



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

NOÊMIA NIELLY AMARAL NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES DAS
MOLÉCULAS BD-8, BD-15 E DIGOXINA EM MODELOS DE
INFECÇÃO COM *Mycobacterium smegmatis***

João Pessoa - PB
2024

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES DAS
MOLÉCULAS BD-8, BD-15 E DIGOXINA EM MODELOS DE
INFECÇÃO COM *Mycobacterium smegmatis***

Dissertação apresentada ao Programa
Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas do Centro de Biotecnologia da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Coorientador: Prof. Dr. Valnês Silva Rodrigues Junior



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Ata da Sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 18 de setembro de 2024.

Na data de dezoito de setembro do ano de dois mil e vinte e quatro às 09h00 (horário local), foi realizada, por meio da Plataforma Virtual Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do(a) discente **Noemia Nielly Amaral Nogueira**. O trabalho tem como título “Avaliação dos efeitos imunomoduladores das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina em modelos de infecção com *Mycobacterium smegmatis*”. A banca examinadora foi constituída pelo(a) orientador(a) Prof.^ª Dr.^ª Sandra Rodrigues Mascarenhas, na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinador externo) Prof.^ª Dr.^ª Dayane Pessoa de Araújo (UERN) e pelo 2º examinador (examinador interno) Prof.^ª Dr.^ª Fabíola da Cruz Nunes (UFPB), estando presente também o coorientador Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Júnior(UFPB). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do(a) candidato(a) por cada membro da banca examinadora, tendo o(a) candidato(a) o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o(a) candidato(a) APROVADO(A). De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o(a) discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Prof.^ª Dr.^ª Sandra Rodrigues Mascarenhas

Documento assinado digitalmente
gov.br SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS
Data: 27/09/2024 10:44:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Dayane Pessoa de Araújo

Documento assinado digitalmente
gov.br DAYANE PESSOA DE ARAUJO
Data: 26/09/2024 11:26:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Fabíola da Cruz Nunes

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIOLA DA CRUZ NUNES
Data: 18/09/2024 11:17:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Júnior

Documento assinado digitalmente
gov.br VALNES DA SILVA RODRIGUES JUNIOR
Data: 26/09/2024 23:12:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N763a Nogueira, Noêmia Nielly Amaral.

Avaliação dos efeitos imunomoduladores das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina em modelos de infecção com *Mycobacterium smegmatis* / Noêmia Nielly Amaral Nogueira. - João Pessoa, 2024.

61 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas, Valnês Silva Rodrigues Júnior.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/João Pessoa.

1. Esteróide cardiotônico. 2. Micobactéria. 3. Citocinas. 4. Na⁺/K⁺-ATPase. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Rodrigues Júnior, Valnês Silva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.92(043)

***Dedico a Deus, Ele que é o
meu auxílio, minha paz e amigo fiel.
Aos meus pais e ao meu irmão que são
os amores da minha vida, a parte
mais linda do meu coração.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, o meu sustento, minha força e minha paz, toda a minha gratidão. Confio unicamente em seu poder e no seu formoso tempo para todas as coisas. Reconheço que tudo provém dEle e que sou passível de sua infinita misericórdia. Diante das dificuldades, das crises de ansiedade, das limitações físicas e mentais, o Seu poder se aperfeiçoou na minha fraqueza e alegremente repousei nEle, crendo em seu infinito amor. Me vejo neste momento como o Salmista, perguntando a Deus o que o daria diante todos os benefícios que Ele tem me concedido. Somente a Ele toda honra, glória e louvor. Ele me protegeu como a menina dos Seus olhos. Me guardou nas viagens Solânea á João Pessoa e nas viagens João Pessoa á Mossoró. Obrigada por todos os livramentos e bênçãos derramadas.

Aos meus amados pais, **Gilian Amaral** e **Evaldo Nogueira**, vocês são a manifestação do amor e cuidado do Senhor para comigo. Vocês me ensinam diariamente a trilhar os melhores caminhos com honestidade, empatia e a luz da palavra do Senhor. Agradeço por ter investido na minha formação pessoal e profissional. Vocês acreditaram, confiaram e me incentivaram na realização desse sonho. Vocês são meu espelho de determinação e superação, o qual sempre procurarei seguir. Ao meu meu irmão, **Emídio Neto**, agradeço a Deus por sua vida, por nossa amizade e por todo companheirismo que temos. Sempre será eu por você e você por mim. Amo vocês infinito!

Dedico essa conquista aos meus eternos avós paternos, **Maria Daniel** e **Emídio Nogueira**. Meus queridos avós que me encheram de muito carinho e amor. Sou eternamente grata a eles que tanto me ensinaram com suas histórias de vida e por me abençoarem do céu. Amarei vocês eternamente!

Aos meus avós **Mirian Amaral** e **Jucimar Cândido**, meus tios **Jucimara Amaral**, **Jucian Jad** e **Alberis Morgan**, minhas amadas primas **Ana Lorena** e **Ana Elis** obrigada por encherem minha trajetória de amor e leveza.

A minha amiga e irmã **Leandra Oliveira**, minha companheira e parceira de todos os momentos, que com o seu incentivo, suas palavras de ânimo e sua fé, tanto me ajudou a prosseguir. Estendo minha gratidão a minha amada amiga e eterna parceira de laboratório, **Amanda Santos**, com você eu aprendi a ter foco, determinação e coragem. Serás para sempre minha companheira de laboratório e de vida. Vocês, mesmo distantes, são as melhores da minha vida. Amo vocês!

Ao meu amado grupo do laboratório, aos amigos que Deus me presenteou ao longo do mestrado, literalmente, o mestrado não teria sido possível sem vocês. Meus nobres amigos: **Anna Beatriz**, **Davi**, **Daniel**, **Eugênia**, **Maria Gabriella**, **Mariana**, **Deyse**, **Allysson** e **Luiz Agra** foram instrumentos de Deus na minha vida durante esses dois anos. Sou feliz por ter partilhado momentos únicos ao lado de vocês. Agradeço especialmente a minha amiga **Anna Beatriz** por ter sido um ombro amigo quando quis desistir e por ter me dado forças para continuar. Obrigada por ser uma irmã pra mim dentro e fora da UFPB. Todos vocês fizeram desta jornada, a leveza. Muitíssimo obrigada. A todos os meus amigos que fizeram parte dessa

trajetória e em especial aos amigos que conquistei durante a temporada de Mossoró, meus amigos **Erik, Rafânia e Roque**. Pessoas do bem, amigos do meu coração que me acolheram na UERN. Amo todos vocês!

A minha querida e gentil orientadora, **Sandra Rodrigues Mascarenhas**, minha eterna e mais sincera gratidão. Obrigada por ser tão prestativa e se entregar inteiramente ao que ama. A senhora zelou por mim e por meu mestrado até o fim. Obrigada por ter me recebido, me acolhido e ter enfrentado trancos e barrancos. A senhora me inspira no pessoal e no profissional. Agradeço por ter aceitado ser minha orientadora e ter cuidado de mim nesses dois anos. Se esse Mestrado se tornou real, foi com sua riquíssima ajuda.

Ao meu querido e especial coorientador **Valnês Silva Rodrigues Júnior** que em meio às dificuldades, sempre me dizia: “vai dar tudo certo”. Obrigada por ter sido a calma em meio ao caos. Obrigada por todos ensinamentos e por sempre ter chegado junto comigo em todas as etapas. Obrigada por ter embarcado conosco nesses dois anos e por ter sido disponível a me auxiliar em todos os momentos.

Agradeço a todos os professores do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os ensinamentos e por toda contribuição na minha formação.

Aos professores membros da Banca Examinadora, **Fabiola Nunes, Dayane Pessoa e José Marreiro** pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Minha gratidão a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste mestrado.

Muito obrigada!

“Everything is possible for the one who believes”

RESUMO

Os esteroides cardiotônicos são compostos orgânicos que têm a propriedade de inibir a Na^+/K^+ -ATPase. Foi descrito na literatura que a ouabaína e a digoxina são moléculas endógenas capazes de interferir em diversos aspectos da resposta imunológica. Recentemente, novos esteroides cardiotônicos foram sintetizados a partir da digoxina: BD-8 (8-benzilideno digoxina) e BD-15 (15-benzilideno digoxina). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito destes compostos em processos inflamatórios e infecciosos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina em modelos de infecção por *Mycobacterium smegmatis* utilizando linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Inicialmente, foram realizados ensaios *in vitro* de susceptibilidade frente *Mycobacterium smegmatis*. Para o estudo da viabilidade celular, foi utilizado o método de colorimétrico de MTT, com diferentes concentrações (10 μM , 5 μM , 1 μM , 0,1 μM e 0,01 μM), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a avaliação do efeito terapêutico, realizou-se a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em ensaios de placa, onde as células RAW foram infectadas com *Mycobacterium smegmatis* e tratadas com os esteroides. Para a dosagem de citocinas, foi utilizado o método imunoenzimático (ELISA). Avaliada a Concentração Inibitória Mínima (MIC), observou-se que as moléculas não inibiram o crescimento bacteriano em concentrações inferiores e igual a 200 μM . Nos resultados de viabilidade pelo método de MTT foi analisado que a BD-8 não apresentou atividade citotóxica em 24 horas, porém apresentou citotoxicidade em 10 μM e 5 μM em 48 horas, e 10 μM , 5 μM e 1 μM em 72 horas. A BD-15 não apresentou atividade citotóxica em nenhuma concentração e tempos testados e foi o esteroide sintético escolhido para a continuidade dos experimentos. A digoxina não apresentou atividade citotóxica no tempo de 24 horas, entretanto apresentou citotoxicidade 10 μM e 5 μM em 48 horas, e 10 μM e 1 μM em 72 horas. Com relação à contagem de UFC, a BD-15 e a digoxina reduziram o número de UFC's por poço em 10 μM em 24 horas comparado com o controle. Os resultados obtidos por meio da técnica de ELISA indicaram que o tratamento com digoxina não resultou em uma alteração estatisticamente significativa na produção de IL-10, apresentando apenas um aumento marginal de 2% em comparação ao controle infectado. Em contraste, o tratamento com BD-15 demonstrou um aumento de 19% na produção de IL-10. Quanto aos níveis de IL-1 β ,

observou-se uma redução de 58% com o tratamento da digoxina e com o tratamento da BD-15, ambos comparados ao controle infectado. Em relação à produção de TNF- α , o tratamento com digoxina promoveu um aumento de 41%, enquanto o tratamento com BD-15 resultou em um aumento de 42%, ambos em comparação ao controle infectado. As análises estáticas foram realizadas no prisma usando média \pm erro padrão da média e ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Portanto, este estudo aprofunda significativamente a compreensão do papel dos esteroides cardiotônicos na infecção por *Mycobacterium smegmatis*, oferecendo novas oportunidades para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e com menor toxicidade no tratamento de infecções micobacterianas.

Palavras-chave: Esteroide cardiotônico. Micobactéria. Citocinas. Na⁺/K⁺-ATPase.

ABSTRACT

Cardiotonic steroids are organic compounds that possess the ability to inhibit Na^+/K^+ -ATPase. The literature has documented that ouabain and digoxin are endogenous molecules capable of interfering with various aspects of the immune response. Recently, new cardiotonic steroids were synthesized from digoxin: BD-8 (8-benzylidene digoxin) and BD-15 (15-benzylidene digoxin). However, little is known about the effects of these compounds on inflammatory and infectious processes. In this context, the aim of this study is to evaluate the effects of BD-8, BD-15, and digoxin molecules in *Mycobacterium smegmatis* infection models using the RAW 264.7 murine macrophage cell line. Initially, in vitro susceptibility assays were performed against *Mycobacterium smegmatis*. For the study of cell viability, the MTT colorimetric method was used with different concentrations (10 μM , 5 μM , 1 μM , 0.1 μM , and 0.01 μM) at 24, 48, and 72 hours. For the evaluation of therapeutic effects, Colony Forming Units (CFU) counts were performed in plate assays where RAW cells were infected with *Mycobacterium smegmatis* and treated with the steroids. Cytokine levels were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. When evaluating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), it was observed that the molecules did not inhibit bacterial growth at concentrations lower than and equal to 200 μM . In the MTT viability results, BD-8 did not exhibit cytotoxic activity at 24 hours, but it showed cytotoxicity at 10 μM and 5 μM at 48 hours, and at 10 μM , 5 μM , and 1 μM at 72 hours. BD-15 did not exhibit cytotoxic activity at any concentrations or times tested and was selected as the synthetic steroid for further experiments. Digoxin did not exhibit cytotoxic activity at 24 hours but showed cytotoxicity at 10 μM and 5 μM at 48 hours, and at 10 μM and 1 μM at 72 hours. Regarding CFU counts, both BD-15 and digoxin reduced the number of CFUs per well at 10 μM after 24 hours compared to the control. The results obtained through the ELISA technique indicated that treatment with digoxin did not result in a statistically significant change in IL-10 production, showing only a marginal increase of 2% compared to the infected control. In contrast, treatment with BD-15 demonstrated a 19% increase in IL-10 production. Regarding IL-1 β levels, a 58% reduction was observed with both digoxin and BD-15 treatments compared to the infected control. In terms of TNF- α production, digoxin treatment led to a 41% increase, while BD-15 treatment resulted in a 42% increase, both compared to the

infected control. Static analyses were performed on the prism using mean \pm standard error of the mean and one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Therefore, this study significantly enhances the understanding of the role of cardiotonic steroids in *Mycobacterium smegmatis* infection, offering new opportunities for the development of more effective and less toxic therapies for the treatment of mycobacterial infections.

Keywords: Cardiotonic steroid. Mycobacteria. Cytokines. Na^+/K^+ -ATPase.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	Adrenocorticotropic hormone
ANOVA	Análise de variância
ANTI IL-1 β	Anti interleucina 1 β
ANTI IL-6	Anti interleucina 6
ANTI-TNF	Anti fator de necrose tumoral
APT	Attached proton test
Avidin-HRP	Avidin horseradish peroxidase
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BD-8	γ -Benzylidene Digoxin 8
BD-15	γ -Benzylidene Digoxin 15
C17'	Carbono 17
Ca ²⁺	Cálcio
CSFs	Colony-stimulating factors
DMEN	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimeltisulfóxido
ECTs	Esteroides cardiotônicos
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogenio
HBHA	Heparin-binding hemagglutinin adhesin
IFNs	Interferons
IgE	Imunoglobulina E
IL 1B	Interleucina 1B
IL- 4	Interleucina - 4
IL- 6	Interleucina - 6
IL- 8	Interleucina - 8
IL- 10	Interleucina - 10
IL- 13	Interleucina - 13
ILs	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LB	Meio Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK p38	Mitogen-activated protein kinase p38
MIC	Concentração inibitória mínima
MOI	Multiplicity of infection
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
Na ⁺ /Ca ²⁺	Trocador de sódio e cálcio
ATPase	Bomba de sódio e potássio ATPase
NF-KB	Fator de transcrição nuclear kappa B
OADC	Oleic acid albumin dextrose catalase
OD	Optical density

PBS	Solução fosfato tamponado
PBST	Solução fosfato tamponado contendo tween
PGE2	Prostaglandina E2
REMA	Resazurin microtiter assay
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura "Roswell Park Memorial"
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Transforming growth factor beta
TGFs	Transforming growth factors
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNFs	Tumor necrosis factors
UFC	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos esteroides cardiotônicos.....	16
Figura 2 - Estrutura tridimensional da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	17
Figura 3 - Estrutura química da BD-8.....	22
Figura 4 - Estrutura química da BD-15.....	22
Figura 5 - Ilustração do método de MTT.....	36
Figura 6 - Ilustração da metodologia das UFC's.....	37
Figura 7 - Esquema do método de ELISA.....	39
Tabela 1 - Controles positivos e concentrações testadas.....	41
Figura 2 - MIC das moléculas testadas.....	42
Figura 8 - Efeito da BD-8 na viabilidade de células RAW.....	43
Figura 9 - Efeito da BD-15 na viabilidade de células RAW.....	43
Figura 10 - Efeito da Digoxina na viabilidade de células RAW.....	44
Figura 11 - Análise das UFC's com as moléculas digoxina e BD-15 nas concentrações de 10 µM e 1 µM.....	45
Figura 12 - Análise das UFC's com as moléculas digoxina e BD-15 nas concentrações de 0.1 µM e 0.01 µM.....	46
Figura 13 - Efeito da BD-15 e Digoxina sobre os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1β.....	47
Figura 14 - Efeito da BD-15 e Digoxina sobre os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10.....	48
Figura 15 - Efeito da BD-15 e Digoxina sobre os níveis da citocina pró-inflamatória TNF-α.....	48
Figura 16 - Esquema representativo da conclusão da presente pesquisa.....	57

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Esteroides cardiotônicos.....	16
1.2 DIGOXINA, BD-8 E BD-15.....	20
1.3 Efeito de esteroides cardiotônicos na síntese de citocinas.....	22
1.4 Mycobacterium smegmatis.....	24
JUSTIFICATIVA	26
2. JUSTIFICATIVA.....	27
OBJETIVOS	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Obtenção da linhagem celular.....	31
4.2 Obtenção dos Esteroides Cardiotônicos.....	32
4.3 Manutenção da Mycobacterium smegmatis.....	32
4.4 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	33
4.5 Ensaio de viabilidade celular.....	34
4.6 Modelo de infecção com RAW e Mycobacterium smegmatis.....	35
4.7 Ensaio imunoenzimático para dosagem das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α	37
4.8 Análise estatística.....	38
RESULTADOS	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1 Interferência das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina na viabilidade do Mycobacterium smegmatis.....	40
5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	40
5.2 Efeitos das moléculas sobre as células RAW 264.7.....	41
5.2.2 Análise da viabilidade celular.....	41
5.3 Efeito das moléculas em modelo de infecção in vitro com Mycobacterium smegmatis utilizando células RAW 264.7.....	44
5.3.3 Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	44
5.4 Avaliação da produção de citocinas inflamatórias sobre os esteroides no processo de infecção micobacteriana in vitro.....	45
5.4.4 Análise de citocinas.....	45
DISCUSSÃO	48
6. DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÃO	55
7. CONCLUSÃO.....	56
Figura 16: Esquema representativo da conclusão da presente pesquisa.....	56
REFERÊNCIAS	57

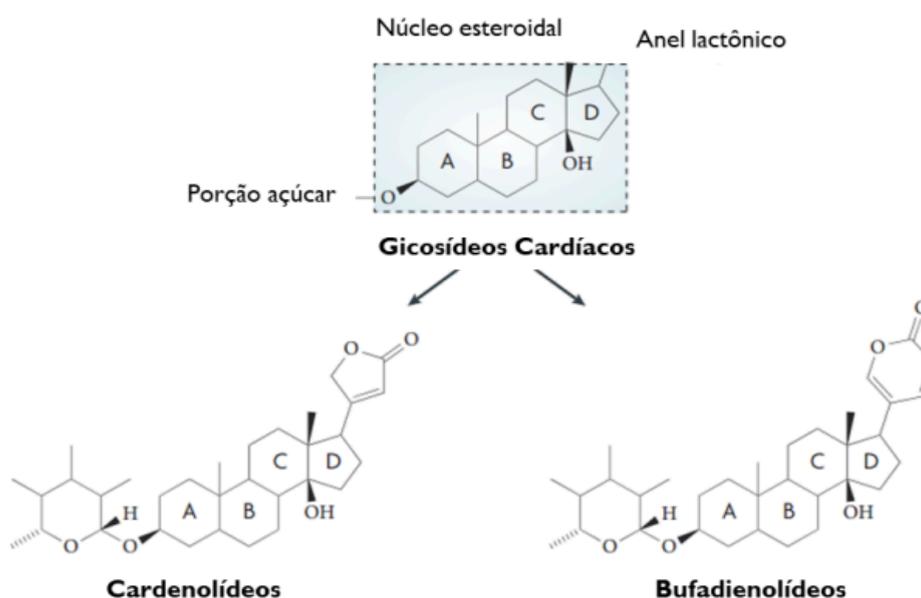
REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Esteroides cardiotônicos

Os esteroides cardiotônicos (ECTs) são compostos orgânicos que, em concentrações terapêuticas, possuem a propriedade de inibir a enzima Na^+/K^+ -ATPase. Estes compostos são caracterizados pela presença de um núcleo esteroidal contendo um anel de lactona insaturado na posição C17. Com base na estrutura do anel lactônico, os ECTs podem ser classificados em diferentes categorias. Especificamente, são designados como cardenolídeos quando o anel lactônico possui cinco membros, e bufadienolídeos quando o anel lactônico possui seis membros (DIEDERICH; MULLER; CERELLA, 2017).

Além disso, alguns esteroides cardiotônicos podem conter resíduos de açúcar na posição C3, formando compostos conhecidos como glicosídeos cardiotônicos. A presença desses resíduos de açúcar pode influenciar significativamente as propriedades farmacológicas e a biodisponibilidade dos ECTs (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Figura 1: Estrutura química dos esteroides cardiotônicos



Fonte: Adaptado de PRASSAS e DIAMANDIS, 2008.

Os cardenólídeos foram inicialmente isolados de plantas, destacando-se a ouabaína, originalmente extraída da espécie *Digitalis purpurea*, e a digoxina, proveniente da *Digitalis lanata* (KELLY; SMITH, 1994). Em contraste, os bufadienólídeos foram inicialmente identificados na pele e na glândula parótida de anfíbios. A marinobufagina, por exemplo, foi primeiramente isolada do veneno do sapo *Bufo marinus*, atualmente denominado *Rhinella marina* (DVELA et al., 2007; CARVALHO et al., 2019).

Subsequentemente, esses esteroides cardiotônicos foram também identificados endogenamente em mamíferos, sendo detectados no plasma, bile, glândula adrenal, placenta e urina (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009). Os principais locais de produção dos esteroides cardiotônicos endógenos foram identificados como o córtex adrenal e o hipotálamo, utilizando o colesterol como precursor dessas moléculas (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009). Contudo, as vias de biossíntese dos cardenólídeos e bufadienólídeos endógenos diferem substancialmente (SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2008).

Além disso, estudos têm demonstrado que a secreção desses esteroides é modulada por vários hormônios, incluindo angiotensina II, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), vasopressina e fenilefrina (LAREDO; HAMILTON; HAMLIN, 1995; PAVLOVIC, 2020). Esta modulação hormonal destaca a complexidade da regulação dos esteroides cardiotônicos endógenos e sugere uma interação entre diferentes sistemas fisiológicos na manutenção da homeostase cardiovascular.

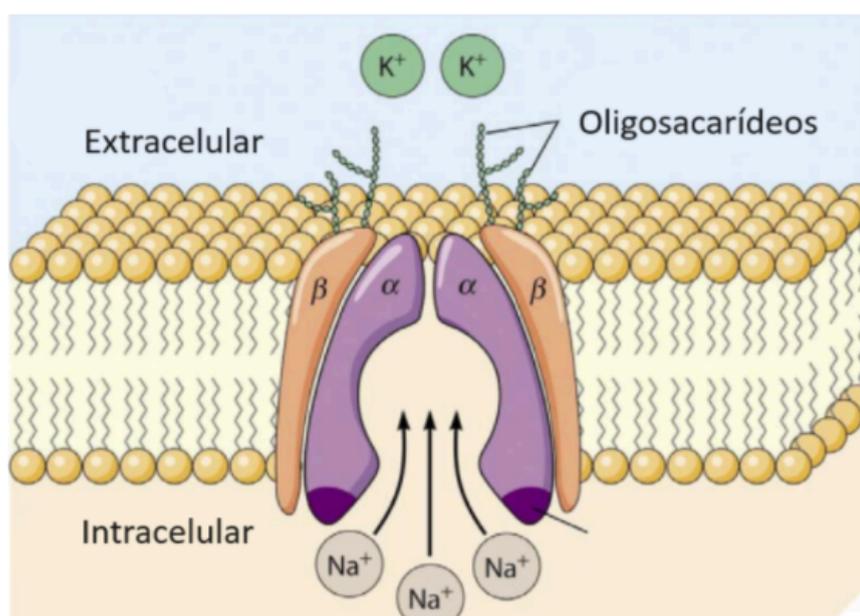
Conforme destacado em Blaustein (1993), a relação entre os esteroides cardiotônicos endógenos e a Na^+/K^+ -ATPase reforça o papel central dessa enzima na regulação cardiovascular. Enquanto a modulação hormonal dos esteroides cardiotônicos sugere uma interação entre diferentes sistemas fisiológicos na manutenção da homeostase, a Na^+/K^+ -ATPase atua como alvo direto desses compostos, desempenhando um papel fundamental na manutenção do equilíbrio iônico e do potencial de membrana. Assim, a interação entre esses esteroides e a enzima não apenas ilustra um mecanismo regulatório crucial, mas também evidencia como processos bioquímicos específicos podem integrar-se a respostas fisiológicas.

A Na^+/K^+ -ATPase é uma enzima integral da membrana plasmática que, por meio da hidrólise de ATP, promove o transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ . Sua principal

função é manter uma baixa razão Na^+/K^+ intracelular, garantindo a homeostase iônica e o potencial de membrana (SKOU; ESMANN, 1992).

Estruturalmente, a Na^+/K^+ -ATPase é composta por três subunidades principais: alfa (α), beta (β) e gama (γ). A subunidade α é responsável pela atividade catalítica e pelo transporte iônico, existindo em quatro isoformas distintas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$). A subunidade β , uma proteína transmembranar com quatro isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$), é essencial para a atividade normal da Na^+/K^+ -ATPase e contém vários locais de glicosilação (BLANCO, 2005; JORGENSEN; HÅKANSSON; KARLISH, 2003; KAPLAN, 2002). A subunidade γ interage com a Na^+/K^+ -ATPase desempenhando funções moduladoras e é considerada em alguns tecidos como a terceira subunidade dessa enzima (CORTES et al., 2011).

Figura 2: Diagrama detalhado ilustrando a estrutura tridimensional e os domínios funcionais da ATPase de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase), destacando as subunidades alfa e beta bem como os sítios de ligação de íons e a conformação durante o ciclo de bombeamento.



Fonte: Adaptado de MUN, 2023.

A utilização clínica dos esteroides cardiotônicos (ECTs) teve início em 1775, quando o médico inglês William Withering descobriu que extratos de plantas do gênero *Digitalis* auxiliavam pacientes com insuficiência cardíaca. Durante um longo período, os ECTs foram empregados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, mesmo sem um entendimento claro do mecanismo de ação (BLAUSTEIN, 1993; GOTO et al., 1992).

Atualmente, sabe-se que esses compostos exercem seus efeitos terapêuticos principalmente através da inibição da Na^+/K^+ -ATPase, resultando em um aumento da concentração intracelular de Na^+ , que secundariamente eleva a concentração intracelular de Ca^{2+} através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, melhorando assim a contratilidade cardíaca. A identificação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no músculo cardíaco de mamíferos revelou que a inibição da Na^+/K^+ -ATPase por ECTs produz um efeito inotrópico positivo, tornando esses compostos clinicamente relevantes no tratamento da insuficiência cardíaca (PAVLOVIC, 2020).

O transporte ativo de íons mediado pela Na^+/K^+ -ATPase (Figura 2) é crucial para diversas funções celulares, incluindo a manutenção do potencial de membrana, o transporte de nutrientes, a regulação do volume celular, a transmissão do impulso nervoso, a regulação da pressão osmótica e o controle do equilíbrio ácido-base no organismo. Além de sua função primordial como bomba iônica, foi demonstrado que a Na^+/K^+ -ATPase também atua como receptor, uma vez que os ECTs se ligam a ela e desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular.

Estudos comprovaram que, em concentrações baixas, os ECTs se ligam à Na^+/K^+ -ATPase sem inibir sua atividade, mas promovem mudanças conformacionais que ativam a quinase Src, a qual desempenha um papel crucial em diversas vias de transdução de sinal, regulando ativação, crescimento e proliferação celular (LIU; XIE, 2010). Dada a amplitude dos efeitos dos digitálicos sobre o sistema cardiovascular, sua utilização tem sido amplamente estudada no tratamento de diversas patologias, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, alergias, fibroses, entre outras (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Pesquisas têm elucidado a ação antiproliferativa e os efeitos apoptóticos desses compostos em variados tipos de câncer, como o de mama (KOMETIANI; LIU; ASKARI, 2005), pulmão (MIJATOVIC et al., 2006), melanoma (NEWMAN et al., 2006), leucemia (MASUDA et al., 1995) e neuroblastoma (KULIKOV et al., 2007). Dados indicam que os ECTs, no contexto do crescimento tumoral, atuam como inibidores e, conseqüentemente, induzem a morte de células cancerosas por apoptose e autofagia (NEWMAN et al., 2008).

Esses achados sugerem um potencial terapêutico significativo dos esteroides cardiotônicos além de suas tradicionais aplicações cardiológicas, abrindo novas perspectivas para o tratamento de doenças complexas e potencialmente letais. O entendimento das vias de sinalização e dos mecanismos moleculares pelos quais os

ECTs exercem seus efeitos antitumorais pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e mais eficazes no combate ao câncer e outras patologias.

1.2 DIGOXINA, BD-8 E BD-15

Os esteroides cardiotônicos γ -Benzilideno Digoxin 8 (BD-8) e γ -Benzilideno Digoxin 15 (BD-15) examinados neste estudo foram desenvolvidos por meio de ajustes na estrutura da digoxina utilizando métodos de síntese química, que incluíram a introdução de um grupo éter no anel lactona (PÊSSOA et al., 2018).

A digoxina, historicamente utilizada no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e arritmias, atua primariamente inibindo a Na^+/K^+ -ATPase, resultando em um aumento da concentração intracelular de cálcio que, por sua vez, melhora a contratilidade cardíaca (BLAUSTEIN, 1993; GOTO et al., 1992). Diante da Na^+/K^+ -ATPase, a BD-8 se mostrou com maior especificidade para a isoforma $\alpha 2$ e produção de atividade (PESSÔA et al., 2018). E a BD-15 possui uma maior afinidade pela isoforma $\alpha 3$ e tem a capacidade de aumentar a atividade enzimática (PARREIRA et al, 2021).

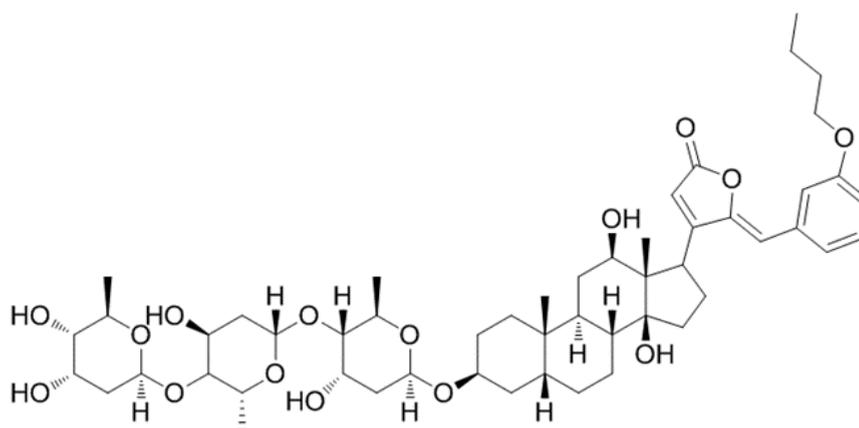
BD-8 e BD-15 são modificações estruturais da digoxina que têm sido investigadas por suas potencialidades terapêuticas em áreas além da cardiologia, incluindo o tratamento do câncer. Essas moléculas são sintetizadas através de modificações químicas na estrutura da digoxina que envolvem a introdução de grupos benzilideno na estrutura da digoxina, resultando em novas propriedades farmacológicas (PÊSSOA et al., 2018). O processo de síntese é realizado no Laboratório de Síntese Orgânica e Nanoestrutura da Universidade Federal de São João del-Rei, sob a coordenação do Prof. Dr. José Augusto Ferreira Perez Villar.

Assim como a digoxina, a BD-8 e a BD-15 inibem a Na^+/K^+ -ATPase, mas também interferem em outras vias de sinalização celular, demonstrando efeitos anticancerígenos promissores. Estudos preliminares sugerem que esses esteroides cardiotônicos sintéticos podem influenciar a proliferação celular, induzir apoptose e inibir o crescimento de células tumorais em modelos pré-clínicos (CARVALHO et al., 2019). Em especial, a BD-15 tem se destacado por sua eficácia contra cânceres agressivos, como melanoma e câncer de pulmão (KOMETIANI, LIU, ASKARI, 2005; MIJATOVIC et al., 2006).

Além de suas aplicações em oncologia, BD-8 e BD-15 também têm mostrado potencial em modulação de respostas inflamatórias. Recentemente, nosso grupo de pesquisa elucidou que a molécula BD-8 exerce um potente efeito anti-inflamatório em macrófagos murinos ativados por zimosan, indicando seu potencial terapêutico em processos inflamatórios (AZEVEDO et al., 2024, NO PRELO). A capacidade desses compostos de interferir nas vias de sinalização da Na^+/K^+ -ATPase sugere que eles poderiam ser eficazes em condições inflamatórias e autoimunes, embora estudos mais aprofundados sejam necessários para validar essas aplicações.

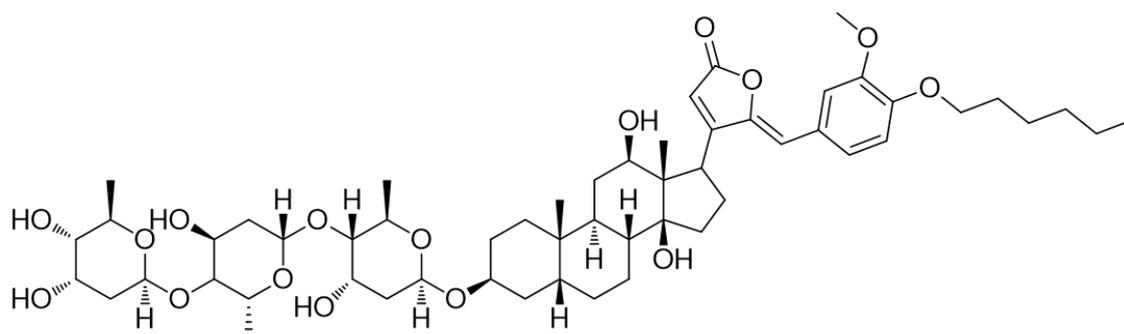
BD-8 e BD-15 representam um avanço significativo no campo dos esteroides cardiotônicos modificados, com potencialidades terapêuticas que se estendem além das doenças cardíacas. Os resultados pré-clínicos até o momento são promissores, indicando que esses compostos podem se tornar importantes agentes terapêuticos no tratamento de câncer e possivelmente em outras condições inflamatórias e autoimunes. No entanto, estudos adicionais são necessários para explorar completamente os mecanismos de ação desses compostos e validar suas aplicações clínicas (Figura 3 e 4: Estrutura química da BD-8 e BD-15 respectivamente com a inclusão do grupo éter no anel lactona).

Figura 3: Estrutura química da BD-8



Fonte: José Augusto Villar, 2022.

Figura 4: Estrutura química da BD-15



Fonte: José Augusto Villar, 2022.

1.3 Efeito de esteroides cardiotônicos na síntese de citocinas

As citocinas representam um grupo de proteínas liberadas por células ativadas, desempenhando papéis cruciais em diversas funções, incluindo crescimento, diferenciação e ativação celular (SMITH & JOHNSON, 2023). Esses mediadores inflamatórios são classificados em várias categorias: interleucinas (ILs), fatores estimuladores de colônias (CSFs), interferons (IFNs), fatores de necrose tumoral (TNFs), fatores de crescimento transformador (TGFs) e quimiocinas (CHEN et al., 2018). Além disso, as citocinas podem atuar sobre as próprias células que as produziram (ação autócrina), em células próximas (ação parácrina) e em células distantes (ação endócrina) (GARCIA & LEE, 2023).

No contexto da inflamação, esses mediadores são classificados como pró-inflamatórios, quando intensificam o processo inflamatório, e anti-inflamatórios, quando o reduzem (ZHANG, AN, 2007). Citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α são fundamentais na regulação da inflamação aguda e exibem um perfil imunológico pró-inflamatório, sendo produzidas por fibroblastos, linfócitos e fagócitos mononucleares (SCHETT, 2011). A IL-1 β desempenha um papel crucial na inflamação, promovendo o aumento da síntese de prostaglandina E2 (PGE2), estimulando a proliferação de células T e liberando histamina no local da inflamação. A IL-6 ativa leucócitos, promove células B e diferencia células T, enquanto o TNF- α estimula a produção de citocinas e quimiocinas leucocitárias, aumenta a expressão de moléculas de adesão, promove a síntese de PGE2 e suprime a atividade

reguladora das células T (FEGHALI, WRIGHT, 1997; SCHETT, 2011; SHAIKH, 2011).

Estudos sobre a digoxina e a marinobufagina em relação à neuroinflamação, especificamente no Alzheimer, indicaram que a marinobufagina reduziu os níveis da proteína precursora amiloide e de IL-6, enquanto a digoxina diminuiu os níveis cerebrais de TNF- α e a morte neuronal (ERDOGAN et al., 2022; FOX et al., 2022). No que tange à neuroinflamação, a eficácia da ouabaína foi comprovada em modelos *in vivo*, mostrando uma redução na ativação e translocação do NF- κ B, expressando iNOS e IL-1 β (KINOSHITA et al., 2014). Em modelos *in vitro*, observou-se a diminuição da liberação de IL-1 β em astrócitos estimulados por LPS (FORSHAMMAR et al., 2011).

Em modelos de inflamação periférica, a marinobufagina demonstrou atividade anti-inflamatória *in vitro*, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Em modelos *in vivo*, diminuiu os níveis de IL-1 β e IL-6 na cavidade peritoneal e a migração de células polimorfonucleares (CARVALHO et al., 2019). A digoxina exibiu atividade inibitória sobre as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8 em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com LPS (IHENETU et al., 2008).

Diversos estudos realizados pelo nosso grupo confirmaram o efeito dos esteroides cardiotônicos na inflamação. Foi observado que a ouabaína, diante da peritonite induzida por zimosan, reduziu a contagem de células e de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (LEITE et al., 2015). Além disso, os estudos elucidam que a ouabaína reduz a ativação da MAPK p38, CD18 e do fator de transcrição NF- κ B (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021; CAVALCANTE-SILVA et al., 2020; LEITE et al., 2015). Em modelos de inflamação induzida por carragenina, composição 48/80 e zimosan, a ouabaína demonstrou atividade anti-inflamatória, reduzindo o edema de pata de camundongo e inibindo a migração celular (DE VASCONCELOS et al., 2011). Dados relacionados ao Zika vírus mostraram que, em células Vero tratadas com ouabaína antes e depois da infecção, houve uma redução na replicação viral (CARVALHO et al., 2022).

Nosso grupo também demonstrou que, na inflamação pulmonar alérgica, a ouabaína se mostrou eficaz no tratamento, promovendo a diminuição dos linfócitos CD3+, reduzindo os níveis de citocinas IL-1 β , IL-4, IL-13, TNF- α e TGF- β , das alarminas IL-33 e TSLP, e inibindo a migração celular induzida por ovalbumina. Além

disso, houve uma redução no nível de IgE específico para ovalbumina no lavado broncoalveolar e na ativação da MAPK p38 (GALVÃO et al., 2017; GALVÃO et al., 2022).

No entanto, ainda não existem estudos que comprovem a atividade biológica dos esteroides cardiotônicos BD-8, BD-15 e digoxina em modelos de infecção com *Mycobacterium smegmatis*.

1.4 *Mycobacterium smegmatis*

No ano de 1884, a espécie denominada *Mycobacterium smegmatis* foi isolada por Lustgarten e nomeada por Lehmann e Neumann em 1889. Este microrganismo é reconhecido como saprofítico, raramente causador de doenças e não propenso a viver em mamíferos (RM MCCUNE, FM FELDMANN, HP LAMBERT, W. MCDERMOTT, 1966). Ele é frequentemente encontrado no solo, na água e em plantas, sendo identificado em dezesseis estados, além de países como Austrália, Rússia, Canadá e Suíça (ROBERT M. et al., 1966).

A *Mycobacterium smegmatis* habita principalmente nas camadas celulares, onde todas as células se agrupam formando uma estrutura conhecida como biofilme. Ao crescer com os nutrientes disponíveis, este microrganismo apresenta uma aparência branca aveludada e finamente enrugada. Após cerca de 48 horas de crescimento, a coloração muda de branco para um amarelo aveludado sem pigmentação. A morfologia da superfície desta espécie varia entre brilhante, lisa, finamente enrugada ou grosseiramente colapsada (GORDON, RUTH E. et al., 1953). Além disso, apresenta um crescimento mais rápido em comparação com outras espécies de *Mycobacterium* (NEWTON, GERALD L. et al., 2002).

Este organismo é aeróbico, utilizando oxigênio como receptor final de elétrons durante a respiração. Através da fosforilação oxidativa, atinge a quantidade máxima de energia. Embora as micobactérias sejam estritamente aeróbicas, em alguns casos realizam respiração anaeróbica, especialmente em *Mycobacterium* spp. virulentos. A proteína 1 de ligação ao DNA micobacteriano é crucial para a sobrevivência a longo prazo de *Mycobacterium smegmatis* e coordena diversas funções celulares (MEGEHEE, J.A.; LUNDRIGAN, M.D., 2007).

Apesar de *Mycobacterium smegmatis* ser considerada não patogênica, apresenta semelhanças com outras micobactérias patogênicas, como

Mycobacterium tuberculosis, particularmente na biossíntese do micotiol, essencial para o crescimento de *Mycobacterium* spp. (UPLEKAR, MUKUND et al., 2015). No entanto, ela difere significativamente em termos de patogenicidade e virulência. Por exemplo, uma proteína hemaglutinina de ligação à heparina, chamada HbhA, comum em micobactérias patogênicas como *Mycobacterium tuberculosis*, não está presente em *Mycobacterium smegmatis* (PETHE et al., 2013).

Embora *Mycobacterium smegmatis* não cause doenças ou infecções contagiosas, outras micobactérias, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium leprae*, são altamente patogênicas e podem persistir no hospedeiro por longos períodos. Além disso, patógenos como *Mycobacterium avium* permanecem fora do hospedeiro e causam danos quando o infectam (BRANCA, ANDREW A. et al., 1981).

A eliminação de micobactérias, incluindo as patogênicas, pode ser alcançada com tratamentos que interferem na via de biossíntese micólica, essencial para a divisão celular bacteriana (SCHROEDER, E. K. et al., 2002). Após a descoberta da estreptomicina, a quimioterapia tornou-se um tratamento eficaz contra a tuberculose. Contudo, no tratamento da infecção tuberculosa ativa e latente, que dura de 6 a 9 meses, respectivamente, surgiram cepas resistentes aos medicamentos (WHO GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2023). Essa resistência representa um desafio devido ao crescimento lento das micobactérias, seu caráter contagioso, alta virulência e envelope celular impermeável e hidrofóbico (SMITH, TASHA et al., 2012).

A *Mycobacterium smegmatis* tem sido amplamente utilizada como modelo em estudos de proteínas associadas à infecção devido à sua rápida taxa de crescimento e segurança relativa. Essa espécie é uma ferramenta valiosa para compreender a biologia de *Mycobacterium tuberculosis* e para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas. Um exemplo é o estudo de (BARAN et al. 2009), que descreve a utilização de *Mycobacterium smegmatis* para investigar mecanismos moleculares e estratégias terapêuticas contra micobactérias patogênicas (MEGEHEE; LUNDRIGAN, 2007).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Nosso grupo vem demonstrando que os esteroides cardiotônicos possuem diversas propriedades farmacológicas, atuando como uma substâncias anti-inflamatórias com a capacidade de reduzir a migração celular para o sítio inflamado sob vários estímulos (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017).

Estudos específicos com a Ouabaína evidenciam essa capacidade em resposta a diferentes agentes, como o zymosan (LEITE et al., 2015), concanavalina A (VASCONCELOS et al., 2011), *Leishmania amazonensis* (JACOB et al., 2013) e zika vírus (CARVALHO et al., 2022, 2024 no prelo). Além disso, os esteroides cardiotônicos, incluindo a ouabaína, têm mostrado eficácia na diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e diferentes vias de sinalização relacionadas a processos infecciosos e inflamatórios (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009)

Ainda nesse contexto, a digoxina também apresentou efeitos imunomoduladores (IHENETU et al., 2008). No entanto, a citotoxicidade da digoxina possui uma faixa terapêutica estreita, com alta citotoxicidade (PAVLOVIC, 2020).

Dessa forma, o desenvolvimento de uma nova classe de esteroides cardiotônicos, com capacidade para modular seletivamente a atividade de isoformas específicas da Na^+/K^+ -ATPase, apresenta um potencial significativo para superar os efeitos colaterais e tóxicos associados à interação desses compostos com múltiplas isoformas da enzima (PESSÔA et al., 2018).

Sendo assim, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina em modelos de infecção por micobactérias utilizando macrófagos murinos.

Diante disso, nosso grupo investigou a BD-8, BD-15 e a digoxina para elucidar os efeitos desses esteroides na modulação de citocinas e no processo infeccioso pelo bacilo da tuberculose. Essas investigações são cruciais para ampliar o entendimento sobre o potencial terapêutico desses compostos na resposta imunológica contra infecções micobacterianas, possibilitando avanços significativos no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina em modelos de infecção por micobactérias utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a interferência das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina na viabilidade do *Mycobacterium smegmatis*
- Avaliar os efeitos das moléculas sobre a viabilidade das células RAW 264.7
- Investigar o possível efeito das moléculas em modelo de infecção *in vitro* frente a micobactérias utilizando células RAW 264.7
- Avaliar a produção de citocinas inflamatórias na presença e ausência dos esteroides no processo de infecção micobacteriana *in vitro*

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da linhagem celular

A linhagem celular RAW 264.7, utilizada nos experimentos deste estudo, foi obtida por meio do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cedida ao Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

A linhagem RAW 264.7 de macrófagos murinos foram inicialmente retirados de um ultra-freezer a -80°C e, subsequentemente, descongelados em condições controladas. No interior de uma cabine de segurança biológica, as células descongeladas foram cuidadosamente transferidas para um tubo Falcon contendo 5 ml de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,2% de antifúngicos e 2% de antibióticos. Este tubo Falcon, contendo as células e o meio de cultura, foi então submetido a um processo de centrifugação a 1500 rotações por minuto (rpm) durante um período de 5 minutos para a remoção de crioprotetores e resíduos celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 5 ml de meio de cultura.

As células ressuspensas foram então transferidas para frascos apropriados para cultivo celular e imediatamente colocadas em uma incubadora com atmosfera controlada de 5% de CO_2 e 95% de umidade a 37°C , condições ideais para o crescimento e manutenção das células RAW 264.7. A manutenção das culturas celulares incluiu a troca regular do meio de cultura a cada 48 horas, a fim de garantir a disponibilidade de nutrientes essenciais e a remoção de metabólitos tóxicos.

Além disso, as culturas foram constantemente monitoradas quanto à presença de contaminações microbianas e ao estado geral das células, utilizando técnicas de microscopia de contraste de fase e testes de viabilidade celular. Esse rigoroso controle assegura que as células permaneçam saudáveis e viáveis ao longo dos experimentos, garantindo a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

4.2 Obtenção dos Esteroides Cardiotônicos

As moléculas investigadas neste estudo, designadas BD-8 e BD-15, foram sintetizadas através de modificações químicas da digoxina. Este processo de síntese foi realizado no Laboratório de Síntese Orgânica e Nanoestrutura da Universidade Federal de São João del-Rei, sob a coordenação do Prof. Dr. José Augusto Ferreira Perez Villar (PÊSSOA et al. 2018).

Para os experimentos, as moléculas BD-8, BD-15 e a própria digoxina foram empregadas em diferentes concentrações: 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M e 0.01 μ M. Essas concentrações foram escolhidas com base em estudos anteriores que utilizaram um esteroide cardiotônico semelhante, a marinobufagina, proporcionando um ponto de comparação adequado (CARVALHO et al., 2019).

Inicialmente, uma solução estoque das moléculas investigadas foi preparada com uma concentração de 8 mM. A partir dessa solução estoque, foram realizadas diluições sucessivas em meio de cultura RPMI-1640 (1X), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), até se atingir as concentrações desejadas para os experimentos.

O processo de preparação das soluções e diluições foi conduzido em ambiente estéril para evitar qualquer tipo de contaminação que pudesse comprometer os resultados dos experimentos. As soluções foram armazenadas e manuseadas de acordo com protocolos rigorosos de laboratório, assegurando a estabilidade e a integridade das moléculas ao longo do estudo.

4.3 Manutenção da *Mycobacterium smegmatis*

A *Mycobacterium smegmatis* MC2155 foi selecionada para este estudo devido às suas características genéticas e fisiológicas que a tornam um modelo adequado para experimentos laboratoriais. Um clone específico da *M. smegmatis* MC2155 foi inicialmente inoculado em caldo Middlebrook 7H9, o qual foi suplementado com tween 80, glicerol e 10% de OADC (ácido oleico albumina dextrose catalase) para promover um crescimento bacteriano ideal.

Esta cultura foi mantida em uma estufa bacteriológica a 37°C por um período de 24 horas, permitindo a multiplicação bacteriana até se atingir uma fase de

crescimento logarítmico estável. Após o período de incubação, foi realizada a quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para determinar a densidade bacteriana e assegurar uma inoculação precisa nas etapas subsequentes dos experimentos.

A determinação do número de UFCs envolveu a diluição serial da cultura bacteriana e o plaqueamento em meio sólido apropriado, seguido de uma nova incubação para a contagem de colônias viáveis. Este procedimento rigoroso de cultivo e quantificação garantiu a reprodutibilidade e a confiabilidade dos experimentos, permitindo um controle preciso das condições experimentais e dos parâmetros de infecção utilizados ao longo do estudo.

4.4 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) é um teste fundamental que avalia a atividade antibacteriana de moléculas ou compostos específicos.

Neste estudo, as moléculas BD-8, BD-15 e digoxina foram testadas contra a *Mycobacterium smegmatis* utilizando o método de redução de resazurina (REMA) (MURADÁS et al., 2018).

As moléculas BD-8, BD-15 e digoxina foram inicialmente solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido) e, em seguida, diluídas em série em uma placa de 96 poços com fundo em U. As concentrações testadas variaram de uma concentração máxima de 200 μM até uma concentração mínima de 1,6 μM .

Os fármacos controle utilizados neste experimento foram a rifampicina, testada na concentração máxima de 0,5 mM, e o moxifloxacino, testado na concentração máxima de 3 μM . Ambos os fármacos controle foram adquiridos da Sigma-Aldrich e solubilizados em DMSO, seguindo o mesmo procedimento de diluição em série utilizado para as moléculas testadas. A concentração final de DMSO nos poços foi mantida em 2,5%. Para a preparação da suspensão bacteriana, a *Mycobacterium smegmatis* foi diluída em meio 7H9 suplementado com 10% de OADC até atingir uma densidade óptica de 0,001 (OD 595nm).

Após o ajuste da densidade óptica, 100 μL da suspensão de *Mycobacterium smegmatis* foram adicionados a cada poço da placa. A placa foi então incubada a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, 30 μL de uma solução de

resazurina a 0,02% foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada novamente a 37°C por mais 24 horas para a obtenção dos resultados.

O MIC foi determinado observando-se a redução da resazurina (cor azul) para resorufina (cor rosa), onde a mudança para a cor rosa indicou crescimento bacteriano e a manutenção da cor azul indicou inibição bacteriana. Este ensaio inclui controles de crescimento bacteriano e de esterilidade para assegurar a validade dos resultados. Para garantir a precisão e a reprodutibilidade dos dados, foram realizados dois experimentos independentes.

4.5 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), um ensaio baseado na atividade das enzimas mitocondriais (desidrogenases) presentes em células viáveis.

Este método se fundamenta na capacidade dessas enzimas de reduzir o sal de tetrazólio MTT, de cor amarela, ao seu produto reduzido, o formazan, que possui coloração azul-violeta. A intensidade da cor violeta é diretamente proporcional ao número de células viáveis que metabolizam o MTT em cristais de formazan, permitindo assim a quantificação da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

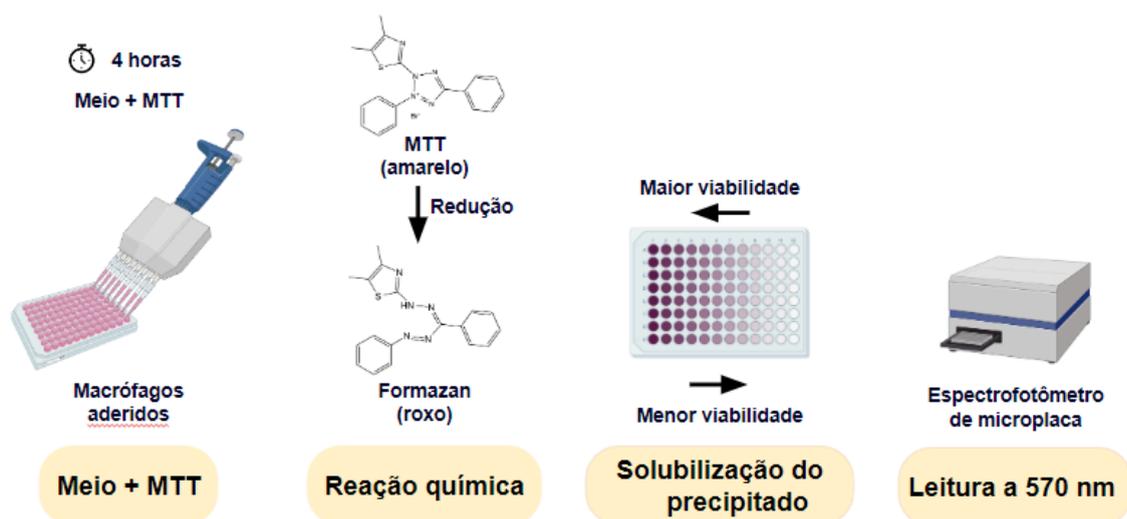
Após o período de incubação das células com os tratamentos específicos, foi adicionada à placa de cultura uma solução de MTT preparada com 10% do reagente em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). A placa foi então incubada por mais 3 horas em uma estufa de CO₂, garantindo condições ideais para a reação enzimática.

Após a incubação, todo o sobrenadante foi cuidadosamente removido para eliminar qualquer excesso de MTT não reagido. Em seguida, 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. A dissolução completa dos cristais garantiu que a medição subsequente fosse precisa e reprodutível.

A viabilidade celular foi então quantificada através da medida da densidade óptica a um comprimento de onda de 570 nm, utilizando um leitor de placas. Esta leitura permitiu a determinação da quantidade de formazan produzido, refletindo diretamente a viabilidade das células tratadas. Este procedimento rigoroso

assegurou a precisão e a confiabilidade dos dados obtidos, permitindo uma análise detalhada do impacto dos tratamentos sobre a viabilidade celular.

Figura 5: Ilustração do método de MTT



Fonte: GRIESS, 1879; SALES-NETO, 2021

4.6 Modelo de infecção com RAW e *Mycobacterium smegmatis*

Para a avaliação do experimento de infecção, inicialmente foram semeadas células RAW 264.7 em placas de fundo chato, na concentração de 10^4 células por poço, e deixadas em repouso por 24 horas para permitir a adesão celular adequada.

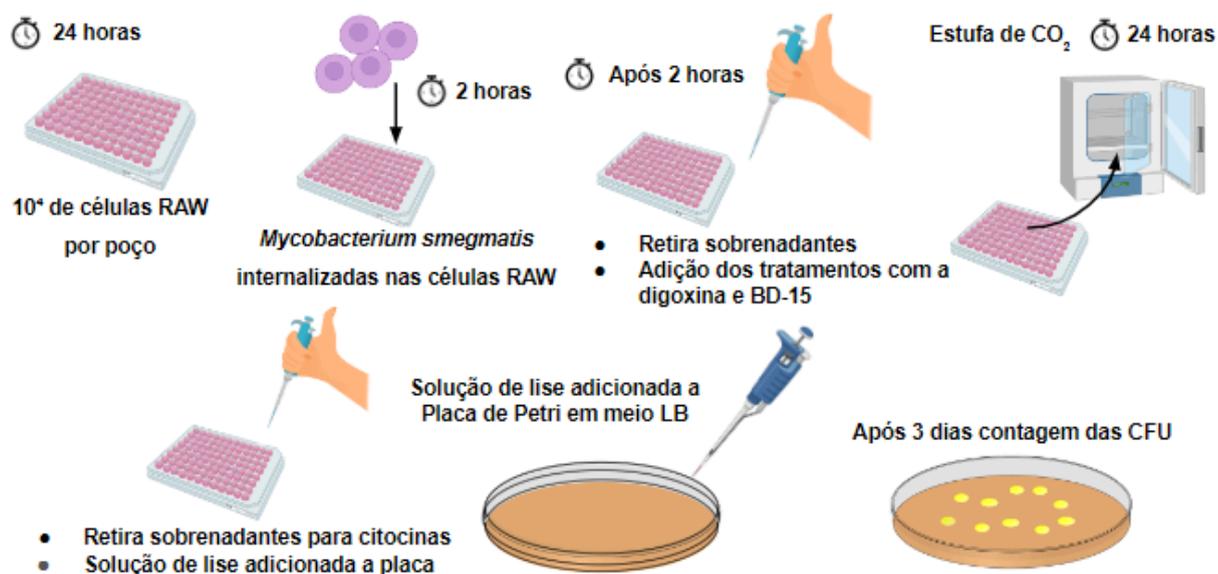
Posteriormente, um clone de *Mycobacterium smegmatis*, cujo número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do inóculo fora previamente determinado, foi selecionado. Com base nesse clone, foi preparada uma suspensão bacteriana com uma razão de multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1. Essa suspensão foi então adicionada às células RAW 264.7 para permitir o processo de infecção e internalização, que ocorreu ao longo de um período de duas horas.

Após o período de infecção, os sobrenadantes de cada poço foram cuidadosamente removidos. Em seguida, foram adicionados os tratamentos com as moléculas digoxina e BD-15, cada uma em uma concentração final de $10 \mu\text{M}$. As placas foram então incubadas em uma estufa de CO_2 a 37°C por um período adicional de 24 horas. Após este período de incubação, os sobrenadantes contendo as citocinas secretadas pelas células foram coletados e armazenados a -80°C para análises posteriores.

Para determinar a carga bacteriana residual, uma solução de lise contendo 0,1% de triton X-100 e solução salina foi adicionada às células em cada poço para liberar as bactérias internalizadas. Os sobrenadantes resultantes da lise celular foram então semeados em placas de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani) para permitir o crescimento bacteriano. As placas de Petri foram incubadas a 37°C por três dias, após os quais as colônias formadoras de *Mycobacterium smegmatis* foram contadas a olho nu.

A contagem de colônias permitiu a determinação do número de UFC presentes em cada poço, fornecendo uma medida quantitativa da eficácia dos tratamentos na redução da carga bacteriana. Este procedimento meticuloso garantiu a reprodutibilidade dos resultados e permitiu uma análise detalhada da eficácia das moléculas digoxina e BD-15 na infecção por *Mycobacterium smegmatis*.

Figura 6: Ilustração da metodologia das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)



Fonte: AMARAL, 2024.

4.7 Ensaio imunoenzimático para dosagem das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α

Após 24 horas em cultura celular, os sobrenadantes foram coletados para a quantificação das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, seguindo as especificações do fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc).

Para iniciar o ensaio, as placas de ELISA foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IL-1 β , anti-IL-10 anti-TNF- α , diluídos em tampão fosfato pH 6.5 (Coating Buffer 1X), e incubadas overnight a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de tween 20 (PBST) para remover qualquer excesso de anticorpos não ligados.

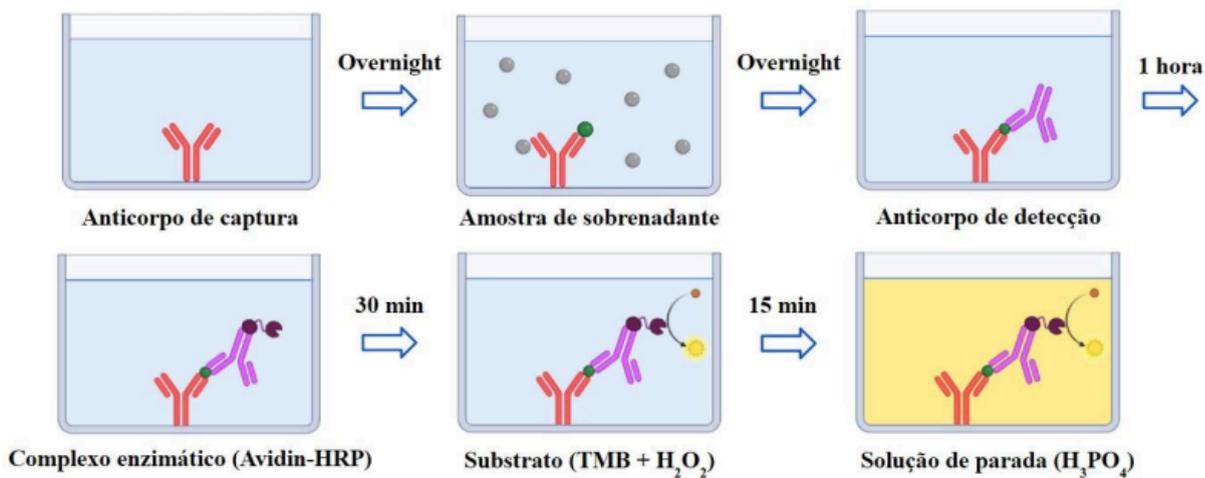
Em seguida, os sítios inespecíficos das placas foram bloqueados com uma solução de bloqueio composta por PBS contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por 1 hora à temperatura ambiente, prevenindo a ligação não específica durante a detecção. Depois do bloqueio, as placas foram lavadas novamente com PBST.

As amostras de sobrenadantes, contendo as citocinas a serem analisadas, foram então adicionadas às placas, que foram incubadas overnight a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas mais uma vez com PBST, e os anticorpos de detecção específicos para cada citocina foram adicionados. As placas foram então incubadas por 1 hora à temperatura ambiente.

Seguiu-se uma nova lavagem com PBST, após a qual o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionado às placas e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais para remover qualquer ligação não específica, a solução substrato composta por tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi adicionada aos poços.

A reação enzimática foi permitida por 15 minutos e então interrompida com a adição de uma solução de parada contendo ácido fosfórico 1M. Por fim, a densidade óptica foi medida a 450 nm usando um leitor de placas, permitindo a quantificação precisa das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α presentes nos sobrenadantes das culturas celulares.

Figura 7: Esquema do método de ELISA



Fonte: MEDEIROS, 2023.

4.8 Análise estatística

A análise estáticas dos dados deste trabalho foram realizados no prisma utilizando média \pm erro padrão da média e ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Interferência das moléculas BD-8, BD-15 e digoxina na viabilidade do *Mycobacterium smegmatis*

5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

O teste de MIC realizado no presente trabalho, avalia se as moléculas BD-8, BD-15 e digoxina possuem atividade inibitória contra a *Mycobacterium smegmatis*. A tabela 1 representa os controles positivos e suas concentrações testadas. A tabela 2 representa as moléculas, as concentrações testadas e os resultados observados. Analisou-se na tabela 2 que nas concentrações testadas das respectivas moléculas houve crescimento bacteriano.

Tabela 1 - Controles positivos e concentrações testadas

Rifampicina (Concentrações mM)	Moxifloxacino (Concentrações µM)
0,5 (I)	3 (I)
0,25 (I)	1,5 (I)
0,125 (I)	0,75 (I)
0,0625 (I)	0,375 (I)
0,03125 (I)	0,1875 (I)
0,015625 (I)	0,09375 (S.I)
0,0078125 (S.I)	0,046875 (S.I)
0,00390625 (S.I)	0,0234375 (S.I)

(S.I) = Sem inibição; (I) = Inibição. Tabela descrita com base nos resultados de Concentração Inibitória Mínima.

Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2024.

Tabela 2: MIC das moléculas testadas

Concentrações (µM)	Digoxina	BD-8	BD-15
200	S.I	S.I	S.I
100	S.I	S.I	S.I
50	S.I	S.I	S.I
25	S.I	S.I	S.I
12,50	S.I	S.I	S.I
6,25	S.I	S.I	S.I
3,12	S.I	S.I	S.I
1,56	S.I	S.I	S.I

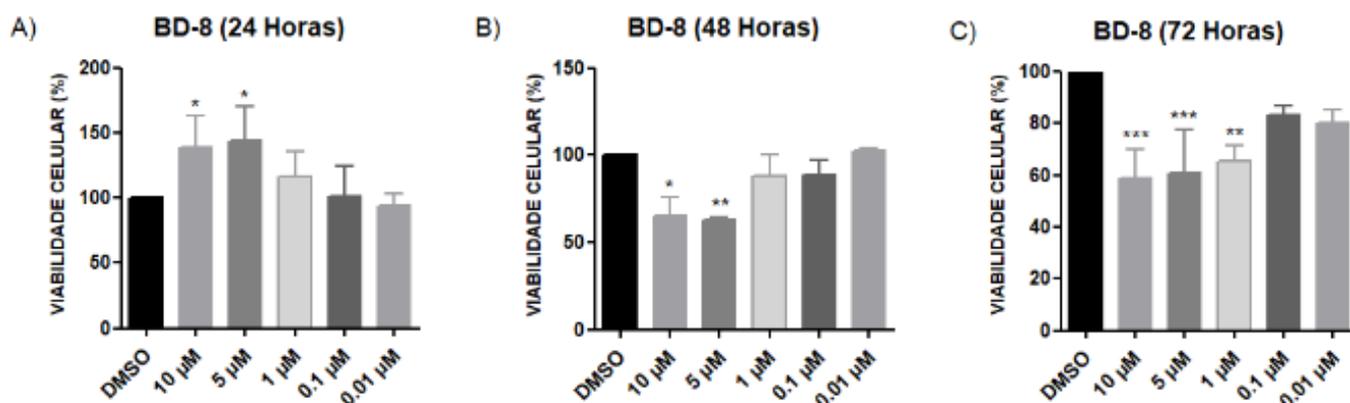
S.I = Sem inibição; I = Inibição. Tabela descrita com base nos resultados de Concentração Inibitória Mínima.

Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2024.

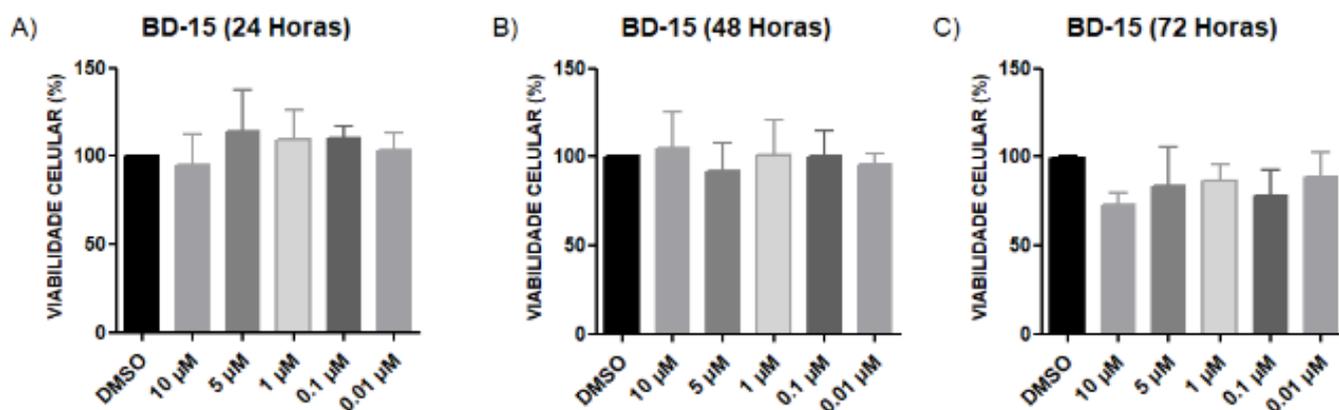
5.2 Efeitos das moléculas sobre as células RAW 264.7

5.2.2 Análise da viabilidade celular

As moléculas BD-8, BD-15 e digoxina não apresentaram citotoxicidade no tempo de 24 horas na linhagem celular testada (RAW), (Figura 10, 11 e 12). No tempo de 48 horas começa-se a observar redução da viabilidade celular para a BD-8 e para a digoxina, ambas na concentração de 10 µM e 5 µM (Figura 10 e 12). Em relação a BD-15 não houve redução da viabilidade neste tempo em nenhuma concentração testada (Figura 11). No tempo de 72 horas, para a BD-8 houve redução da viabilidade celular nas concentrações de 10 µM, 5 µM e 1 µM (Figura 10). Para a BD-15, não houve redução da viabilidade celular neste tempo e para a digoxina observou-se redução da viabilidade celular nas concentrações de 10 µM e 1 µM (Figura 11 e 12). Esses dados indicam que para a linhagem testada, a BD-8 é mais citotóxica do que a BD-15, que por sua vez, não apresentou toxicidade em nenhum dos tempos e concentrações testadas. Sendo assim, a BD-15 foi selecionada para dar seguimento aos ensaios.

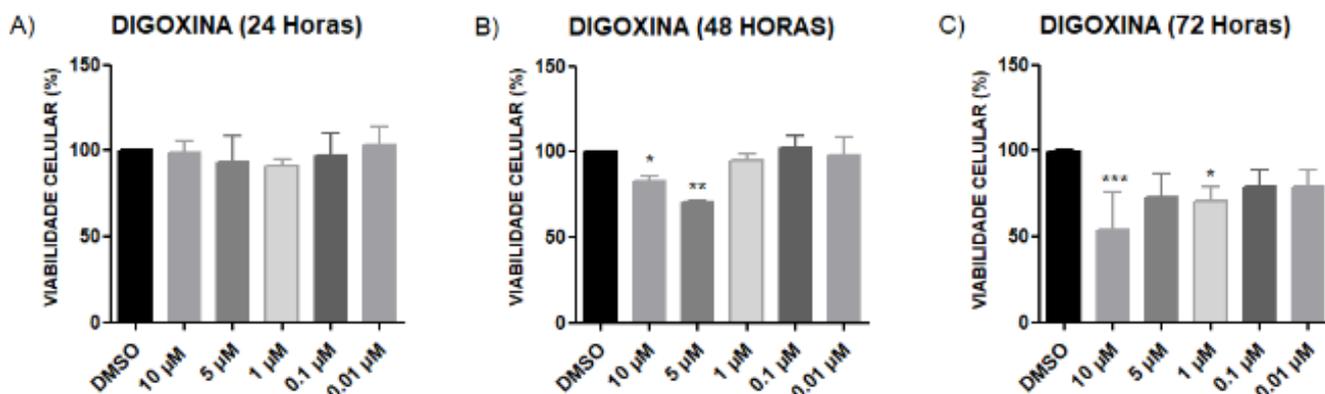
Figura 8: Efeito da BD-8 na viabilidade de células RAW

Efeito da BD-8 na viabilidade de células RAW. (A) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 24 horas de tratamento. (B) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 48 horas de tratamento. (C) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 72 horas de tratamento. As células foram tratadas com a BD-8 nas concentrações de 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0.1 µM e 0.01 µM. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm d.p.m e analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle.

Figura 9: Efeito da BD-15 na viabilidade de células RAW

Efeito da BD-15 na viabilidade de células RAW. (A) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 24 horas de tratamento. (B) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 48 horas de tratamento. (C) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 72 horas de tratamento. As células foram tratadas com a BD-15 nas concentrações de 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0.1 µM e 0.01 µM. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm d.p.m e analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle.

Figura 10: Efeito da Digoxina na viabilidade de células RAW



Efeito da Digoxina na viabilidade de células RAW. (A) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 24 horas de tratamento. (B) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 48 horas de tratamento. (C) Gráfico representando a porcentagem de viabilidade celular em 72 horas de tratamento. As células foram tratadas com a Digoxina nas concentrações de 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0.1 µM e 0.01 µM. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm d.p.m e analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle.

5.3 Efeito das moléculas em modelo de infecção *in vitro* com *Mycobacterium smegmatis* utilizando células RAW 264.7

5.3.3 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Os resultados expressos neste gráfico sugerem que os tratamentos da BD-15 e digoxina a 10 µM no intervalo de 24 horas reduziram o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por poço comparado ao controle. De acordo com esses dados, pode-se sugerir que as moléculas BD-15 e digoxina reduzem a sobrevivência bacteriana nos macrófagos, que está diretamente associado à redução de infecção nessas células.

Figura 11: Análise das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) com as moléculas digoxina e BD-15 nas concentrações de 10 μM e 1 μM .

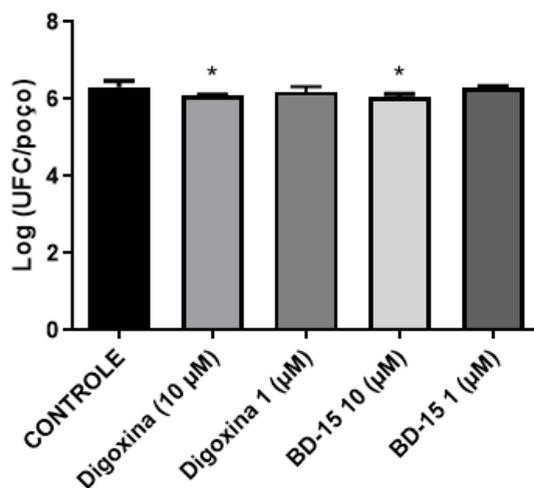
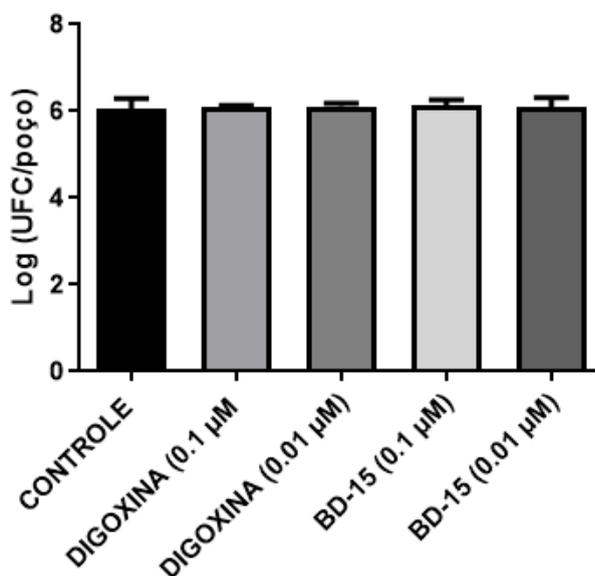


Figura 12: Análise das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) com as moléculas digoxina e BD-15 nas concentrações de 0.1 μM e 0.01 μM .



Os gráficos apresentam as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) diante das moléculas digoxina e BD-15 após tratamento com a concentração de 10 μM , 1 μM , 0.1 μM e 0.01 μM durante 24 horas.

5.4 Avaliação da produção de citocinas inflamatórias sobre os esteroides no processo de infecção micobacteriana *in vitro*

5.4.4 Análise de citocinas

No ensaio relacionado à IL-1 β e TNF- α , observou-se que o tratamento com BD-15 e com digoxina, ambas na concentração de 10 μ M durante um período de 24 horas, reduziu a produção dessas citocinas quando comparado ao grupo controle infectado. No que diz respeito à IL-10, a molécula BD-15 levou a um aumento expressivo na produção dessa citocina em comparação com o grupo controle.

Figura 13: Efeito da BD-15 e Digoxina sobre os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β

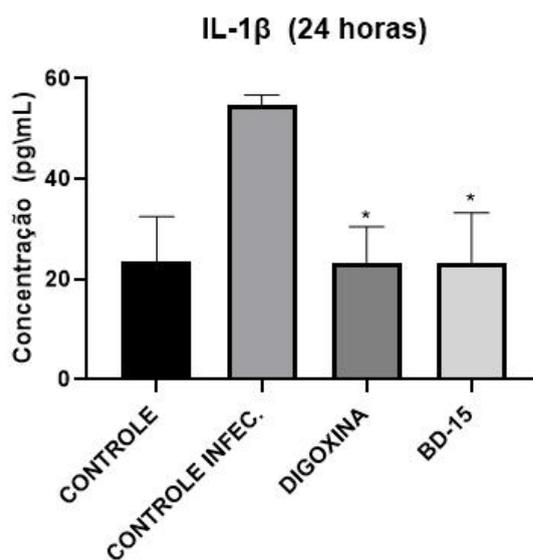
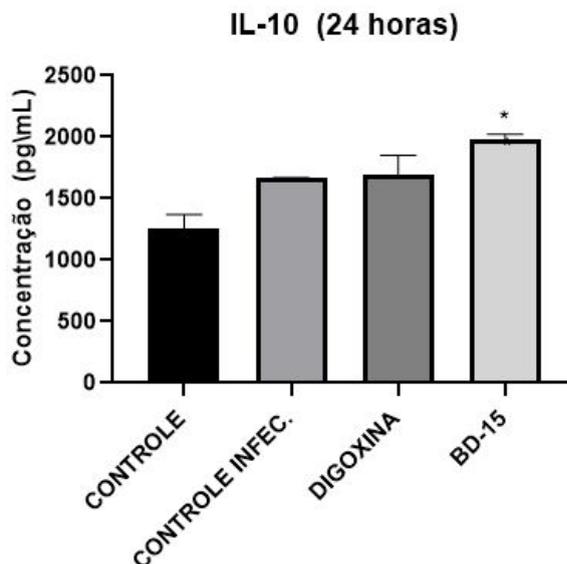
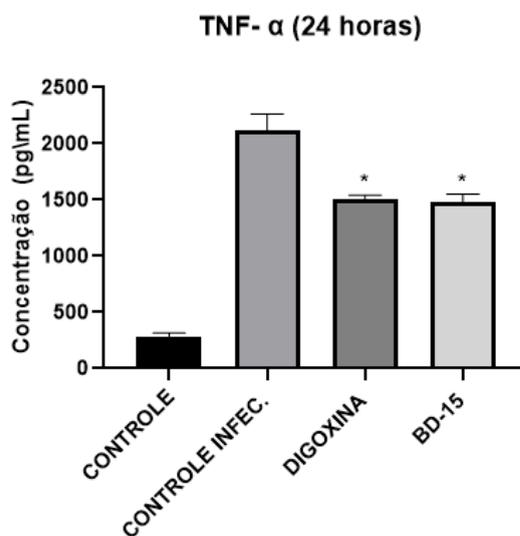


Figura 14: Efeito da BD-15 e Digoxina sobre os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10**Figura 15:** Efeito da BD-15 e Digoxina sobre os níveis da citocina pró-inflamatórias TNF- α 

Os gráficos (Figura 12,13,14 e 15) representam o efeito da BD-15 e Digoxina nos níveis de produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-10 e TNF- α . As células foram tratadas na concentração de 10 μ M por 24 horas. Após esse período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche). Os dados numéricos foram apresentados em média \pm d.p.m e analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou, pela primeira vez, o papel das moléculas BD-8, BD-15 e Digoxina no processo de infecção *in vitro* por *Mycobacterium smegmatis*. Neste contexto, foi demonstrado que as moléculas BD-15 e Digoxina possuem atividade imunomoduladora, sendo capaz de modular diversos parâmetros, incluindo Concentração Inibitória Mínima (MIC), viabilidade celular, Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e a síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias.

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) é um teste fundamental que avalia a atividade antibacteriana de moléculas ou compostos específicos. Nas Tabelas 1 e 2, foram apresentados os valores das MICs para os agentes antituberculosos utilizados como controles no experimento. As MICs em relação às cepas de *Mycobacterium smegmatis* MC2155 foram determinadas com base em dois experimentos independentes. Em todas as análises, foram incorporados controles positivos de tratamento, bem como verificações de esterilidade do meio e de crescimento microbiano.

Os antituberculosos utilizados como controle positivo neste estudo exibiram MICs consistentes com os valores descritos na literatura, conforme o estudo de HEIRINCHS et al. (2018), que avaliou a susceptibilidade *in vitro* de 16 fármacos antituberculosos contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra e H37Rv. Adicionalmente, os valores de MIC encontrados neste estudo mostraram-se muito semelhantes aos resultados reportados por TONELLI et al. (2014) e SIENAWSKA et al. (2018), nos quais antituberculosos foram utilizados como controles positivos em ensaios experimentais.

A utilização da cepa *M. smegmatis* proporciona um modelo preliminar eficaz para a avaliação da atividade de fármacos contra espécies de *Mycobacterium* (PAVIC et al., 2018). Nesse contexto, estudos como o de CHATURVEDI et al. (2007) demonstraram que cepas de *M. smegmatis* podem servir como um modelo específico e mais rigoroso para a triagem de moléculas contra cepas de tuberculose multirresistente (MDR-TB).

Observou-se que, nas moléculas avaliadas, não houve crescimento bacteriano, indicando que, nas concentrações testadas, as moléculas não interferem no crescimento de *Mycobacterium smegmatis*. Este trabalho faz parte de um projeto que visa investigar os efeitos biológicos desses compostos, contribuindo para a

descoberta de novos fármacos com menor toxicidade que poderão ser utilizados para o tratamento de infecção micobacteriana.

As moléculas BD-8, BD-15 e Digoxina foram selecionadas para uma investigação adicional de possíveis efeitos citotóxicos *in vitro* em células de macrófagos murinos, utilizando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Foram empregadas células RAW 264.7 nesses experimentos. A viabilidade celular foi avaliada após a exposição das linhagens celulares aos compostos, e os resultados foram expressos como porcentagens de viabilidade celular (Figura 7,8 e 9).

As moléculas BD-8, BD-15 e Digoxina não apresentaram citotoxicidade no período de 24 horas na linhagem celular testada (RAW), conforme ilustrado nas Figuras 7, 8 e 9. No período de 48 horas, observou-se uma redução da viabilidade celular para a BD-8 e para a Digoxina, ambas nas concentrações de 10 μM e 5 μM (Figuras 7 e 9). Em relação à BD-15, não houve redução da viabilidade neste tempo em nenhuma concentração testada (Figura 8). No período de 72 horas, a BD-8 demonstrou redução da viabilidade celular nas concentrações de 10 μM , 5 μM e 1 μM (Figura 7). Para a BD-15, não houve redução da viabilidade celular neste tempo, enquanto para a Digoxina observou-se redução da viabilidade celular nas concentrações de 10 μM e 1 μM (Figuras 8 e 9). Esses dados indicam que, para a linhagem testada, a BD-8 é mais citotóxica do que a BD-15, que por sua vez não apresentou toxicidade em nenhum dos tempos e concentrações testadas. Assim, a BD-15 foi selecionada para prosseguir com os ensaios. Apesar da indução de toxicidade da molécula Digoxina em algumas situações, sua utilização foi mantida por ser a molécula precursora dos esteroides sintéticos utilizados neste trabalho.

A incubação *in vitro* dos compostos nas concentrações de 0,1 μM e 0,01 μM não resultou em alterações significativas na viabilidade celular das linhas testadas. Estes resultados indicam que os compostos possuem uma toxicidade aparentemente baixa para as células e demonstram seletividade para *Mycobacterium smegmatis* nas concentrações avaliadas. As características favoráveis observadas motivaram a exploração da atividade intracelular dos compostos em um modelo de macrófago infectado por *Mycobacterium smegmatis* (SIDRÔNIO et al., 2021).

Inicialmente, as células foram incubadas por 24 horas para garantir uma adesão celular adequada. Subsequentemente, com base no clone de

Mycobacterium smegmatis preparado, uma suspensão bacteriana que foi adicionada às células RAW 264.7. Através da análise das moléculas BD-15 e Digoxina, observou-se uma redução nas Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

As culturas bacterianas tratadas com BD-15 e Digoxina apresentaram contagens bacterianas significativamente menores em comparação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$), indicando que essas substâncias possuem um efeito sobre a *Mycobacterium smegmatis*. Uma possível explicação para essa observação é que os macrófagos podem ter acumulado as moléculas, particularmente nos compartimentos que abrigam a *M. smegmatis*. Alternativamente, as drogas podem ter potencializado o controle da *M. smegmatis* pelos macrófagos.

Embora a tuberculose (TB) e outras doenças infecciosas sejam tradicionalmente tratadas com agentes que comprometem diretamente a fisiologia do patógeno, há um interesse crescente na terapia direcionada ao hospedeiro, que visa o controle de patógenos pela potencialização das respostas imunológicas do hospedeiro (TOBIN, 2015).

Nesse contexto, outras estratégias terapêuticas promissoras direcionadas ao hospedeiro para o tratamento da TB incluem a terapia com citocinas e vacinas terapêuticas (TOBIN, 2015). Dessa forma, é importante explorar novas abordagens e compreender os mecanismos de ação de diferentes compostos terapêuticos atuais.

Ainda não se conhecem os efeitos dos esteroides cardiotônicos em infecções por *Mycobacterium smegmatis*. No entanto, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a elucidar aspectos fundamentais do papel de esteroides cardiotônicos sintéticos e endógenos, fornecendo novos dados significativos em relação a processos inflamatórios e infecciosos (FERREIRA et al. 2024 no prelo; CARVALHO et al., 2022; 2024 no prelo)

Em trabalhos anteriores, foi observado que a injeção com zimosan, que trata-se de uma partícula fúngica, estimulou a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α . O tratamento com marinobufagina demonstrou eficácia significativa na redução dos níveis de IL-1 β e IL-6 presentes no exsudato peritoneal. Esse resultado encontra respaldo no estudo de LEITE et al. (2015), que documentou a capacidade da ouabaína em diminuir especificamente os níveis de IL-1 β . Contudo, é importante destacar que, ao contrário da ouabaína, a marinobufagina não apenas reduziu IL-1 β , mas também influenciou os níveis de IL-6. Entretanto, o esteroide investigado por LEITE et al. (2015) apresentou uma

redução nos níveis de TNF- α sem exercer impacto significativo sobre os níveis de IL-6, sugerindo uma diferença nos mecanismos de ação entre esses compostos.

No modelo de lesão pulmonar aguda induzido por LPS em modelo *in vitro*, a ouabaína foi capaz de reduzir o nível das três citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) (SILVA, 2016; SHAH et al., 2011). Há dados ainda de modulação de citocinas por esteróides cardiotônicos no modelo de infecção por *Leishmania amazonensis* (JACOB et al., 2013) e por zika vírus (CARVALHO et al., 2022; 2024 no prelo).

À luz desses dados, no modelo *in vitro* de infecção analisado neste trabalho, a BD-15 demonstrou um potencial anti-inflamatório significativo, modulando as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10, enquanto a Digoxina modulou apenas as citocinas IL-1 β e TNF- α .

O ensaio de ELISA realizado nesta pesquisa revelou diferenças estatisticamente significativas nas concentrações das citocinas IL-10, IL-1 β e TNF- α em resposta às moléculas Digoxina e BD-15. No que concerne à dosagem de IL-10, o tratamento com digoxina não promoveu alterações estatisticamente relevantes, registrando um aumento marginal de 2% em relação ao controle infectado. Por outro lado, o tratamento com a BD-15 resultou em um incremento substancial de 19% na produção de IL-10, também em comparação ao controle infectado. Quanto aos níveis de IL-1 β , observou-se uma redução de 58% com o tratamento da digoxina e da BD-15, ambos comparados ao controle infectado, sugerindo uma modulação inflamatória diferenciada pelas duas moléculas. No tocante à produção de TNF- α , o tratamento com a digoxina induziu um aumento de 41%, enquanto o tratamento com a BD-15 culminou em um incremento de 42%, evidenciando respostas pró-inflamatórias significativas em relação ao controle infectado.

O efeito mais notável observado foi na IL-10, onde a molécula BD-15 provocou um aumento significativo em sua expressão, sublinhando o papel crucial da IL-10 como mediadora da resposta anti-inflamatória. Este achado é particularmente relevante, uma vez que evidencia a influência dos esteroides cardiotônicos na regulação da produção de IL-10, sugerindo uma potencial ligação entre esses compostos e a modulação da resposta imunológica.

Estudos recentes corroboram essa observação, demonstrando que esteroides como a ouabaína e a digoxina podem induzir a produção de IL-10. Por exemplo, LEITE et al. (2015) mostraram que a ouabaína é capaz de aumentar a produção de

IL-10 em modelos experimentais, contribuindo significativamente para a redução da inflamação. De maneira semelhante, pesquisas indicam que a digoxina também pode elevar a produção de IL-10, o que pode explicar parte de seus efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios (VASCONCELOS et al., 2011) .

A regulação negativa da resposta imune mediada por IL-10 é crucial para mitigar os efeitos nocivos de uma inflamação crônica ou excessiva, que pode causar danos aos tecidos e contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes. Além disso, a IL-10 desempenha um papel essencial na resolução da inflamação, com efeito anti-inflamatório, promovendo a reparação tecidual e restaurando a homeostase do sistema imunológico (COUPER, BLOUNT, & RILEY, 2008; O'GARRA & VIEIRA, 2007; SABAT et al., 2010; SARAIVA & O'GARRA, 2010).

A capacidade dos esteroides cardiotônicos de modular a produção de IL-10 não apenas revela um potencial terapêutico significativo no tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, mas também abre novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e com menor toxicidade no manejo de condições inflamatórias e autoimunes (JACOB et al., 2013; CARVALHO et al., 2022)

Esse avanço no entendimento dos mecanismos de ação dos esteroides cardiotônicos aprofunda a compreensão de como esses compostos podem contribuir para a homeostase imunológica, posicionando-os como candidatos promissores no campo das terapias imunomoduladoras (LEITE et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2013; CARVALHO et al., 2022) .

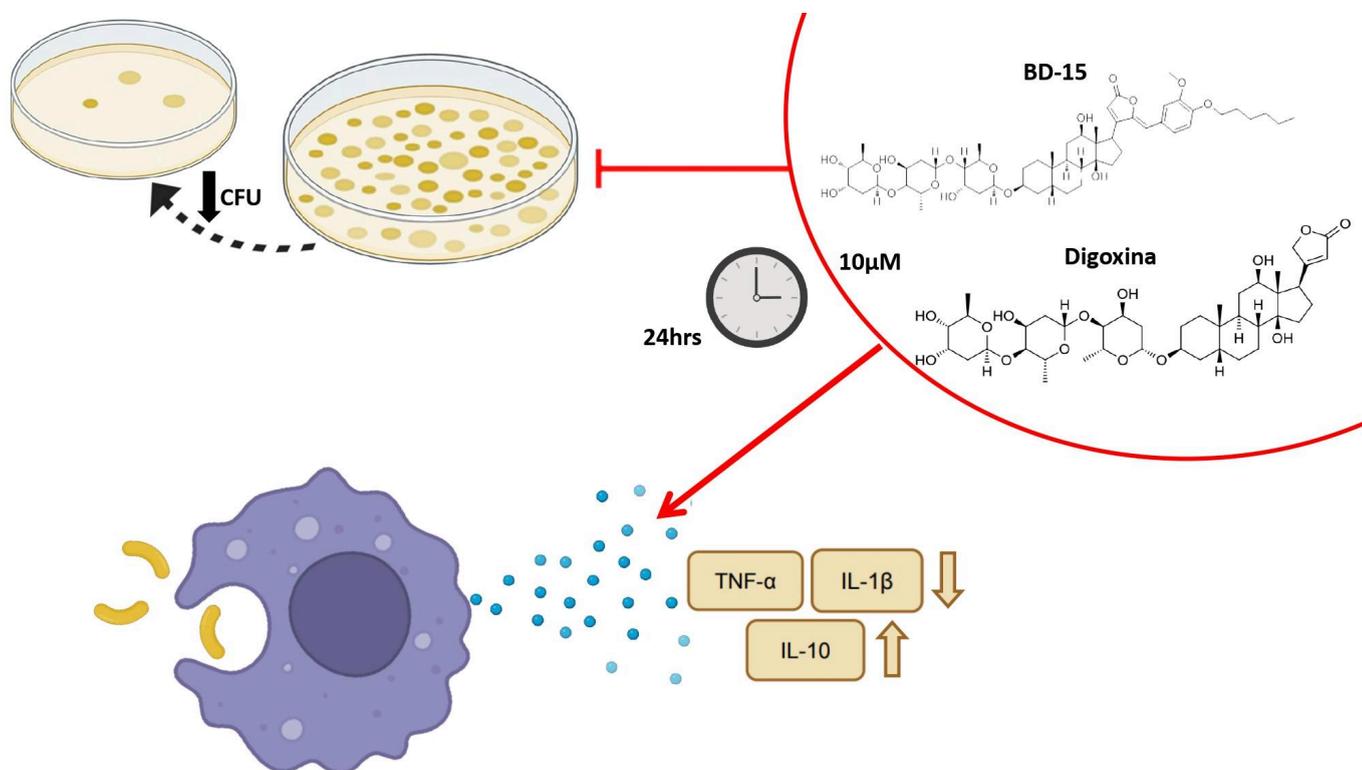
Nesse contexto, os achados sugerem que, embora as alterações em IL-1 β e TNF- α sejam relevantes, a modulação de IL-10 pela BD-15 pode ter implicações cruciais na regulação da inflamação. As diferenças observadas entre as respostas das citocinas indicam a necessidade de investigações mais aprofundadas para elucidar os mecanismos de ação subjacentes.

Este trabalho, ao revelar pela primeira vez o papel dos esteroides cardiotônicos em um modelo de infecção por *Mycobacterium smegmatis in vitro*, contribui de maneira significativa para o entendimento abrangente da função desses compostos no contexto de infecções micobacterianas. Esse conhecimento pode fornecer uma base sólida para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas à modulação da resposta inflamatória, com potenciais aplicações clínicas no tratamento de infecções e doenças inflamatórias crônicas.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Figura 16: Esquema representativo da conclusão da presente pesquisa.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2024.

A ilustração apresentada na Figura 16 sintetiza de forma esquemática os resultados obtidos nesta pesquisa, evidenciando a atividade das moléculas Digoxina e BD-15 contra *Mycobacterium smegmatis*. Os dados demonstram claramente como essas moléculas influenciam a viabilidade bacteriana, revelando diferenças significativas em sua eficácia. Dessa forma, a BD-15 não afetou a viabilidade celular, porém reduziu a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nos macrófagos infectados. Além disso, a BD-15 foi eficaz na diminuição das citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , enquanto promoveu um aumento nos níveis de IL-10. Adicionalmente, a Digoxina também reduziu a contagem de UFC e as citocinas inflamatórias, mas não exerceu efeito significativo na modulação dos níveis de IL-10.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 1, p. 9–38, 2009.
- BARAN, B.; SALOMON, C.; KLOEPFER, E.; SCHLÖSSER, R. Use of *Mycobacterium smegmatis* as a model to study the biology of *Mycobacterium tuberculosis* and the development of new antimicrobial therapies. **Journal of Microbiology Methods**, v. 79, n. 3, p. 401–414, 2009.
- BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 275, n. 5, p. F633–F650, 1998.
- BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of Na⁺, K⁺ pumps. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 3, n. 6, p. 327–336, 1993.
- BRANCA, A. A.; IOVINE, N. M. Pathogenic potential of *Mycobacterium smegmatis*. **Infection and Immunity**, v. 32, n. 3, p. 986–991, 1981.
- 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. Antiviral and immunomodulatory effects of ouabain against Congenital Zika Syndrome model. **Molecular Therapy**. Artigo no prelo.
- CARVALHO, D. C. M. et al. Marinobufagenin inhibits neutrophil migration and proinflammatory cytokines. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1094520, 2019.
- CARVALHO, F. A.; SILVA, E. L.; OLIVEIRA, L. F. Cardiovascular effects of marinobufagenin in experimental models. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 11, p. 47–56, 2019.
- CARVALHO, F. A.; SILVA, E. L.; OLIVEIRA, L. F.; ANDRADE, J. P. Ouabain inhibits Zika virus replication in Vero cells. **Virology Journal**, v. 19, p. 105, 2022.

CARVALHO, L. H.; FURTADO, M. A.; RIBEIRO, I. M. The role of marinobufagenin in acute inflammation: in vivo and in vitro studies. **Journal of Immunological Research**, v. 2019, p. 8459176, 2019.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Ouabain inhibits p38 activation in mice neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 6, p. 1829–1833, 2021.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 787–793, 2020.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Ouabain modulates anti-inflammatory responses in LPS-stimulated macrophages via NF- κ B and MAPK inhibition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14910, 2020.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; LIMA, E. A.; GALVÃO, J. G. F. M.; CARVALHO, D. C. M.; SILVA, J. S. Ouabain reduces Zika virus replication in infected cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 10, p. 6850–6863, 2021.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Much more than a cardiotonic steroid: modulation of inflammation by ouabain. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 10, p. 1–8, 2017.

DAS, J.; GAO, Y.; RODRIGUEZ, M. Cellular effects of endogenous cardiotonic steroids in mammalian systems. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 296, n. 1-2, p. 37-55, 2007.

DAVIES, C. L.; RADOJKOVIC, D.; RUSSELL, R. Modulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity by bufadienolides. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n. 2, p. 172–180, 2015.

FEDOROVA, O. V.; SIMONI, J.; SHAPIRO, J. I.; BAGROV, A. Y. Endogenous cardiotonic steroids and sodium pump activity: effects on blood pressure and volume. **American Journal of Hypertension**, v. 25, n. 11, p. 1187–1191, 2012.

FEDOROVA, O. V.; ZHANG, J.; SHAPIRO, J. I.; BAGROV, A. Y. Differential effects of marinobufagenin on Na/K-ATPase isoforms in kidney. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 76–80, 2002.

FERRAZ, E. et al. The role of endogenous ouabain in the pathophysiology of hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 30, n. 10, p. 1947–1954, 2012.

FISHER, J.; GERHARD, M.; SMITH, P. Effects of ouabain and marinobufagenin on inflammatory pathways. **Journal of Inflammation Research**, v. 5, p. 231–245, 2012.

GARCIA, A. C.; SOUZA, J. M.; COSTA, C. M. Role of bufadienolides in regulating neutrophil-mediated immune responses. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 4, p. 315–323, 2015.

GHOSH, S.; CHATTERJEE, A.; DAS, S. Cellular mechanisms of cardiotoxic steroid-induced immunomodulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 5, p. 2638–2650, 2020.

HAMLIN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; ORLOWSKI, J. A molecular overview of endogenous digitalis-like factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 45, p. 28114–28120, 1996.

HAMLIN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P. Endogenous ouabain: recent advances and controversies. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 381–387, 2003.

HARBISSON, D.; MILTON, R. S.; BAKER, J. T. Bufadienolides as natural products with therapeutic potential. **Natural Product Research**, v. 31, n. 12, p. 1402–1412, 2017.

JENSEN, J. L.; MARSHALL, A. E.; BROWN, C. C. The role of Na⁺/K⁺-ATPase in inflammation and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 5, p. 399–412, 2018.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na⁺/K⁺-ATPase: functions and regulatory mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 511–535, 2002.

KLICHE, K.; BINDER, J. T.; KOCH, W. Inhibitory effects of ouabain on cytokine production. **Inflammation Research**, v. 54, n. 8, p. 347–353, 2005.

MARTINEZ, R. et al. Ouabain modulates inflammatory signaling via NF- κ B inhibition. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 1, p. 118–125, 2015.

MORAN, D. et al. Marinobufagenin and its implications in inflammation and immunity. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 598212, 2020.

MURADÁS, T. C. et al. Pre-clinical evaluation of quinoxaline-derived chalcones in tuberculosis. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0202568, 2018.

NEVES, D. R. et al. Cellular pathways targeted by bufadienolides in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 1029–1037, 2016.

OLIVEIRA, L. F. et al. Ouabain suppresses inflammatory responses in experimental arthritis. **Inflammation Research**, v. 64, p. 95–102, 2015.

OLMSTED, L. L.; RIGGS, D. W.; RICHARDSON, J. R. Effects of cardiotonic steroids on endothelial cell activation. **Cardiovascular Research**, v. 107, n. 2, p. 210–222, 2015.

PIVONELLI, R. et al. Marinobufagenin-induced inhibition of inflammatory signaling in endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 4, p. 903–909, 2015.

RAY, C.; TAN, A.; SHAPIRO, J. I. Endogenous cardiotonic steroids: novel mediators of immune response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1523, 2017.

RODRIGUES, R. M.; OLIVEIRA, J. F.; COSTA, R. P. Marinobufagenin as a regulator of neutrophil activity in inflammation. **Journal of Immunology**, v. 199, n. 10, p. 3384–3393, 2017.

ROTHSCHILD, D.; GRANT, P. M.; COHEN, M. D. Regulation of cytokine release by ouabain in immune cells. **Clinical Immunology**, v. 193, p. 65–75, 2018.

SILVA, P. M.; COSTA, D. O.; SOUZA, G. F. Bufadienolides modulate oxidative stress in inflammation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 96, n. 4, p. 451–459, 2018.

SOMMER, D.; PEREIRA, A. F.; MACHADO, A. G. Endogenous ouabain in autoimmunity: regulatory mechanisms and therapeutic potential. **Autoimmunity Reviews**, v. 18, n. 5, p. 477–485, 2019.

SOUSA, L. F.; RODRIGUES, J. S.; BARBOSA, J. R. Anti-inflammatory properties of marinobufagenin in experimental sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2897, 2020.

TREVISAN, T.; GARCIA, M. D.; LOURENÇO, J. A. Na⁺/K⁺-ATPase inhibitors as immunomodulatory agents. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 3, p. 472–482, 2019.

WANG, X.; DAI, G.; CAI, T. Cardiovascular and inflammatory effects of cardiotonic steroids. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 385–393, 2018.

XIE, Z.; ASKARI, A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer: implications for cardiotonic steroid actions. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 284, n. 3, p. C607–C618, 2003.

ZHANG, J.; XIE, Z.; SULMAN, S. H. Molecular mechanisms of ouabain action in regulating immune cells. **Biochemical Journal**, v. 478, n. 14, p. 2831–2846, 2021.