ALLER, M. A. *et al.* The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202-209, 2007.

ALVES, S. L. G. *et al.*  $\gamma$ -Benzylidene digoxin derivatives synthesis and molecular modeling: Evaluation of anticancer and the Na,K-ATPase activity effect. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4397–4404, 1 ago. 2015.

ANDRABI, S. M. *et al.* Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. **Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 10, n. 30, p. e2303259, 1 out. 2023.

ARAUJO, E. *et al.* Structural Implications of STAT3 and STAT5 SH2 Domain Mutations. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1757–1757, 2019.

BAO, H. R. *et al.* Relationship between PI3K/mTOR/RhoA pathway regulated cytoskeletal rearrangements and phagocytic capacity of macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 7, e9207, 2020.

BARBALATA, C. I. *et al.* Statins in risk-reduction and treatment of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 8, p. 573–588, 24 ago. 2020.

BARWE, S. P. *et al.* Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 3, p. 1082–94, 2005.

BLAUSTEIN, M. P.; HAMLIN, J. M. Sensational site: the sodium pump ouabain-binding site and its ligands. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 326, n. 4, p. C1120–C1177, 1 abr. 2024.

BORASCHI, D. *et al.* Structure-function relationship in the IL-1 family. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 1, n. 4, p. 270-308, 1996.

CAREY, A. J.; TAN, C. K.; ULETT, G. C. Infection-induced IL-10 and JAK-STAT. **JAK-STAT**, v. 1, n. 3, p. 159–167, jul. 2012.

CARVALHO, D. C. M. *et al.* Antiviral activity of ouabain against a Brazilian Zika virus strain. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 12598, 2022.

CARVALHO, D. C. M. *et al.* Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–11, 2019.

CASSADO, A. A.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; BORTOLUCI, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 225, 2015.

CAVAILLON, J.-M. Once upon a time, inflammation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2021.

- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. *et al.* Much More than a Cardiotoxic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 10 nov. 2017.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. *et al.* Ouabain inhibits p38 activation in mice neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 6, p. 1829–1833, 18 nov. 2021.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; LIMA, E. A.; CARVALHO, D. C. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 787-793, 2020.
- CHAKRAVORTTY, D.; HENSEL, M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 621-627, 2003.
- CHEN, S. *et al.* Site-Selective Tyrosine Phosphorylation in the Activation of the p50 Subunit of NF- $\kappa$ B for DNA Binding and Transcription. **ACS Chemical Biology**, v. 18, n. 1, p. 59–69, 19 dez. 2022.
- COULTHARD, L. R. *et al.* p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 8, p. 369–379, ago. 2009.
- CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **The Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 403–417, 1 ago. 2010.
- DAOUSSIS, D. *et al.* Adrenocorticotrophic hormone: an effective “natural” biologic therapy for acute gout?. **Rheumatology International**, v. 40, n. 12, p. 1941–1947, 1 dez. 2020.
- DE SOUZA GONÇALVES, B. *et al.* Evaluation of neuroprotective activity of digoxin and semisynthetic derivatives against partial chemical ischemia. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 17108–17122, 1 out. 2019.
- EL-SEEDI, H. R. *et al.* Chemistry and the Potential Antiviral, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities of Cardiotoxic Steroids Derived from Toads. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6586, 5 out. 2022.
- ERDOGAN, M. A. *et al.* Digoxin exhibits neuroprotective properties in a rat model of dementia. **Neurochemical Research**, v. 47, n. 5, p. 1290-1298, 2022.
- FAN, X. *et al.* Evodiamine Inhibits Zymosan-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo: Inactivation of NF- $\kappa$ B by Inhibiting I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylation. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 1012–1027, 23 mar. 2017.
- FARAJ, S. E. *et al.* Measurements of Na<sup>+</sup>-occluded intermediates during the catalytic cycle of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase provide novel insights into the mechanism of Na<sup>+</sup> transport. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 2, p. 102811, 1 fev. 2023.
- FIELDS, J. K.; GÜNTHER, S.; SUNDBERG, E. J. Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1412, 2019.
- FILIPPI, M.-D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2149–2158, 16 maio 2019.

- FORSHAMMAR, J. *et al.* Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31586-31597, 2011.
- FOX, S. B. *et al.* Bioactive Steroid Marinobufagenin in a Mouse Model of Early- Stage Alzheimer's Disease. **The FASEB Journal**, v. 36, 2022.
- FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets - Inflammation and allergy**. v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.
- GALVÃO, J. *et al.* Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflamm Res**, v. 66, p. 1117-1130, 2017.
- GALVÃO, J. *et al.* Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice. **International immunopharmacology**, v. 109, 2022.
- GANTNER, B. N. *et al.* Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-like Receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107–1117, 28 abr. 2003.
- GHASEMI, M. Nitric oxide: Antidepressant mechanisms and inflammation. **Advances in pharmacology**, v. 89, p. 121–152, 1 jan. 2019.
- GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacologia**. 3<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**. v. 17, n. 11, p. 977-86, 1995.
- 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.
- GROFT, S. G. *et al.* Toll-Like Receptor 2-Tpl2-Dependent ERK Signaling Drives Inverse Interleukin 12 Regulation in Dendritic Cells and Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 1, 15 dez. 2020.
- GRÖNLOH, M. L. B.; ARTS, J. J. G.; VAN BUUL, J. D. Neutrophil transendothelial migration hotspots – mechanisms and implications. **Journal of Cell Science**, v. 134, n. 7, p. jcs255653, 2021.
- HAFNER, S.; SCHMIECH, M.; LANG, S. J. The Cardenolide Glycoside Acovenoside A Interferes with Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 5 maio 2021.
- HASHEMI GORADEL, N. *et al.* Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5683–5699, 2018.

HUBER, R. *et al.* MARCKS Is an Essential Regulator of Reactive Oxygen Species Production in the Monocytic Cell Type. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1600–1600, 18 ago. 2022.

IHENETU, K. *et al.* Digoxin and digoxin-like immunoreactive factors (DLIF) modulate the release of pro-inflammatory cytokines. **Inflammation research**, v. 57, p. 519-523, 2008.

JANARTHANAN, K.; ADALARASAN, S. Cox-2 inhibitors in mandibular third molar surgery. **Journal of Medicine and Life**, v. 12, n. 2, p. 150–155, 2019.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

KIM, D.-K. *et al.* Pseudomonas aeruginosa-Derived DnaJ Induces the Expression of IL-1 $\beta$  by Engaging the Interplay of p38 and ERK Signaling Pathways in Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15957, 3 nov. 2023.

KIM, S. P. *et al.* Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates mTOR signal pathways and protein translation in the rat frontal cortex. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 45, p. 73–82, 1 ago. 2013.

KINOSHITA, P. F. *et al.* Signaling function of Na, K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, p. 1-13, 2014.

KLEINERT, H.; SCHWARZ, P. M.; FÖRSTERMANN, U. Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 10-11, 7 jan. 2003.

KOLACZKOWSKA, E. *et al.* Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 492–504, jun. 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 1, p. 33–42, 2001.

KOLB, H. Obese visceral fat tissue inflammation: from protective to detrimental? **BMC Medicine**, v. 20, n. 1, 2022.

KRAVTSOVA, V. V. *et al.* Low Ouabain Doses and AMP-Activated Protein Kinase as Factors Supporting Electrogenesis in Skeletal Muscle. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 84, n. 9, p. 1085–1092, 2019.

KULIKOV, A. *et al.* Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1691–1702, 2007.

KUMAR, A.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Pharmacology of Src family kinases and therapeutic implications of their modulators. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 115–130, 2015.

LEIJH, P. C. *et al.* Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. **Infection and immunity**, v. 46, n. 2, p. 448-452, 1984.

LEITE *et al.* The  $\alpha 2$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoform mediates LPS-induced neuroinflammation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

LEITE, *et al.* Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. **Mediators Inflamm**, 265798, 2015.

LIND, M. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 93, p. 370–375, 2017.

LIU, L. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 5, p. H2173–H2182, 2004.

LIU, Z. *et al.* Polystyrene nanoplastic induces ROS production and affects the MAPK-HIF-1/NF $\kappa$ B-mediated antioxidant system in *Daphnia pulex*. **Aquatic Toxicology**, v. 220, p. 105420, 2020.

LU, M.; VARLEY, A. W. Harvest and culture of mouse peritoneal macrophages. **Bioprotocol**, v. 3, n. 22, p. e976, 2013.

LV, Y. *et al.* PI3K/Akt-Beclin1 signaling pathway positively regulates phagocytosis and negatively mediates NF- $\kappa$ B-dependent inflammation in *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 510, n. 2, p. 284–289, 2019.

MA, M.; JIANG, W.; ZHOU, R. DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases. **Immunity**, v. 57, n. 4, p. 752–771, 2024.

MASUDA, Y. *et al.* Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 19, p. 549–556, 1995.

MASUMOTO, J. *et al.* Molecular biology of autoinflammatory diseases. **Inflammation and Regeneration**, v. 41, n. 1, 2021.

MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. **Science**, v. 374, n. 6571, p. 1070–1075, 2021.

MEGHA, KB. *et al.* Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders. **Phytomedicine**, v. 91, p. 153712, 2021.

MIJATOVIC T. *et al.* The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor  $\kappa$ B-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 2, p. 391–399, 2006.

MIJATOVIC, T.; KISS, R. Cardiotonic steroids-mediated Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase targeting could circumvent various chemoresistance pathways. **Plana Med**, v. 79, p. 189-198, 2013.

- NAGAHAWATTA, D. P. *et al.* Eckmaxol Isolated from *Ecklonia maxima* Attenuates Particulate-Matter-Induced Inflammation in MH-S Lung Macrophage. **Marine Drugs**, v. 20, n. 12, p. 766, 7 dez. 2022.
- NAGARAJU, G. P.; EL-RAYES, B. F. Cyclooxygenase-2 in gastrointestinal malignancies. **Cancer**, v. 125, n. 8, p. 1221–1227, 2019.
- NEWMAN, R. A. *et al.* Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 5, n. 3, p. 167–181, 2006.
- ORELLANA *et al.* Cardiotonic Steroids as Modulators of Neuroinflammation. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, 16 fev. 2016.
- ORTIZ, M. A. *et al.* Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition. **Cell Communication and Signaling**, v. 19, n. 1, 30 jun. 2021.
- OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, abr. 2019.
- PALUMBO, S. *et al.* PKB $\beta$ /AKT2 deficiency impacts brain mTOR signaling, prefrontal cortical physiology, hippocampal plasticity and select murine behaviors. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 411–428, 2020.
- PARK, M. Y. *et al.* Scutellarein Inhibits LPS-Induced Inflammation through NF- $\kappa$ B/MAPKs Signaling Pathway in RAW264.7 Cells. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3782, 12 jun. 2022.
- PESSÔA, M. TC. *et al.* Selectivity analyses of  $\gamma$ -benzylidene digoxin derivatives to different Na, K-ATPase  $\alpha$  isoforms: a molecular docking approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 85-97, 2018.
- RAHAT, M. A. *et al.* Oxygen Mitigates the Inflammatory Response in a Model of Hemorrhage and Zymosan-Induced Inflammation. **Shock**, v. 45, n. 2, p. 198–208, 2016.
- REGLERO-REAL, N. *et al.* Autophagy modulates endothelial junctions to restrain neutrophil diapedesis during inflammation. **Immunity**, v. 54, n. 9, p. 1989-2004.e9, set. 2021.
- REYES-GORDILLO, K. *et al.* Akt1 and Akt2 Isoforms Play Distinct Roles in Regulating the Development of Inflammation and Fibrosis Associated with Alcoholic Liver Disease. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1337, 2019.
- ROCHA, S. C. *et al.* 21-Benzylidene digoxin: a proapoptotic cardenolide of cancer cells that up-regulates Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e108776, 2014.
- ROGNANT, S. *et al.* The microtubule network enables Src kinase interaction with the Na,K-ATPase to generate Ca<sup>2+</sup> flashes in smooth muscle cells. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1007340, 2022.

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

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

SOARES, C. L. R. *et al.* Biochemical aspects of the inflammatory process: A narrative review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 168, p. 115764, 2023.

STRZELEC, M. *et al.* Immunomodulation—a general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 9 mar. 2023.

SUAREZ R, BUELVAS N. Inflammasome: activation mechanisms. **Investigacion clinica**, v. 56, n. 1, p. 074-099, 2015.

SUL, O.-J.; RA, S. W. Quercetin Prevents LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating NOX2/ROS/NF- $\kappa$ B in Lung Epithelial Cells. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6949, 17 nov. 2021.

SZILVESZTER, K. P.; NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. Tyrosine Kinases in Autoimmune and Inflammatory Skin Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 9 ago. 2019.

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

VASCONCELOS *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators inflamm**, 912925, 2011.

VIEIRA, L. *et al.* 21-Benzylidene digoxin, a novel digoxin hemi-synthetic derivative, presents an anti-inflammatory activity through inhibition of edema, tumour necrosis factor alpha production, inducible nitric oxide synthase expression and leucocyte migration. **International Immunopharmacology**, v. 65, p. 174–181, dez. 2018.

WANG, H. *et al.* Frugoside delays osteoarthritis progression via inhibiting miR-155-modulated synovial macrophage M1 polarization. **Rheumatology**, v. 60, n. 10, p. 4899–4909, 26 jan. 2021.

WEN, L. *et al.* Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of Bufalin in Rodents. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

WESTENBERGER, G. *et al.* Function of Mitogen-Activated Protein Kinases in Hepatic Inflammation. **Journal of Cellular Signaling**, v. 2, n. 3, p. 172–180, 2021.

WILLOUGHBY, D. A. *et al.* Resolution of inflammation. **Int J Immunopharmacol**, v. 22, p.1131-1135, 2000.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93-106, 2006.

- XIA, X. *et al.* A novel tumor suppressor protein encoded by circular AKT3 RNA inhibits glioblastoma tumorigenicity by competing with active phosphoinositide-dependent Kinase-1. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, 2019.
- XU, Y. *et al.* Bioassay-Guided Fractionation and Biological Activity of Cardenolides from *Streptocaulon juvenas*. **Planta Medica**, v. 89, n. 15, p. 1444–1456, 1 dez. 2023.
- YANG Q. *et al.* Cardiac glycoside inhibit TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9631–9636, 2005.
- YANG, X.-S. *et al.* Ouabain suppresses the growth and migration abilities of glioma U-87MG cells through inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway and downregulating the expression of HIF-1 $\alpha$ . **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 4, p. 5595–5600, 2018.
- YU, T.; LAO, X.; ZHENG, H. Influencing COX-2 Activity by COX Related Pathways in Inflammation and Cancer. **Mini-reviews in medicinal chemistry/Mini-reviews in medical chemistry**, v. 16, n. 15, p. 1230–1243, 2016.
- ZHAKEER, Z. *et al.* Bufalin Inhibits the Inflammatory Effects in Asthmatic Mice through the Suppression of Nuclear Factor-Kappa B Activity. **Pharmacology**, v. 99, n. 3-4, p. 179–187, 2017.
- ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation, and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.
- ZHAO, J.; LUO, Z. Discovery of Raf Family Is a Milestone in Deciphering the Ras-Mediated Intracellular Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5158, 2022.
- ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. Signaling pathways involved in zymosan phagocytosis induced by two secreted phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom in macrophages. **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 575–582, 2018.

## ANEXO A- Certificado de aprovação do projeto emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



**Universidade  
Federal da  
Paraíba**



Universidade Federal da Paraíba

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

### CERTIFICADO : EMENDA v15/11/2022

Certificamos que a EMENDA (versão de 15/11/2022) da proposta intitulada "Avaliação da atividade anti-inflamatória de esteroides cardiotônicos em macrófagos peritoneais", CEUA nº 5274120522 (ID 017192), sob a responsabilidade de **Sandra Rodrigues Mascarenhas e equipe; Davi Azevedo Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) em 21/06/2023.

Pedido apresentado à CEUA: Solicitação de modificação do projeto, para aumento do período em que será realizado, bem como acréscimo de novos membros do projeto e novos métodos que serão realizados.

Considerações da CEUA: Trata-se de Emenda ao Projeto:  Avaliação da atividade anti-inflamatória de esteroides cardiotônicos em macrófagos peritoneais ", coordenado pela Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas. A coordenadora solicita aumento do período em que será realizado, bem como acréscimo de novos membros do projeto e novos métodos que serão realizados. Foi apresentado um cronograma detalhado de atividades a serem realizadas até setembro de 2024, no âmbito de uma dissertação de mestrado. A coordenadora apresenta o Sr. Davi Azevedo Ferreira, pesquisador que também participará na execução da pesquisa durante o período de prorrogação de prazo solicitada, e o mesmo também assinou o Termo de Compromisso do Pesquisador e Equipe. Assim, considerando o exposto acima, somos favoráveis à emenda ao projeto em tela. A Comissão.

Término previsto: 09/2024

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Camundongos heterogênicos      sexo: Fêmeas      idade: 6 a 8 semanas      Quantidade solicitada: 130

Linagem: Swiss      Peso: 25 a 30 g

#### ANIMAIS UTILIZADOS

|                           |        | Total Aprovado | Quantidade Utilizada |
|---------------------------|--------|----------------|----------------------|
| Camundongos heterogênicos | Fêmeas | 208            | 0                    |

João Pessoa, 19 de maio de 2024

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba



## ANEXO B- Paper submetido na revista Cells, já em processo de revisão

### Manuscript Information Overview

|                    |  |
|--------------------|--|
| Manuscript ID      | cells-3161513  |
| Status             | Under review   |
| Article type       | Article  |
| Title              | Evaluation of anti-inflammatory activity of the new cardiotonic steroid $\gamma$ -Benzylidene Digoxin 8 (BD-8) in mice   |
| Journal            | Cells  |
| Abstract           | Cardiotonic steroids (e.g., ouabain, marinobufagenin) bind to Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase and modulate various biological processes, including the immune response. The synthetic cardiotonic steroid $\gamma$ -Benzylidene Digoxin 8 (BD-8) emerges as a promising immunomodulatory molecule, although it has remained largely unexplored. Therefore, we tested the immunomodulatory potential of BD-8 both in vitro and in vivo. Hence, primary mouse macrophages were incubated with combinations of BD-8 and the pro-inflammatory fungal protein zymosan (ZYM). Nitric oxide (NO) production was determined by Griess reagent and cytokines production was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. Inducible nitric oxide synthase (iNOS), reactive oxygen species (ROS), p-nuclear factor kappa B p65 (NF- $\kappa$ B p65), p-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), and p-p38 were evaluated by flow cytometry. Macrophages exposed to BD-8 displayed reduced phagocytic activity, NO levels, and production of the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ induced by ZYM. Furthermore, BD-8 diminished the expression of iNOS and phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65, ERK, and p38. Additionally, BD-8 exhibited anti-inflammatory capacity in vivo in a carrageenan-induced mouse paw edema model. Taken together, these findings demonstrate the anti-inflammatory activity of BD-8 and further reinforce the potential of cardiotonic steroids and their derivatives as immunomodulatory molecules. |
| Keywords           | Macrophages; Phagocytosis; IL-1 $\beta$ ; NF- $\kappa$ B; ERK; p38; Inflammation.  |
| Manuscript File    | manuscript.docx  |
| PDF File           | manuscript.pdf   |
| Supplementary File | manuscript-supplementary.pdf   |

cells

MDPI

Article

**Evaluation of anti-inflammatory activity of the new cardiotonic steroid  $\gamma$ -Benzylidene Digoxin 8 (BD-8) in mice**

Davi Azevedo Ferreira<sup>1</sup>, Anna Beatriz Araujo Medeiros<sup>1</sup>, Mariana Mendonça Soares<sup>1</sup>, Éssia de Almeida Lima<sup>1</sup>, Gabriela Carolina Santos Lima de Oliveira<sup>1</sup>, Mateus Bernardo da Silva Leite<sup>1</sup>, Matheus Vieira Machado<sup>1</sup>, José Augusto Ferreira Perez-Villar<sup>1</sup>, Leandro Augusto Barbosa<sup>1</sup>, Cristoforo Scavone<sup>1</sup>, Marcelo Tigre Moura<sup>1</sup>, Sandra Rodrigues Mascarenhas<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup> Laboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, CEP: 58.051-900; daviavevedoferreira@lft.ufpb.br (D.A.F.); annabeatriz@gmail.com (A.B.A.M.); marimmoos@gmail.com (M.M.S.); essia\_almeida@hotmail.com (E.A.L.); gabrielacarolina10@gmail.com (G.C.S.L.O.); mateusvidalmb@gmail.com (M.B.S.L.); sandra@biotec.ufpb.br (S.R.M.); <sup>2</sup> Laboratory of Cellular Biochemistry, Campus Centro-Oeste Dona Luíza, Federal University of São João del-Rei, Diamantina, Minas Gerais, Brazil, CEP: 35.501-296; matheusmg15@gmail.com (M.V.M.); zevilliar@ufsj.edu.br (J.A.F.P.V.); lbarbosa.ufsj@gmail.com (L.A.B.); <sup>3</sup> Laboratory of Cellular Reprogramming, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, CEP: 58.051-900; marcelotmoura@gmail.com (M.T.M.); <sup>4</sup> Laboratory of Neuropharmacology Research, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences-ICB-1, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, CEP: 05.508-900; cristoforo.scavone@gmail.com (C.S.); \*