



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



**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ESTEROIDE CARDIOTÔNICO BD-8 *IN VITRO* E *IN VIVO***

**ANNA BEATRIZ ARAUJO MEDEIROS**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2025**

**ANNA BEATRIZ ARAUJO MEDEIROS**

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ESTEROIDE CARDIOTÔNICO BD-8 *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

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

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup>. Deyse Cristina Madruga  
Carvalho

**JOÃO PESSOA - PB**

**2025**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

M488a Medeiros, Anna Beatriz Araujo.  
Atividade imunomoduladora do esteroide cardiotônico  
BD-8 in vitro e in vivo / Anna Beatriz Araujo Medeiros.  
- João Pessoa, 2025.  
63 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.  
Coorientação: Deyse Cristina Madruga Carvalho.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Esteroides cardiotônicos. 2. Inflamação. 3.  
Neutrófilos. 4. Lesão pulmonar aguda. 5. Edema de Pata.  
I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Carvalho, Deyse  
Cristina Madruga. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.224 (043)



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 26 de setembro de 2025.

Na data de vinte e seis de setembro do ano de dois mil e vinte e cinco às 14h00 (horário local), foi realizada, por meio da Plataforma Virtual Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do(a) discente Anna Beatriz Araújo Medeiros. O trabalho tem como título "ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ESTERÓIDE CARDIOTÔNICO BD-8 EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS IN VITRO E IN VIVO". 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 Janeusa Trindade De Souto (UFRN) e pelo 2º examinador (examinador interno) Prof.ª Dr.ª Fabíola Cruz Nunes (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.

Documento assinado digitalmente

 SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS  
Data: 29/09/2025 15:01:56-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

**Prof.ª Dr.ª Sandra Rodrigues Mascarenhas**

Documento assinado digitalmente

 JANEUSA TRINDADE DE SOUTO  
Data: 28/09/2025 23:02:50-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

**Prof.ª Dr.ª Janeusa Trindade De Souto**

Documento assinado digitalmente

 FABIOLA DA CRUZ NUNES  
Data: 29/09/2025 08:02:01-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

**Prof.ª Dr.ª Fabíola Cruz Nunes**

*Dedico aos meus pais Jânio Curinga Medeiros  
e Maria Paulina Gomes de Araújo Medeiros, e  
à minha irmã Priscylla Emerentina Araújo  
Medeiros.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Paulina e Jânio**, por me apoiarem e darem suporte em toda decisão da minha vida, desde a escolha da graduação, a decisão de iniciar o mestrado e a escolha dos meus próximos passos da vida profissional. Só tenho a agradecer todo o sacrifício que vocês fazem por mim, vocês foram importantes em todas as etapas e são a minha base e inspiração para tudo.

À minha irmã **Priscylla**, por me guiar, pensar junto comigo, por me lembrar que sou capaz quando eu penso que não e por ser meu braço direito desde sempre. Por mesmo de longe me ajudar e me acolher, somos melhores amigas.

À minha orientadora **Sandra Mascarenhas**, por ser uma pessoa incrível e que conforta todos os seus alunos com sua serenidade e alto astral, gostaria de agradecer por me dar a oportunidade de iniciar minha vida científica e acreditar no meu potencial, você é uma inspiração e é muito mais que nossa orientadora, é a nossa amiga. Também quero agradecer a melhor coorientadora, **Deyse Carvalho**, por me ensinar desde a iniciação científica sempre com paciência e sem surtar, seu saber e sua leveza atravessam fronteiras! Obrigada por todas as oportunidades.

Aos meus amigos que fiz no Laboratório de Imunobiologia, **Thalita, Victor, Elton, Gabriela, Daniel, Marreiro, Davi e Mariana**. Obrigada por fazerem parte de todos os momentos, animarem o ambiente, toparem ajudar nos experimentos da madrugada e enlouquecerem junto, amo fazer pesquisa com vocês.

Aos meus companheiros e amigos de experimentos **Davi e Mariana**, vocês foram essenciais em todo momento, obrigada por não me deixarem em nenhum momento e me ajudarem em todas as etapas, devo tudo a vocês! Davi por sua calmaria e leveza, Mariana por seu companheirismo e por estar junto de mim desde sempre, vocês trazem alegria a qualquer momento.

À minha irmã de alma **Noêmia**, que conheci no mestrado e virou uma amiga para a vida, obrigada por ouvir meus desabafos e por sempre estar presente, obrigada por sempre me apoiar e me tranquilizar com suas palavras.

Aos meus amigos que de fora mas sempre me apoiaram em tudo, **Gabriela e Arthur**, obrigada por todos os momentos de descontração, por tornar essa jornada mais leve e sempre acreditarem no meu potencial.

À banca examinadora, composta por **Maria do Socorro Falcão, Janeusa Souto, Fabíola Nunes e Luiz Henrique Silva**, pela disponibilidade e por colaborarem com a melhoria deste trabalho.

## RESUMO

Os esteroides cardiotônicos (ETCs) são compostos conhecidos por se ligarem à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e modular diferentes processos biológicos, incluindo a resposta imunológica. O  $\gamma$ -benzilideno digoxina 8 (BD-8) é um ETC sintético que possui atividade imunomoduladora, onde já foi visto sua ação reduzindo a atividade fagocítica, níveis de óxido nítrico (NO) e a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  em macrófagos peritoneais murinos. Além disso, o BD-8 também reduziu a expressão de iNOS e a fosforilação do NF- $\kappa$ B, ERK e p38, entretanto, ainda são necessários mais estudos para elucidar sua ação. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade imunomoduladora do BD-8 em macrófagos peritoneais murino *in vitro* a partir da análise das proteínas Akt, mTOR e Src e *in vivo* em modelos de edema de pata e lesão pulmonar aguda (LPA). Para os testes *in vitro*, camundongos Swiss albino fêmeas foram previamente estimulados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de tioglicolato a 4%. Os macrófagos provenientes do lavado peritoneal foram cultivados e estimulados com zimosan (0,2 mg/mL) e/ou tratadas com BD-8 (10  $\mu$ M) por 24 horas, para posterior análise das proteínas Akt, mTOR e Src por citometria de fluxo. Para os testes *in vivo*, no modelo de edema de pata, os camundongos foram tratados com injeção (i.p.) do BD-8 (1,12 mg/kg; 0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg) e estimulados com uma injeção intraplantar de carragenina (2,5%), a espessura da pata foi quantificada utilizando um paquímetro digital e também foi realizada a análise histológica da pata. Já no modelo de LPA, os animais foram estimulados com LPS via instilação nasal (5 mg/kg) e tratados (i.p.) com o BD-8 (0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg) nos tempos de 1, 24 e 48 horas após o desafio com LPS, foi realizada a coleta do lavado broncoalveolar (BALF) e realizado o esfregaço sanguíneo para as análises. Como resultado, foi visto que o BD-8 modulou negativamente as proteínas Akt, mTOR e Src *in vitro*. Além disso, essa molécula também reduziu o edema de pata nas doses de 0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg, apresentando maior efeito na menor dose testada, esse resultado também foi visto na análise histológica. Já no modelo de LPA, o BD-8, na menor dose testada, reduziu a migração celular, e nas doses de 0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg reduziu os neutrófilos no lavado broncoalveolar (BALF). Adicionalmente, a menor dose testada também reduziu os níveis de proteínas totais e a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  no BALF. Na análise histológica do tecido pulmonar foi observado redução das características de LPA. O tratamento com o BD-8 não modulou o número de leucócitos sanguíneos, indicando ação local do composto no tempo testado. Dessa forma, este trabalho contribui para o desenvolvimento de novas substâncias com potencial terapêutico, além de ampliar o entendimento sobre a molécula BD-8 e a sua capacidade em modular processos biológicos e inflamatórios.

**Palavras-chave:** Inflamação. Neutrófilos. Lesão Pulmonar Aguda. Edema de Pata.

## ABSTRACT

Cardiotonic steroids (CTS) are compounds known to bind to the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and modulate various biological processes, including the immune response.  $\gamma$ -Benzylidene digoxin 8 (BD-8) is a synthetic CTS with immunomodulatory activity. Its action has been shown to reduce phagocytic activity, nitric oxide (NO) levels, and the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in murine peritoneal macrophages. Furthermore, BD-8 also reduced iNOS expression and the phosphorylation of NF- $\kappa$ B, ERK, and p38; however, further studies are needed to elucidate its action. Therefore, the objective of this study was to evaluate the immunomodulatory activity of BD-8 in murine peritoneal macrophages *in vitro* by analyzing Akt, mTOR, and Src proteins and *in vivo* in models of paw edema and acute lung injury (ALI). For *in vitro* tests, female Swiss albino mice were previously stimulated with an intraperitoneal (i.p.) injection of 4% thioglycolate. Macrophages from peritoneal lavage were cultured and stimulated with zymosan (0.2 mg/mL) and/or treated with BD-8 (10  $\mu$ M) for 24 hours, for subsequent analysis of Akt, mTOR, and Src proteins by flow cytometry. For *in vivo* tests, in the paw edema model, the mice were treated with an i.p. injection of BD-8 (1.12 mg/kg; 0.56 mg/kg, and 0.28 mg/kg) and stimulated with an intraplantar injection of carrageenan (2.5%). Paw thickness was quantified using a digital caliper, and histological analysis of the paw was also performed. In the ALI model, the animals were stimulated with LPS via nasal instillation (5 mg/kg) and treated (i.p.) with BD-8 (0.56 mg/kg and 0.28 mg/kg) at 1, 24, and 48 hours after the LPS challenge. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and a blood smear was performed for analysis. As a result, it was seen that BD-8 negatively modulated Akt, mTOR, and Src proteins *in vitro*. Furthermore, this molecule also reduced paw edema at doses of 0.56 mg/kg and 0.28 mg/kg, showing a greater effect at the lowest dose tested; this result was also seen in the histological analysis. In the ALI model, BD-8, at the lowest dose tested, reduced cell migration, and at doses of 0.56 mg/kg and 0.28 mg/kg, it reduced neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Additionally, the lowest dose tested also reduced total protein levels and the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in BALF. Histological analysis of lung tissue showed a reduction in ALI characteristics. Treatment with BD-8 did not modulate the number of blood leukocytes, indicating local action of the compound during the period tested. Therefore, this work contributes to the development of new substances with therapeutic potential, in addition to expanding the understanding of the BD-8 molecule and its ability to modulate biological and inflammatory processes.

**Keywords:** Inflammation. Neutrophils. Acute Lung Injury. Paw Edema.

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Estrutura dos esteroides cardiotônicos.
- Figura 2. Estrutura química do  $\gamma$ -benzilideno digoxina 8 (BD-8).
- Figura 3. Atividade imunomoduladora do BD-8.
- Figura 4. Migração de leucócitos.
- Figura 5. Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda.
- Figura 6. Vias de sinalização intracelulares.
- Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental de cultura de macrófagos peritoneais.
- Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental de citometria de fluxo.
- Figura 9. Esquema representativo do protocolo experimental de edema de pata induzida por Carragenina.
- Figura 10. Esquema representativo do protocolo experimental de histologia da pata.
- Figura 11. Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.
- Figura 12. Esquema representativo do protocolo experimental de contagem total e diferencial.
- Figura 13. Esquema representativo do protocolo experimental de esfregaço sanguíneo.
- Figura 14. Esquema representativo do protocolo experimental de histologia do tecido pulmonar.
- Figura 15. Esquema representativo do protocolo experimental de dosagem de proteínas totais.
- Figura 16. Esquema representativo do protocolo experimental de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche.
- Figura 17. Efeito do BD-8 nas proteínas Akt/mTOR e Src em macrófagos peritoneais.
- Figura 18. Efeito do BD-8 no edema de pata induzido por carragenina em camundongo.
- Figura 19. Efeito do BD-8 na migração de células totais e diferenciais durante a LPA induzida por LPS em camundongo.
- Figura 20. Efeito do BD-8 nos leucócitos na circulação sanguínea durante a LPA induzida por LPS em camundongo.
- Figura 21. Efeito do BD-8 no tecido pulmonar durante a LPA induzida por LPS em camundongo.
- Figura 22. Efeito do BD-8 nos níveis de proteínas totais durante a LPA induzida por LPS em camundongo.

Figura 23. Efeito do BD-8 nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  durante a LPA induzida por LPS em camundongo.

Figura 24. Efeito imunomodulador do BD-8 *in vitro* e em modelos *in vivo*.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Grupos experimentais utilizados no modelo *in vivo* de edema de pata.

Tabela 2. Grupos experimentais utilizados no modelo *in vivo* de LPA.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico  
ANOVA - Análise de Variância  
ATP - Adenosina Trifosfato  
BALF - Lavado Broncoalveolar  
BD-8 -  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8  
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CSFs - Fatores Estimuladores de Colônias  
CTR - Controle  
DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano  
DEXA - Dexametasona  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
E.P.M - Erro Padrão da Média  
ECTs - Esteroides Cardiotônicos  
ELISA - Ensaio Imunoenzimático  
ERK - Kinase Reguladora de Sinais Extracelulares  
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio  
GPCRs - Receptores Acoplados à Proteína G  
ICAM-1 - Molécula de Adesão Intercelular 1  
IFNs - Interferons  
IgE - Imunoglobulina E  
IL - Interleucina  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-6R - Receptor de Interleucina 6  
IL-4 - Interleucina 4  
IL-13 - Interleucina 13  
IL-33 - Interleucina 33  
iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível  
i.p. - Intraperitoneal  
LPA - Lesão Pulmonar Aguda  
LPS - Lipopolissacarídeo  
MAPKs - Proteínas Kinases Ativadas por Mitógenos

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase - Bomba sódio-potássio  
NF-κB - Fator Nuclear kappa-B  
NLRP3- Família NLR, Domínio de Pirina Contendo 3  
NO - Óxido Nítrico  
PAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Patógeno  
PBS - Solução Fosfato Tamponado  
PBST - Solução Fosfato Tamponado Contendo Tween  
PI3K - Fosfoinositídeo 3-quinase  
PIP2 - Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato  
PIP3 - Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato  
PKB - Proteína Quinase B  
PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões  
Rcf - Força Centrífuga Relativa  
RTK - Receptores Tirosina Quinases  
SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo  
SFB - Soro Fetal Bovino  
Src - Quinase Src  
sTNF - Fator de Necrose Tumoral Solúvel  
TGFs - Fatores de Crescimento Transformadores  
TGF-β - Fator de Crescimento Transformante Beta  
TLR2 - Receptor Toll-like Tipo 2  
TLR6 - Receptor Toll-like Tipo 6  
TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alpha  
TNFR1 - Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1  
TNFR2 - Receptor do Fator de Necrose Tumoral 2  
UFPB - Universidade Federal da Paraíba  
VCAM-1 - Molécula de Adesão Celular Vascular 1  
ZIM - Zimosa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Esteroides cardiotônicos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Inflamação e esteroides cardiotônicos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Inflamação e o papel dos neutrófilos.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Papel das citocinas pró-inflamatórias.....	23
1.3.2 Vias de sinalização.....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
3.2.1 <i>In vitro</i> .....	27
3.2.2 <i>In vivo</i> .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Animais.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Obtenção do esteroide cardiotônico <math>\gamma</math>-benzilideno digoxina 8 (BD-8).....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Experimento <i>in vitro</i>.....</b>	<b>28</b>
4.3.1 Preparação do BD-8 para o teste <i>in vitro</i> .....	28
4.3.2 Cultura de macrófagos peritoneais.....	28
4.3.3 Análise da expressão de moléculas intracelulares por citometria de fluxo.....	29
<b>4.4 Experimentos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>30</b>
4.4.1 Preparação da BD-8 para os testes <i>in vivo</i> .....	30
4.4.2 Modelo de edema de pata.....	31
4.4.3 Análise histológica da pata.....	33
4.4.4 Modelo de lesão pulmonar aguda (LPA).....	34
4.4.5 Coleta do lavado broncoalveolar (BALF).....	36
4.4.6 Contagem diferencial de células do BALF.....	36
4.4.7 Contagem de esfregaço sanguíneo.....	37
4.4.8 Análise histológica do tecido pulmonar.....	37
4.4.9 Dosagem de proteínas totais do BALF.....	39
4.4.10 Ensaio imunoenzimático para dosagem das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ do BALF.....	40
<b>4.5 Análises estatísticas.....</b>	<b>41</b>

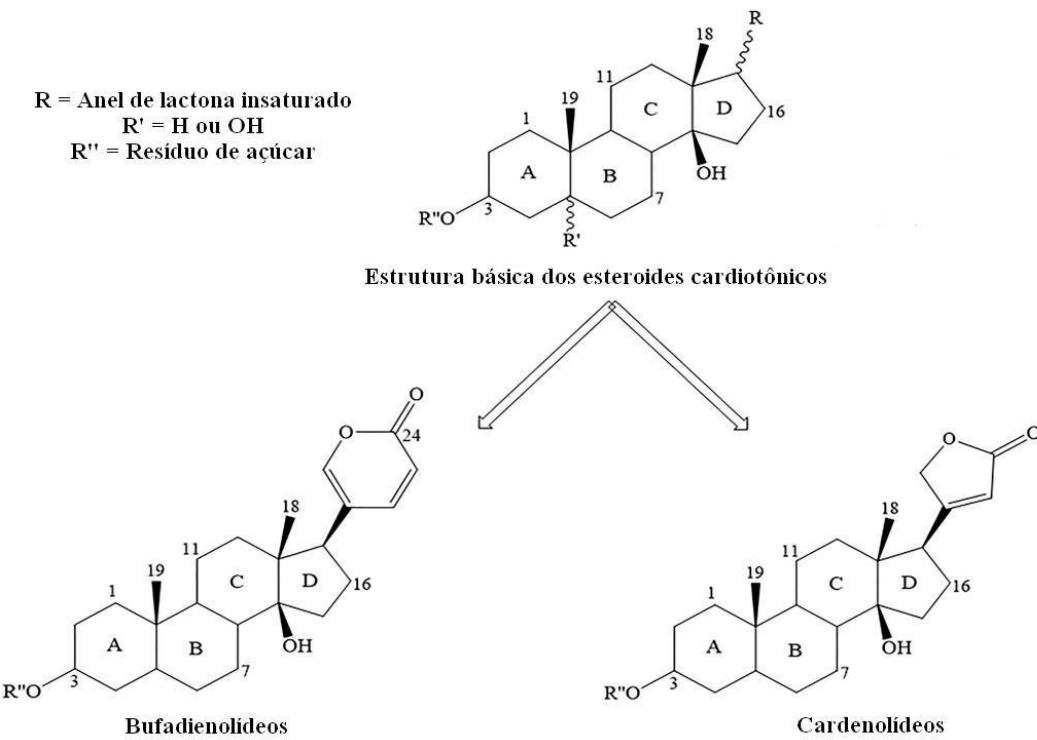
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Resultados <i>in vitro</i>.....</b>	<b>41</b>
5.1.1 Efeito do BD-8 nas vias Akt, mTOR e Src.....	41
<b>5.2 Resultados <i>in vivo</i>.....</b>	<b>43</b>
5.2.1 Efeito do BD-8 no edema de pata induzido por carragenina.....	43
5.2.2 Efeito do BD-8 na migração de células totais e diferenciais durante a LPA induzida por LPS.....	44
5.2.3 Efeito do BD-8 nos leucócitos na circulação sanguínea durante a LPA induzida por LPS.....	46
5.2.4 Efeito do BD-8 no tecido pulmonar durante a LPA induzida por LPS.....	48
5.2.5 Efeito do BD-8 nos níveis de proteínas totais durante a LPA induzida por LPS.....	49
5.2.6 Efeito do BD-8 nos níveis de citocinas pró-inflamatórias durante a LPA induzida por LPS.....	50
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Esteroides cardiotônicos

Os esteroides cardiotônicos (ECTs) são compostos orgânicos que possuem diferentes atividades biológicas, dentre elas, interagir e inibir a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Esses esteroides possuem sua estrutura básica composta por um resíduo de açúcar, um núcleo esteroidal e um anel de lactona insaturado, e a partir disso esses compostos são classificados em cardenolídeos quando o anel lactônico apresentar 5 membros e bufadienolídeos quando apresentar 6 membros (Ren *et al.*, 2022).

**Figura 1.** Estrutura dos esteroides cardiotônicos.



Fonte: Adaptado de Ren *et al.*, 2022.

Os cardenolídeos foram inicialmente identificados e isolados de plantas, como a ouabaína que foi originalmente isolada da espécie *Digitalis purpurea* e a digoxina da *Digitalis lanata* (Kelly; Smith, 1994), já os bufadienolídeos foram inicialmente identificados na pele e na glândula parótida de anfíbios, como a marinobufagina que foi originalmente isolada do veneno do sapo *Bufo marinus*, atualmente chamado *Rhinella marina* (Dvela *et al.*, 2007). Posteriormente, esses esteroides foram identificados endogenamente em mamíferos, onde

foram relatados a presença no plasma, suco biliar, glândula adrenal, placenta e urina (Bagrov; Shapiro; Fedorova, 2009).

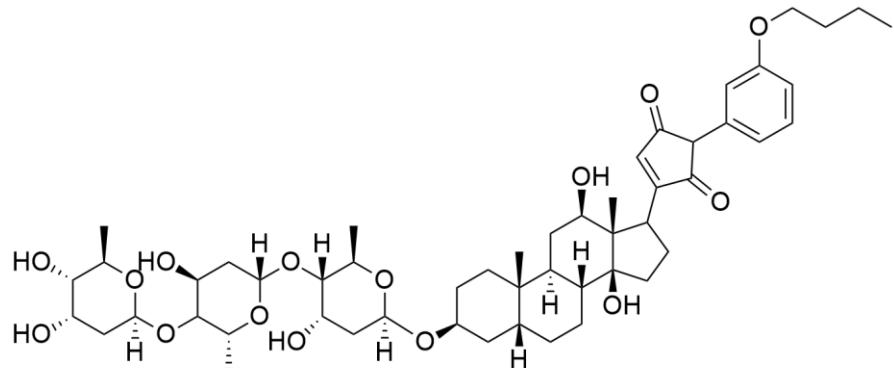
O córtex adrenal e o hipotálamo são considerados os principais locais de produção dos ECTs endógenos (Bagrov; Shapiro; Fedorova, 2009). O precursor da biossíntese desses compostos é o colesterol, desse modo, a sua secreção é influenciada por mediadores como a angiotensina II, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), vasopressina e fenilefrina (Laredo; Hamilton; Hamlyn, 1995; Pavlovic, 2020).

A bomba de sódio e potássio, ou  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, é uma proteína de membrana que utiliza a energia da hidrólise do ATP para o transporte ativo de 3 íons de  $\text{Na}^+$  e 2 íons de  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática (Pirahanchi; Jessu; Aeddula, 2023). A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é constituída pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo a subunidade  $\alpha$  a unidade catalítica que possui 4 isoformas identificadas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ ), é nela que se encontra o local de interação com os ECTs no lado extracelular que atuam inibindo a atividade da bomba (Pessôa *et al.*, 2018). A inibição dessa bomba pelos ECTs leva a um efeito inotrópico positivo a partir do aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular assim, esses esteroides são utilizados clinicamente no tratamento de insuficiência cardíaca (Ren *et al.*, 2022).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, além da função de bomba iônica, também atua como receptor para os ECTs, que se ligam e iniciam uma cascata de sinalização intracelular (Xu *et al.*, 2023). Nesse contexto, já foi demonstrado que, em baixas concentrações, os esteroides se ligam à essa bomba sem inibir o transporte iônico, mas levando à mudanças conformacionais que levam à ativação de várias vias de transdução de sinal que regulam a ativação, crescimento e proliferação celular (Rognant *et al.*, 2022; Hafner; Schmiech; Lang, 2021; Kravtsova *et al.*, 2019).

Além dos ECTs endógenos, foi realizada a semi-síntese dos  $\gamma$ -benzilidenos digoxina (BDs), que são esteroides sintetizados a partir da digoxina, visando uma maior especificidade de isoforma da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Análises *in silico* demonstraram que as interações nos sítios de ligação dos ECTs sintéticos, a BD-4, BD-8 e BD-13 apresentaram uma alta seletividade para a isoforma  $\alpha 2$ , estimulando sua atividade, enquanto a BD-14 e BD-15 mostraram boa seletividade para a isoforma  $\alpha 3$ . Desse modo, foi demonstrado que essa classe de esteroides sintéticos possui possibilidade 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 (Pessôa *et al.*, 2018). O  $\gamma$ -benzilideno digoxina 8 (BD-8), esteroide cardiotônico utilizado no presente trabalho, possui atividade imunomoduladora já demonstrada previamente em macrófagos peritoneais (Ferreira *et al.*, 2024).

**Figura 2.** Estrutura química do  $\gamma$ -benzilideno digoxina 8 (BD-8).



## 1.2 Inflamação e esteroides cardiotônicos

Vários estudos já demonstraram o efeito dos esteroides cardiotônicos na inflamação. Em modelo de peritonite induzida por zimosan, a ouabaína reduziu o número total de leucócitos e das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no lavado peritoneal (Leite *et al.*, 2015). Este esteroide também atuou reduzindo o edema de pata de camundongo induzido por carragenina, composto 48/80 e zimosan, além de inibir a migração celular na peritonite induzida por concanavalina A (De Vasconcelos *et al.*, 2011).

Na inflamação pulmonar alérgica, o tratamento com a ouabaína reduziu a migração celular induzida por ovalbumina, linfócitos CD3+, os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ , do fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e das alarminas IL-33 e TSLP. Além disso, este esteroide também reduziu o nível sérico de imunoglobulina E específica para ovalbumina no lavado broncoalveolar e a ativação da MAPK p38 (Galvão *et al.*, 2017; Galvão *et al.*, 2022).

Além disso, em estudos *in vitro* utilizando células Vero, o tratamento com a ouabaína antes e depois da infecção reduziu a replicação viral da cepa brasileira de Zika vírus (Carvalho *et al.*, 2022). Esse esteroide também reduziu a infecção por ZIKV em células-tronco neurais e progenitoras humanas (hNS/PCs) e em modelo murino de síndrome congênita do Zika, além de diminuir os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF na placenta de camundongos (Carvalho *et al.*, 2025).

Estudos demonstraram que a ouabaína também atuou reduzindo a ativação da MAPK p38 e a expressão da molécula de adesão CD18 em neutrófilos (Cavalcante-Silva *et al.*, 2021; Cavalcante-Silva *et al.*, 2020), além de reduzir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em macrófagos peritoneais (Leite *et al.*, 2015).

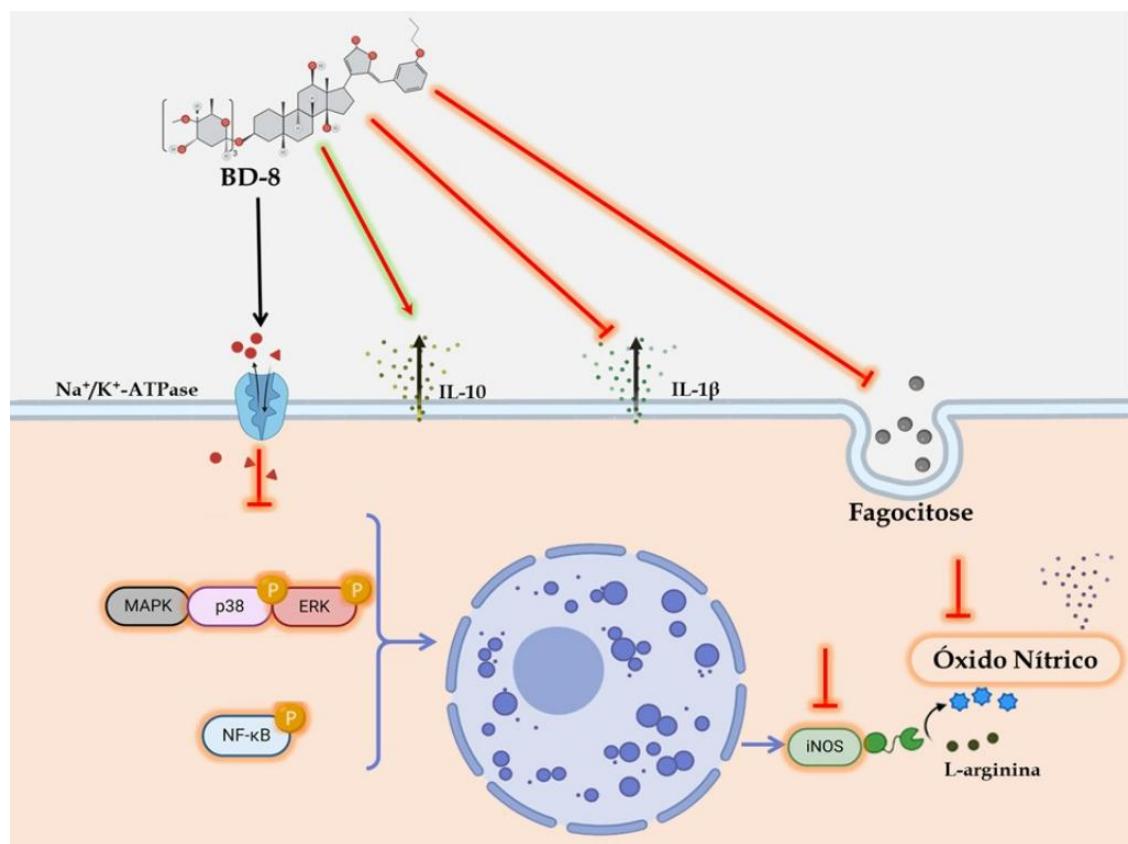
Adicionalmente, já foi demonstrado a atividade anti-inflamatória de outros esteroides cardiotônicos como a marinobufagina que, *in vitro*, reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , e *in vivo*, em modelo de peritonite, reduziu a migração de células polimorfonucleares e os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 (Carvalho *et al.*, 2019). Um outro esteroide que também apresentou efeito imunomodulador foi a digoxina que, em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), reduziu as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (Ihenetu *et al.*, 2008).

Além disso, estudos já demonstraram os efeitos dos esteroides cardiotônicos em diferentes situações de neuroinflamação. Em modelo de Alzheimer, a digoxina reduziu os níveis cerebrais de TNF- $\alpha$  e morte neuronal, e a marinobufagina reduziu os níveis da proteína precursora amiloide e de IL-6 (Erdogan *et al.*, 2022; Fox *et al.*, 2022). Adicionalmente, outros estudos mostraram que a ouabaína também desempenha um papel na neuroinflamação, onde *in vivo* reduz a ativação e consequente translocação do 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).

Em processos infecciosos, foi observado que o esteroide cardiotônico semi-sintético BD-15 apresentou atividade bactericida em células infectadas pelo *Mycobacterium smegmatis*, além reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esse esteroide também reduziu a expressão do complexo proteico citosólico inflamassoma (NLRP3) e aumentou a produção de IL-10 e, adicionalmente, reduziu a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em células infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Magalhães *et al.*, 2025).

Com relação ao BD-8, como visto na figura 3, o esteroide cardiotônico utilizado no presente estudo, foi demonstrado sua atividade imunomoduladora *in vitro* em macrófagos peritoneais estimulados com zymosan, onde esse composto reduziu a atividade fagocítica, os níveis de óxido nítrico (NO) e a produção de IL-1 $\beta$ , por outro lado, aumentou a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, o BD-8 diminuiu a expressão de iNOS e a fosforilação de NF- $\kappa$ B p65, ERK e p38 (Ferreira *et al.*, 2024). Dessa forma, diante do exposto, são necessários mais estudos para elucidar e melhor entender a atividade biológica da molécula BD-8.

**Figura 3.** Atividade imunomoduladora do BD-8.



Fonte: Adaptado de Ferreira *et al.*, 2024.

### 1.3 Inflamação e o papel dos neutrófilos

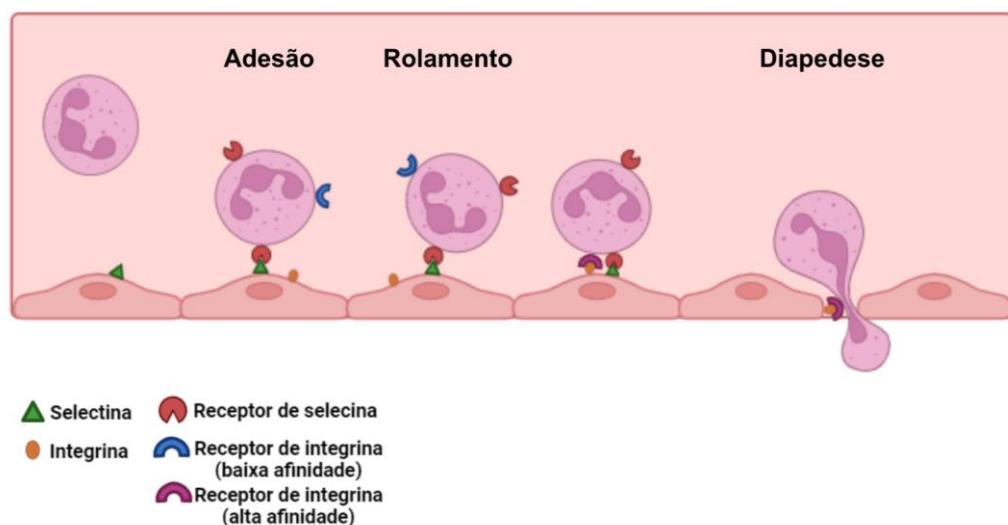
O sistema imunológico, entre várias outras funções, possui um papel fundamental no reconhecimento e eliminação de microrganismos patogênicos por diferentes processos, como a indução da inflamação (Medzhitov, 2021). A inflamação é uma resposta fisiológica que tem como característica remover estímulos prejudiciais e iniciar o processo de cicatrização ocasionados por fatores como infecção e lesão tecidual (Soliman; Barreda, 2022).

A inflamação possui duas fases, a aguda e a crônica. A fase aguda é a resposta inicial do organismo, nessa fase ocorre a migração de células para o tecido, sendo os principais tipos celulares dessa fase os neutrófilos e os macrófagos. Além disso, nessa fase ocorre o aparecimento das características do processo inflamatório: rubor, calor, edema, dor e/ou perda de função. Se os mecanismos agudos forem desregulados ou insuficientes, se inicia a fase crônica, nessa fase, as células predominantes são os linfócitos e macrófagos (Zhang *et al.*, 2022; Herrero-Cervera; Soehnlein; Kenne, 2022).

A resposta inflamatória é iniciada a partir do reconhecimento de indutores pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLR), expressos em leucócitos e outros tipos celulares, sendo esses indutores os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Li; Wu, 2021). Desse modo, a ativação desses receptores leva ao início de uma cascata de sinalização intracelular que induz a liberação de mediadores químicos como citocinas inflamatórias, enzimas e fatores de crescimento, esses estímulos inflamatórios direcionam o recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados ou danificados (Schoppmeyer; Van Buul, 2021).

No processo de migração celular, inicialmente, as células endoteliais são ativadas por estímulos inflamatórios e a partir disso, os leucócitos circulantes se aderem de maneira instável a proteínas expressas na superfície do endotélio, como as selectinas P e E. A interação entre os ligantes dos leucócitos e as selectinas é de baixa afinidade, logo, essas células se ligam e desligam do endotélio, processo chamado de rolamento. Após essa etapa, a sinalização das quimiocinas faz com que os leucócitos aumentem a afinidade das suas moléculas de adesão, com a indução da expressão das integrinas, sendo os principais ligantes de integrinas presentes nas células endoteliais a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1). Desse modo, como mostrado na figura 4, essas células podem se aderir fortemente ao endotélio e, posteriormente, ocorrer a diapedese no sítio inflamado, onde os leucócitos se estendem através das junções entre células endoteliais para dentro do corpo da célula endotelial (Margraf; Lowell; Zarbock, 2022; Filippi, 2019).

**Figura 4.** Migração de leucócitos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares e fagocíticos que constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro, essas células constituem 50-70% de todos os leucócitos circulantes em adultos saudáveis e possuem meia-vida curta de aproximadamente 12-24 horas na circulação (Ferreira *et al.*, 2021; Burn *et al.*, 2021). Essas células utilizam vários mecanismos para eliminar patógenos, incluindo fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), geração e liberação de moléculas microbicidas após desgranulação e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Burn *et al.*, 2021).

Além de participar de processos inflamatórios e em infecções microbianas, os neutrófilos também participam da resposta imunológica tumoral e estimulam as respostas imunológicas adaptativas. Entretanto, essas células também estão envolvidas na imunopatologia de muitas doenças inflamatórias, como lesão pulmonar aguda, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite e COVID-19 (Grommes; Soehnlein, 2011; Qi *et al.*, 2024; Frade-Sosa; Sanmartí, 2023; Borges *et al.*, 2020).

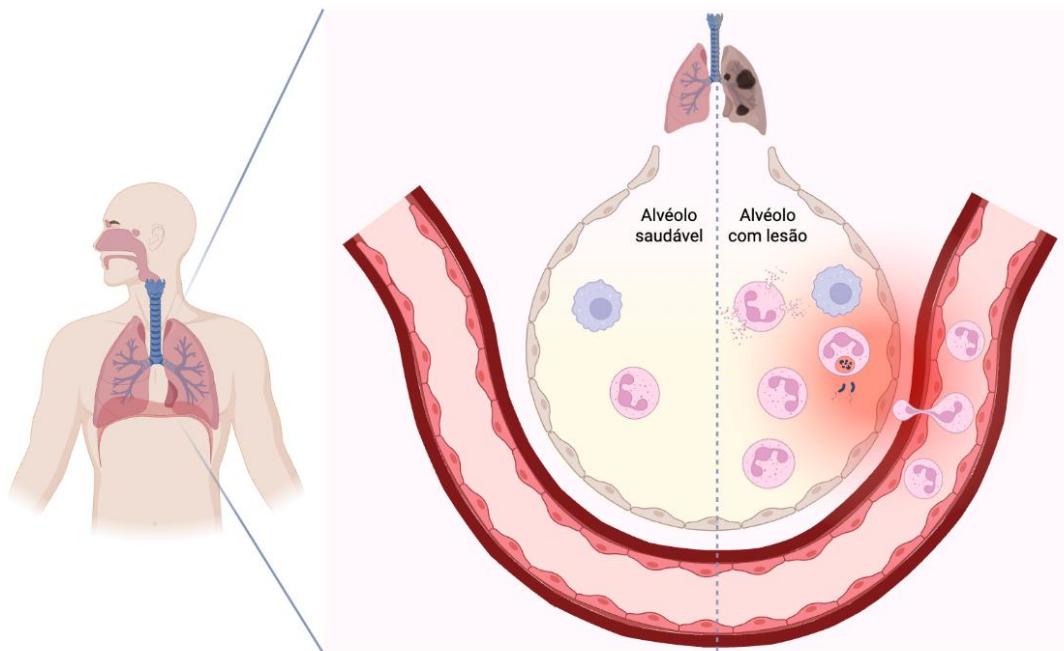
A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma condição inflamatória caracterizada pelo início agudo de dano ao tecido pulmonar e disfunção pulmonar originada de insultos infecciosos ou estéreis, sendo sua forma mais grave chamada síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Kulkarni *et al.*, 2022). A SDRA possui taxa de mortalidade de cerca de 40% e as consequências a longo prazo em pacientes que sobreviveram incluem redução da qualidade de vida relacionada à fisiologia pulmonar e saúde mental, como estresse, ansiedade e depressão (Mokra, 2020).

As características típicas da LPA são o acúmulo alveolar de fluido rico em proteínas e células imunológicas ativadas devido à ruptura da barreira endotelial pulmonar e aumento da permeabilidade vascular, resultando em edema pulmonar com comprometimento da oxigenação arterial, levando à insuficiência respiratória (Scozzi *et al.*, 2022; Bezerra *et al.*, 2023). Tanto na LPA quanto na SDRA, a lesão tecidual desencadeia a transmigração de neutrófilos que são ativados e produzem uma variedade de substâncias que exacerbam a inflamação, como proteínas plasmáticas edematosas e citocinas pró-inflamatórias, causando danos às células alveolares do tipo II produtoras de surfactante e reduzindo a camada de surfactante nos alvéolos, resultando em atelectasia alveolar e diminuição da complacência pulmonar, piorando as trocas gasosas (Mokra, 2020).

Os neutrófilos são considerados o principal tipo celular na progressão da LPA e da SDRA, o recrutamento dessas células para o pulmão ocorre nos pequenos capilares em uma sequência de ativação, sequestro do sangue para o interstício e migração transepitelial para o espaço aéreo alveolar (Grommes; Soehnlein, 2011). A partir disso, os neutrófilos ativados

liberam mediadores como EROs e NO que em excesso induzem a morte celular e aumentam a patogênese da LPA, contribuindo para as manifestações clínicas (Ni *et al.*, 2023).

**Figura 5.** Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

Desse modo, a inflamação é um processo benéfico capaz de estabelecer a homeostase do organismo, no entanto, quando descontrolada, a inflamação pode levar ao desequilíbrio homeostático e evoluir para doenças crônicas debilitantes (Medzhitov, 2021).

### 1.3.1 Papel das citocinas pró-inflamatórias

As citocinas são proteínas solúveis secretadas por uma variedade de células, principalmente células do sistema imunológico, e participam da resposta imunológica atuando como mediadores importantes interferindo em várias funções como proliferação, maturação e ativação celular (Liberale *et al.*, 2021). As citocinas podem ser classificadas em fatores de necrose tumoral (TNFs), interleucinas (ILs), linfocinas, monocinas, interferons (IFNs), fatores estimuladores de colônias (CSFs) e fatores de crescimento transformadores (TGFs) (Liu *et al.*, 2021). Essas proteínas possuem sua produção em cascata, onde uma citocina estimula suas células-alvo a produzirem outras adicionais, além disso, estímulos imunológicos como

apresentação de抗ígenos e atividade fagocitária também levam ao aumento da sua produção (Cavaillon, 1994).

Na inflamação, esses mediadores podem ser classificados em pró-inflamatórios quando aumentam e anti-inflamatórios quando diminuem o processo inflamatório. As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são mediadores que apresentam um perfil imunológico pró-inflamatório e são produzidos principalmente por fagócitos, fibroblastos e linfócitos (Wautier; Wautier, 2023). Essas citocinas possuem um importante papel na fisiopatologia de algumas doenças, como na LPA, doenças cardiovasculares e Alzheimer (Zhang *et al.*, 2023; Zhang; Dhalla, 2023; Rani *et al.*, 2024).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pertencente à família IL-1, sua ativação ocorre através do complexo proteico citosólico inflamassoma, o NLRP3, que em resposta a patógenos ativa a caspase-1, resultando na clivagem da pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$  que é secretada e biologicamente ativa (Abbate *et al.*, 2020). Na inflamação, essa citocina participa da proliferação, diferenciação e apoptose celular (Ferentinos *et al.*, 2021), e em indivíduos saudáveis, sua expressão genética é baixa ou ausente, mas aumenta acentuadamente em estados de doença (Abbate *et al.*, 2020).

A IL-6 é um membro prototípico da família de citocinas IL-6, a transcrição do seu gene é induzida por uma variedade de estímulos, como os ligantes do TLR, IL-1, TNF- $\alpha$  e EROs (Hirano, 2021). Essa citocina desencadeia respostas específicas do tipo celular, atuando nas células-alvo por meio de um receptor específico de interleucina-6 (IL-6R) e está envolvida na maioria dos estados inflamatórios (Rose-John, 2022).

O TNF é produzido primeiramente como uma proteína transmembrana expressa na superfície celular, onde continua a residir ou éativamente clivada pela enzima conversora de TNF para produzir uma forma de TNF solúvel (sTNF), que é posteriormente liberado e se liga ao receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) ou receptor do fator de necrose tumoral 2 (TNFR2), se tornando detectável e ativando vias de sinalização relacionadas a atividades de sobrevivência, morte e proliferação celular (Souza *et al.*, 2023; Holbrook *et al.*, 2019).

Diante disso, por estarem aumentadas em processos inflamatórios, doenças infecciosas e neoplasias, os níveis sanguíneos das citocinas são amplamente usados como biomarcadores, trazendo informações sobre processos fisiológicos e patológicos, corroborando para o diagnóstico e tratamento (Liu *et al.*, 2021; Wautier; Wautier, 2023).

### 1.3.2 Vias de sinalização

As respostas celulares no processo inflamatório ocorrem por uma diversidade de cascadas de sinalização celulares que comandam todas as atividades das células presentes no sítio de inflamação, sendo esse processo regulado por diferentes vias intracelulares que são ativadas a partir de estímulos como produtos microbianos e citocinas inflamatórias (Schoppmeyer; Van Buul, 2021; Chen *et al.*, 2018).

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é complexa e envolve mais de 150 proteínas, essa via cumpre funções em muitos processos celulares essenciais para a homeostase, incluindo o ciclo celular, sobrevivência celular, inflamação, metabolismo e apoptose, e a sua desregulação é relacionada ao início e à progressão de doenças, como câncer, diabetes e doenças cardíacas (Sun *et al.*, 2020; Tian; Smit; Jucker, 2023).

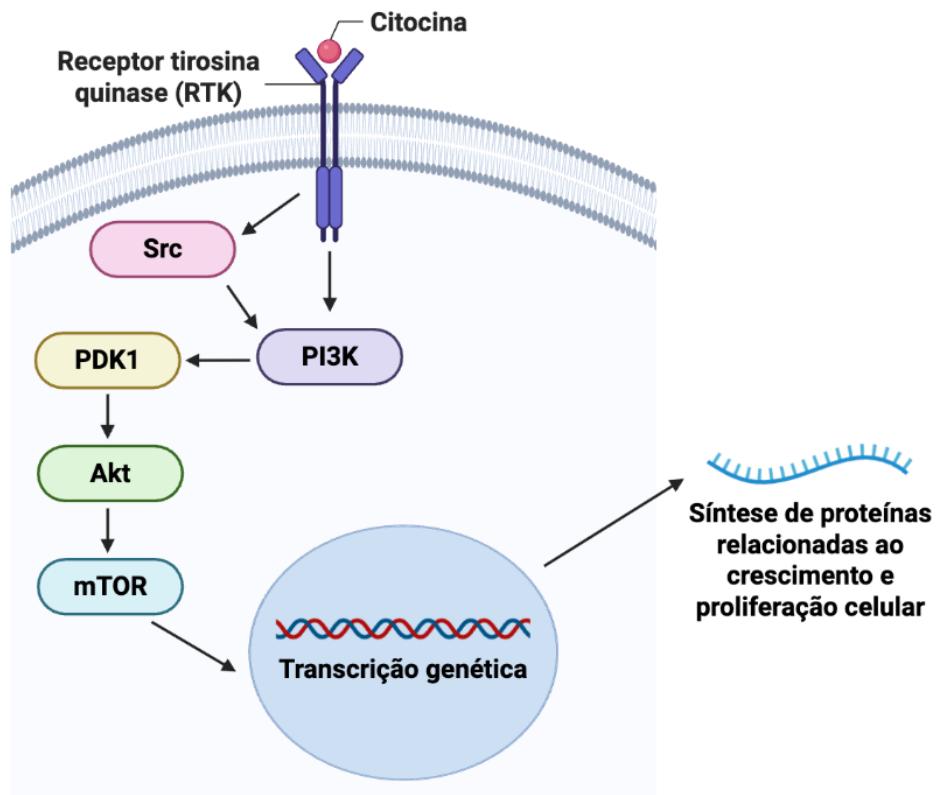
Várias moléculas, incluindo insulina, glicose e muitos fatores de crescimento e citocinas podem iniciar a sinalização PI3K/AKT/mTOR. Geralmente, essas moléculas ativam receptores tirosina quinases (RTK) e receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que subsequentemente ativam PI3K para gerar fosfolipídios. A PI3K ativada converte fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) e ativa mais efetores, como a proteína quinase B (AKT). A AKT possui duas vias principais de ativação, a via canônica PI3K/AKT, onde a quinase-1 dependente de fosfoinositídeo (PDK1) e AKT são recrutadas para a superfície interna da membrana celular e PDK1 inicia a fosforilação de AKT1 em Thr30810. E a via mediada pelo mTORC2, que interage com o domínio hidrofóbico regulador de AKT para fosforilá-lo em Ser47311, e assim, o AKT fosforilado pode fosforilar o mTOR em Ser 2448 para ativar diretamente o mTORC1 (Miricescu *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020; Basile *et al.*, 2022).

Além disso, outra via importante para o recrutamento e ativação de leucócitos é a da família da proteína tirosina quinase (PTK) Src, que desempenham um papel crítico na regulação da permeabilidade vascular e respostas inflamatórias em células teciduais. Os membros da família Src são ativados em resposta à estimulação de uma variedade de receptores de superfície celular, como receptores de tirosina quinase, receptores de integrina, receptores acoplados à proteína G, e por estresse celular (Li *et al.*, 2022). Além disso, essa proteína interage com outras proteínas celulares, como receptores de superfície celular, integrinas, moléculas de adesão, e resulta na ativação de outros alvos, onde já foi observada a associação da Src com a via PI3K/AKT/mTOR (Raji; Tetth; Amin, 2023).

A Src fosforila um resíduo de tirosina em sua proteína alvo, e a sua atividade é regulada pela autofosforilação de seus próprios resíduos de tirosina. Estudos relataram que Src está envolvida no desenvolvimento de células imunológicas, proliferação, adesão, migração,

quimiotaxia, fagocitose e sobrevivência, além de promover mudanças na morfologia celular, progressão do ciclo celular e transcrição genética (Ortiz *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

**Figura 6.** Vias de sinalização intracelulares.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

## 2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Como mostrado anteriormente, nosso grupo vem evidenciando o papel modulador dos esteroides cardiotônicos na resposta imunológica, pela descrição e caracterização de seu efeito anti-inflamatório em diferentes modelos. Esses esteroides modulam negativamente a migração de leucócitos para o sítio da inflamação, citocinas pró-inflamatórias, vias de sinalização celular envolvidas nesses processos, além de apresentar efeitos bactericidas e antivirais (Carvalho *et al.*, 2022 e 2025; Cavalcante-Silva *et al.*, 2020 e 2021; De Vasconcelos *et al.*, 2011; Galvão *et al.*, 2017 e 2022; Leite *et al.*, 2015 e 2022; Magalhães, 2025).

Como citado anteriormente, os estudos prévios com o BD-8 mostraram sua atividade imunomoduladora *in vitro*, a partir da redução da atividade fagocítica, níveis de NO e IL-1 $\beta$ , e aumento da IL-10, além da diminuição da expressão de iNOS e a fosforilação de NF- $\kappa$ B p65, ERK e p38 (Ferreira *et al.*, 2024), demonstrando ser uma substância com grande potencial anti-

inflamatório. No entanto, algumas vias de sinalização em modelo *in vitro*, ainda não foram investigadas, assim como estudos *in vivo*. Portanto, esse trabalho pretende aprofundar os estudos do efeito do BD-8 em macrófagos peritoneais *in vitro* e em modelos *in vivo* de edema de pata e lesão pulmonar aguda, visando contribuir com novas substâncias com potencial terapêutico, além de gerar mais entendimento sobre esse esteroide e a sua capacidade em atuar em processos biológicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito imunomodulador do BD-8 em macrófagos peritoneais *in vitro* e em processos inflamatórios agudos *in vivo*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Esse estudo teve como objetivo específico *in vitro* analisar o efeito do BD-8:

- Nas proteínas Akt, mTOR e Src em cultura de macrófagos peritoneais murino.

3.2.2 Esse estudo teve como objetivos específicos *in vivo* analisar o efeito do BD-8:

- No edema de pata induzido por carragenina;
- Na migração de leucócitos encontrados no lavado broncoalveolar em modelo de lesão pulmonar aguda;
- No percentual de leucócitos do sangue em modelo de lesão pulmonar aguda;
- No tecido pulmonar em modelo de lesão pulmonar aguda;
- Na produção de proteínas totais em modelo de lesão pulmonar aguda;
- Nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  em modelo de lesão pulmonar aguda.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Animais**

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* albino fêmeas fornecidos pelo Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram mantidos com livre acesso a água e dieta controlada à base de ração em uma sala com temperatura de  $21\pm1^{\circ}\text{C}$  e ciclos claro/escuro de 12 horas, manuseados conforme os protocolos (nº 9923131223 e 5274120522) aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFPB (ANEXO I e II).

#### **4.2 Obtenção do esteroide cardiotônico $\gamma$ -benzilideno digoxina 8 (BD-8)**

A molécula a ser avaliada neste trabalho (BD-8) foi sintetizada a partir de modificações químicas da digoxina pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Nanoestrutura da Universidade Federal de São João del-Rei, coordenado pelo Prof. Dr. José Augusto Ferreira Perez Villar digoxina (Pessôa *et al.*, 2018).

#### **4.3 Experimento *in vitro***

##### **4.3.1 Preparação do BD-8 para o teste *in vitro***

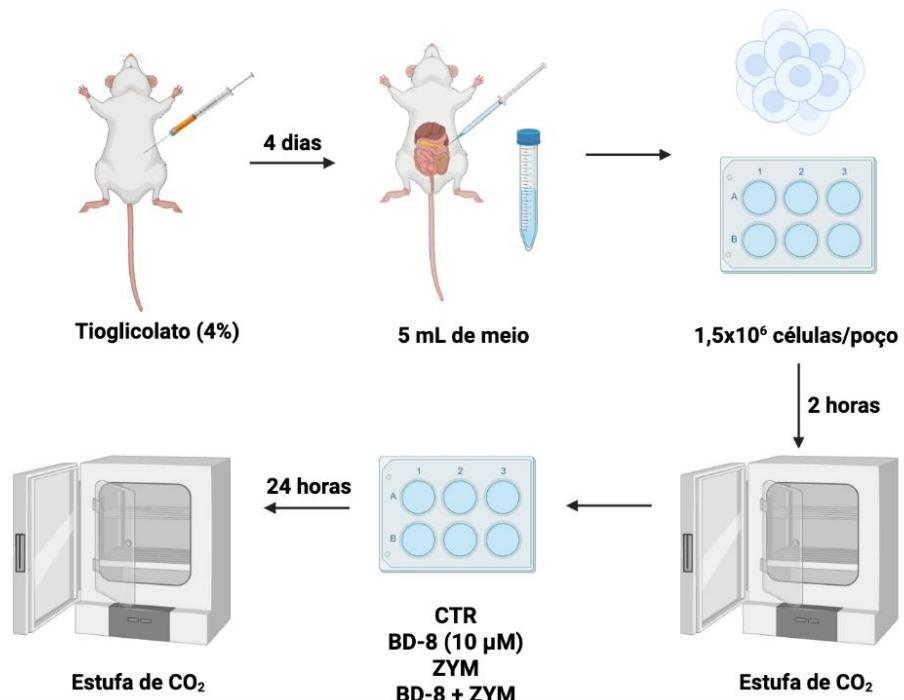
A amostra de BD-8 foi solubilizada em DMSO na concentração de 5 mg/mL e foram realizadas diluições sucessivas com meio de cultura RPMI-1640 Medium (1X) (Gibco) para obtenção da concentração de BD-8 testada (10  $\mu\text{M}$ ), essa concentração foi escolhida por ter demonstrado maior redução de NO e IL-1 $\beta$  em trabalhos anteriores (Ferreira *et al.*, 2024).

##### **4.3.2 Cultura de macrófagos peritoneais**

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%. No quarto dia após esse procedimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi realizado o lavado peritoneal, que consiste em uma injeção de 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 Medium (1X) (Gibco) gelado na cavidade peritoneal e, em seguida, aspiração com seringa. A suspensão de células obtida a partir da lavagem peritoneal foi centrifugada a 350 rcf, durante 5 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  e, em uma alíquota, foi realizada a contagem celular pelo teste de exclusão com o corante azul de tripan sob câmara de Neubauer.

Após isso, as células peritoneais foram semeadas em placas de 6 poços a uma concentração de  $1,5 \times 10^6$ . Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas com meio de cultura RPMI-1640 Medium (1X) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa de CO<sub>2</sub> (atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C), após esse período, foi realizada a lavagem do poço para remoção das células não aderentes, e após isso, as células foram estimuladas com zimosan (ZIM) na concentração de 0,2 mg/mL e/ou tratadas com o esteroide cardiotônico BD-8 (10 µM) no mesmo tempo (Ferreira *et al.*, 2024). Posteriormente, as células foram incubadas novamente em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas para em seguida serem submetidas ao protocolo abaixo.

**Figura 7.** Esquema representativo do protocolo experimental de cultura de macrófagos peritoneais.



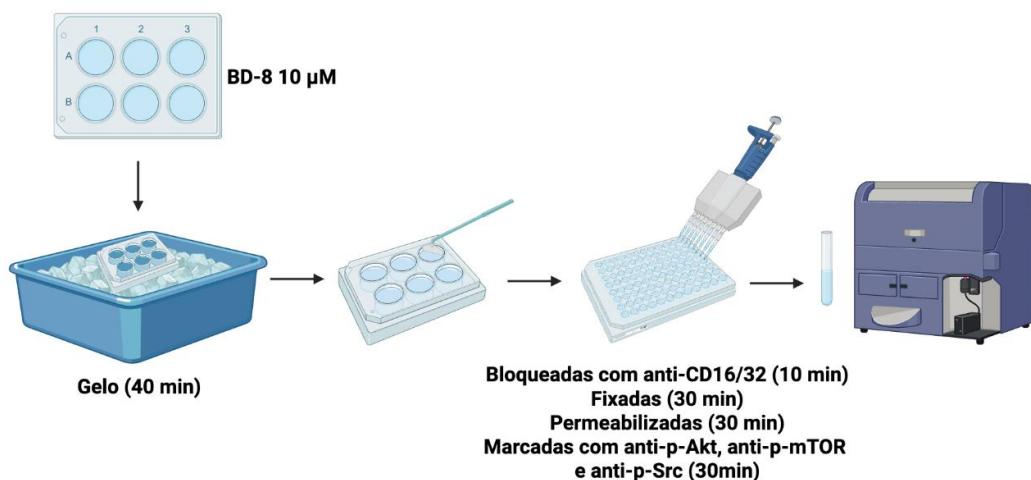
Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

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

Para a análise das moléculas intracelulares, o sobrenadante das placas de 6 poços foi removido, seguido da adição de 1,5 mL de PBS gelado. As placas foram então mantidas no gelo por 40 minutos. Em seguida, as células foram cuidadosamente desprendidas da placa com o auxílio de um espalhador de células (*scraper*) e transferidas para microtubos tipo eppendorf. Os tubos foram centrifugados a 210 rcf, por 5 minutos, a 4 °C. Após isso, foi retirado 1 mL do

sobrenadante, homogeneizado o *pellet* e transferido para uma placa de fundo U. A placa foi então centrifugada, e o sobrenadante foi descartado para o bloqueio com o anticorpo anti-CD16/CD32 por 10 minutos no gelo. Posteriormente, as células foram fixadas com tampão de fixação (Fixation Buffer - BD Biosciences) e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 30 minutos (atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C), permeabilizadas com tampão de permeabilização por 30 minutos no gelo (Perm Buffer III - BD Biosciences) e marcadas separadamente, mediante as instruções de cada fabricante, com o anticorpo anti-p-Akt, anti-p-mTOR e anti-p-Src por 30 minutos no gelo. Após a marcação, as células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de citometria contendo solução salina tamponada (Staining Buffer - BD Biosciences) para posterior leitura em citômetro de fluxo (BD FACSCANTO II).

**Figura 8.** Esquema representativo do protocolo experimental de citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

#### 4.4 Experimentos *in vivo*

##### 4.4.1 Preparação do BD-8 para os testes *in vivo*

Para a realização dos testes *in vivo*, uma solução estoque de BD-8 foi preparada na concentração de 5 mg/mL e diluída em salina nas diferentes doses utilizadas, conforme previamente estabelecido para a ouabaína na dose de 0,56 mg/kg. Por ser o primeiro teste *in vivo* com o BD-8, foram testadas três doses, sendo elas o dobro (1,12 mg/kg), a mesma (0,56 mg/kg) e a metade (0,28 mg/kg) da dose utilizada *in vivo* com ouabaína (De Vasconcelos *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2024; Galvão *et al.*, 2022).

#### 4.4.2 Modelo de edema de pata

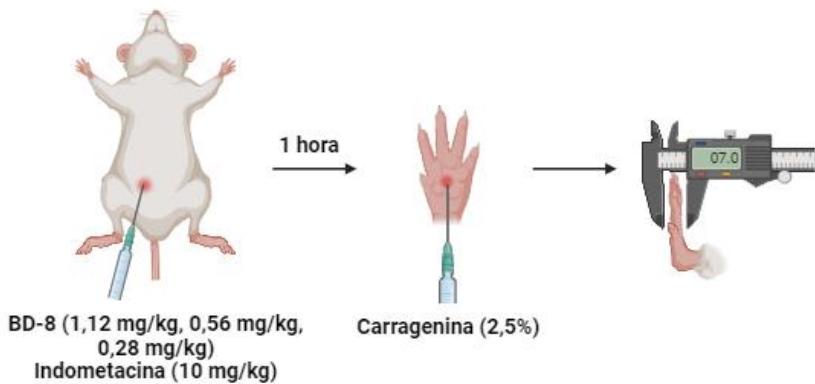
Os camundongos foram tratados com injeções intraperitoneais (i.p.) de BD-8 e indometacina (droga padrão) 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina (2,5%) solubilizada em 20 µL de PBS na pata traseira direita e 20 µL de PBS na pata traseira esquerda. A espessura da pata foi quantificada antes (0 hora) e em intervalos de 1, 2, 3, 4 e 6 horas utilizando um paquímetro digital. A medição foi feita pela diferença entre a pata traseira direita e a pata traseira esquerda (De Vasconcelos *et al.*, 2011).

Como mostrado na tabela 1, os animais foram divididos em nove grupos experimentais: Controle (CTR); BD-8 1,12 mg/kg; BD-8 0,56 mg/kg; BD-8 0,28 mg/kg; Carragenina 2,5%; BD-8 1,12 mg/kg + Carragenina; BD-8 0,56 mg/kg + Carragenina; BD-8 0,28 mg/kg + Carragenina e Indometacina 10 mg/kg + Carragenina.

**Tabela 1.** Grupos experimentais utilizados no modelo *in vivo* de edema de pata.

Grupos	Tratamento (i.p.) 500 $\mu$ L	Injeção intraplantar 20 $\mu$ L
CTR	-	PBS
Carragenina 2,5%	-	Carragenina 2,5%
BD-8 1,12 mg/kg	BD-8 1,12 mg/kg	PBS
BD-8 0,56 mg/kg	BD-8 0,56 mg/kg	PBS
BD-8 0,28 mg/kg	BD-8 0,28 mg/kg	PBS
BD-8 1,12 mg/kg + Carragenina	BD-8 1,12 mg/kg	Carragenina 2,5%
BD-8 0,56 mg/kg + Carragenina	BD-8 0,56 mg/kg	Carragenina 2,5%
BD-8 0,28 mg/kg + Carragenina	BD-8 0,28 mg/kg	Carragenina 2,5%
Indometacina 10 mg/kg + Carragenina	Indometacina 10 mg/kg	Carragenina 2,5%

**Figura 9.** Esquema representativo do protocolo experimental de edema de pata induzida por Carragenina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

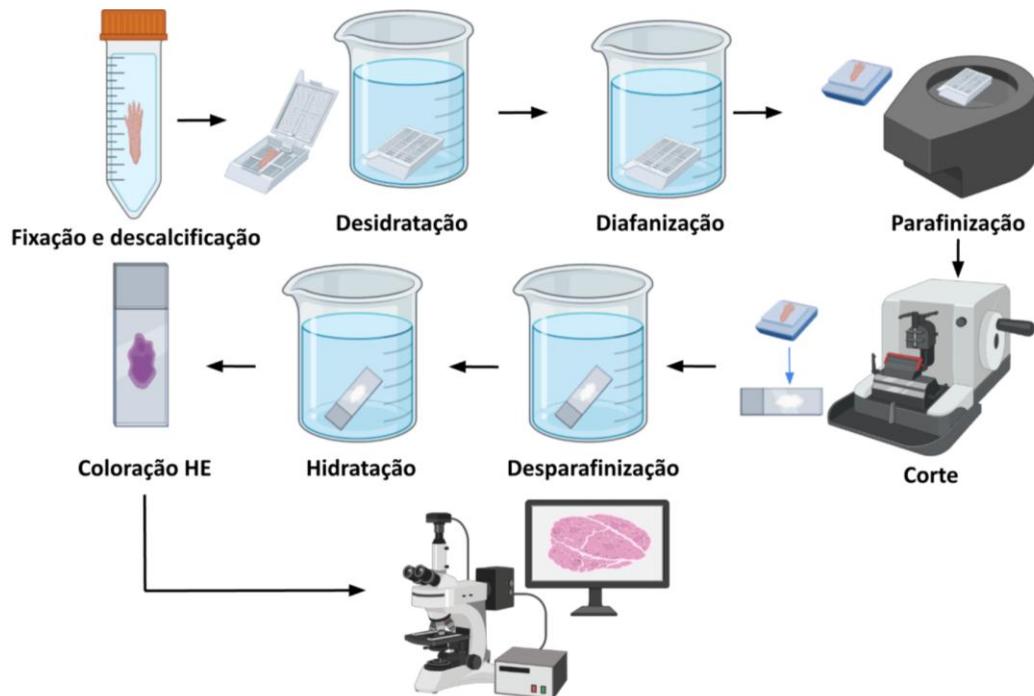
#### 4.4.3 Análise histológica da pata

Após 6 horas de edema induzido por carragenina, os animais foram eutanasiados, e as amostras das patas foram coletadas para análise histológica. Inicialmente, as patas foram embebidas em uma solução fixadora de formalina tamponada por 24 horas. Após isso, as patas foram mantidas por 1 mês em uma solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para descalcificação do material. Em seguida, as amostras foram identificadas individualmente em cassete e lavadas em água corrente por 24 horas para retirada do excesso de fixador.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em álcool etílico nas concentrações de 70, 80, 90 e 100%, por 30 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à diafanização com xilol I (xileno) e xilol II (xileno) por 30 minutos cada. Em seguida, os cassete foram imersos em parafina líquida I e II por 1 hora cada para infiltração das amostras. Após isso, os tecidos foram incluídos em moldes com parafina.

Os blocos resultantes foram seccionados em cortes de 5 µm de espessura utilizando micrótomo (LEICA, SP Labor 300). Os cortes foram colocados em banho-maria (35 - 40°C), e após 1 minuto, montadas em lâminas de vidro para microscopia, em seguida, as amostras nas lâminas foram desparafinadas com xilol I e xilol II por 10 minutos cada, hidratadas com álcool etílico nas concentrações de 100, 90, 80 e 70% e água destilada por 5 minutos cada e, após a secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) (Barung *et al.*, 2021). As alterações histológicas foram avaliadas por observador cego quanto ao grupo experimental e foram analisados, em aumento de 400x, 20 campos aleatórios por animal.

**Figura 10.** Esquema representativo do protocolo experimental de histologia da pata.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

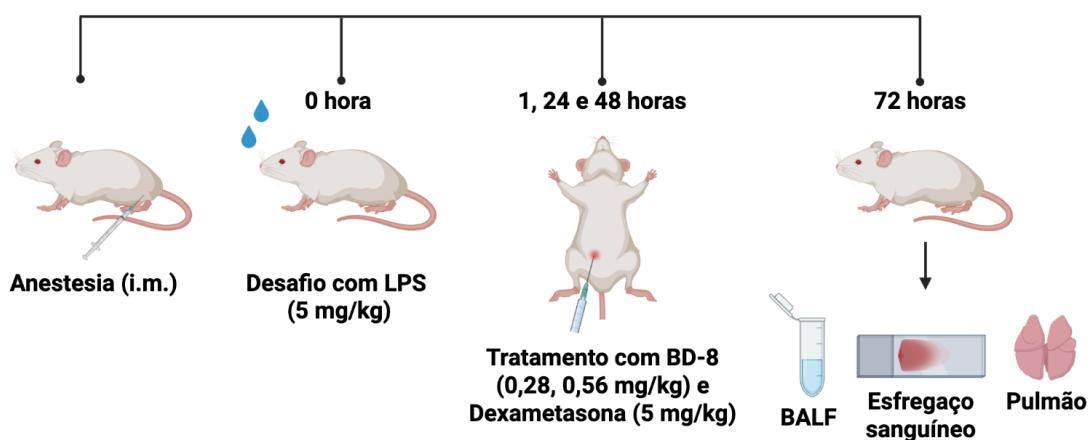
#### 4.4.4 Modelo de lesão pulmonar aguda (LPA)

Para a indução do modelo de LPA, os animais foram pesados e anestesiados com uma solução anestésica de xilasina + cetamina, via intramuscular (i.m.), e receberam por instilação nasal, 40  $\mu$ L de uma solução de LPS na dose de 5 mg/kg solubilizada em PBS (Xavier *et al.*, 2019).

Como mostrado na tabela 2, os animais foram divididos em sete grupos experimentais: Controle (CTR); BD-8 0,56 mg/kg; BD-8 0,28 mg/kg; LPS; BD-8 0,56 mg/kg + LPS; BD-8 0,28 mg/kg + LPS e Dexametasona (DEXA) 5 mg/kg + LPS. A dose de DEXA utilizada foi baseada em estudos anteriores onde foi utilizada essa substância como droga-padrão da LPA (Gadelha *et al.*, 2024). Os grupos BD-8 e DEXA foram tratados nos tempos de 1 hora, 24 e 48 horas após o desafio com LPS através de injeções (i.p.) contendo 500  $\mu$ L das substâncias.

**Tabela 2.** Grupos experimentais utilizados no modelo *in vivo* de LPA.

Grupos	Desafio (i.n.) 40 $\mu$ L	Tratamento (i.p.) 500 $\mu$ L
CTR	Salina	-
LPS	LPS 5 mg/kg	-
BD-8 0,56 mg/kg	Salina	BD-8 0,56 mg/kg
BD-8 0,28 mg/kg	Salina	BD-8 0,28 mg/kg
LPS + BD-8 0,56 mg/kg	LPS 5 mg/kg	BD-8 0,56 mg/kg
LPS + BD-8 0,28 mg/kg	LPS 5 mg/kg	BD-8 0,28 mg/kg
LPS + DEXA 5 mg/kg	LPS 5 mg/kg	Dexametasona 5 mg/kg

**Figura 11.** Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

#### 4.4.5 Coleta do lavado broncoalveolar (BALF)

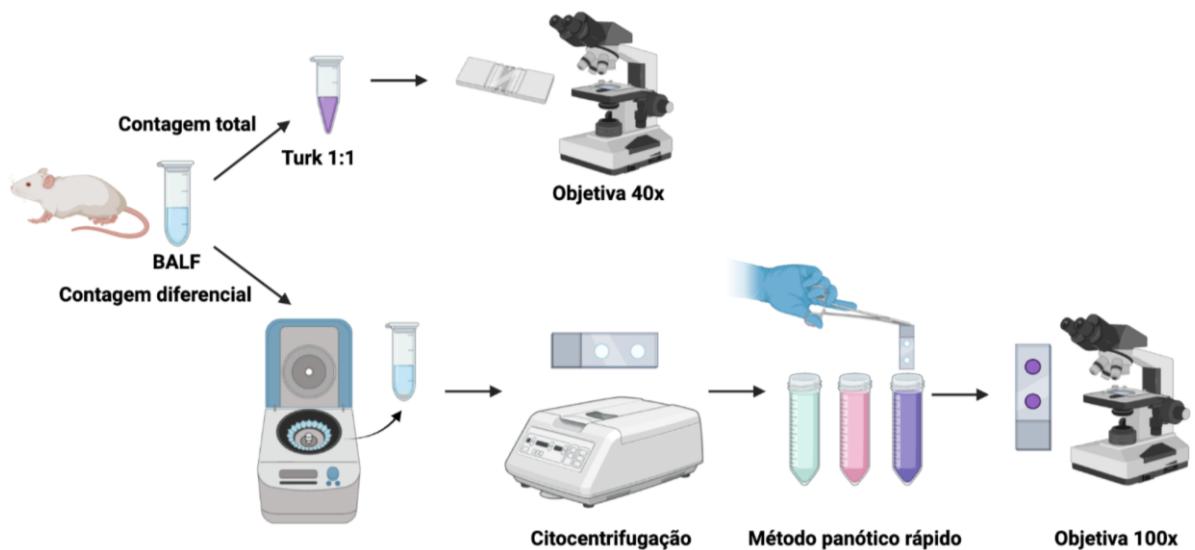
O BALF dos animais foi coletado 72 horas após o desafio com LPS. Após a eutanásia, a traqueia dos animais foi exposta e realizada a administração de 1,5 mL de PBS gelado utilizando um cateter (Jelco 20G) acoplado a uma seringa. Após 1 minuto, o líquido foi aspirado com a mesma seringa e transferido para tubos tipo eppendorfs. As amostras foram armazenadas em gelo para preservar a viabilidade celular.

O exsudato coletado foi centrifugado a 210 rcf por 5 minutos a 4 °C. Após isso, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C. As células presentes nos *pellets* foram diluídas em azul de Turk (0,01% de cristal violeta em 3% de ácido acético) na proporção de 1:1 e contadas com auxílio da câmara de Neubauer para a determinação dos leucócitos totais. A leitura foi feita no microscópio óptico em objetiva de 40X.

#### 4.4.6 Contagem diferencial de células do BALF

Para contagem diferencial das células, 250 µL da suspensão de células do BALF foram centrifugadas na citocentrífuga do tipo *citospin* a 1500 rpm por 10 minutos. As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico rápido. A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica, utilizando a objetiva de imersão (100X), e cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células. As células mononucleares e polimorfonucleares foram identificadas segundo a coloração e características morfológicas.

**Figura 12.** Esquema representativo do protocolo experimental de contagem total e diferencial.

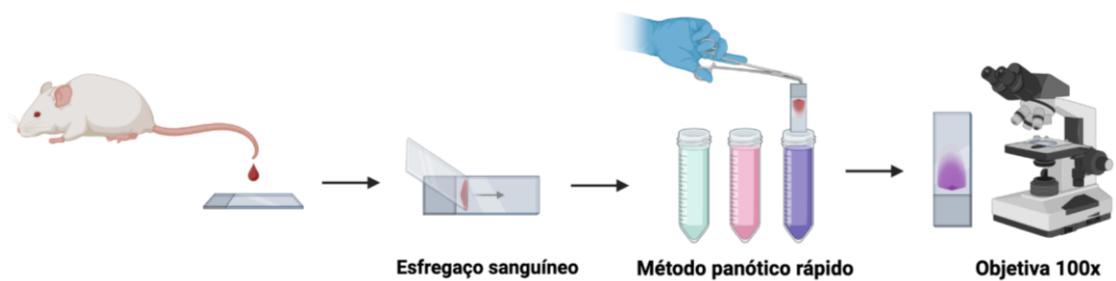


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

#### 4.4.7 Contagem de esfregaço sanguíneo

O sangue dos animais foi coletado pela cauda para a confecção do esfregaço sanguíneo. As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico rápido. A contagem de monócitos, linfócitos e neutrófilos foi realizada por microscopia óptica, utilizando a objetiva de imersão (100X), e cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células.

**Figura 13.** Esquema representativo do protocolo experimental de esfregaço sanguíneo.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

#### 4.4.8 Análise histológica do tecido pulmonar

Após 72 horas da indução da lesão pulmonar aguda por LPS, os animais foram eutanasiados, e os pulmões foram coletados para análise histológica. Inicialmente, os pulmões foram embebidos em uma solução fixadora de formalina tamponada por 24 horas. Após isso, as amostras foram identificadas individualmente em cassetes e lavadas em água corrente por 24 horas para retirada do excesso de fixador.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em álcool etílico nas concentrações de 70, 80, 90 e 100%, por 30 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à diafanização com xitol I (xileno) e xitol II (xileno) por 30 minutos cada. Em seguida, os cassetes foram imersos em parafina líquida I e II por 1 hora cada para infiltração das amostras. Após isso, os tecidos foram incluídos em moldes com parafina.

Os blocos resultantes foram seccionados em cortes de 5 µm de espessura utilizando micrótomo (LEICA, SP Labor 300). Os cortes foram colocados em banho-maria (35 - 40°C), e após 1 minuto, montadas em lâminas de vidro para microscopia, em seguida, as amostras nas lâminas foram desparafinizadas com xitol I e xitol II por 10 minutos cada, hidratadas com álcool etílico nas concentrações de 100, 90, 80 e 70% e água destilada por 5 minutos cada e, após a secagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) (Barung *et al.*, 2021).

As alterações histológicas foram avaliadas por observador cego quanto ao grupo experimental, utilizando-se os critérios recomendados pela American Thoracic Society (ATS, 2011). Foram analisados, em aumento de 400x, 20 campos aleatórios por animal, considerando-se os seguintes parâmetros: (i) neutrófilos no espaço alveolar, (ii) neutrófilos no septo alveolar, (iii) membranas hialinas, (iv) detritos celulares/material proteico intra-alveolar e (v) espessamento septal. O *score* final foi calculado por meio da fórmula ponderada proposta pela ATS.

$$\text{Score LPA} = \underline{(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)}$$

número de campos analisados

Onde:

A = neutrófilos no espaço alveolar

B = neutrófilos no septo alveolar

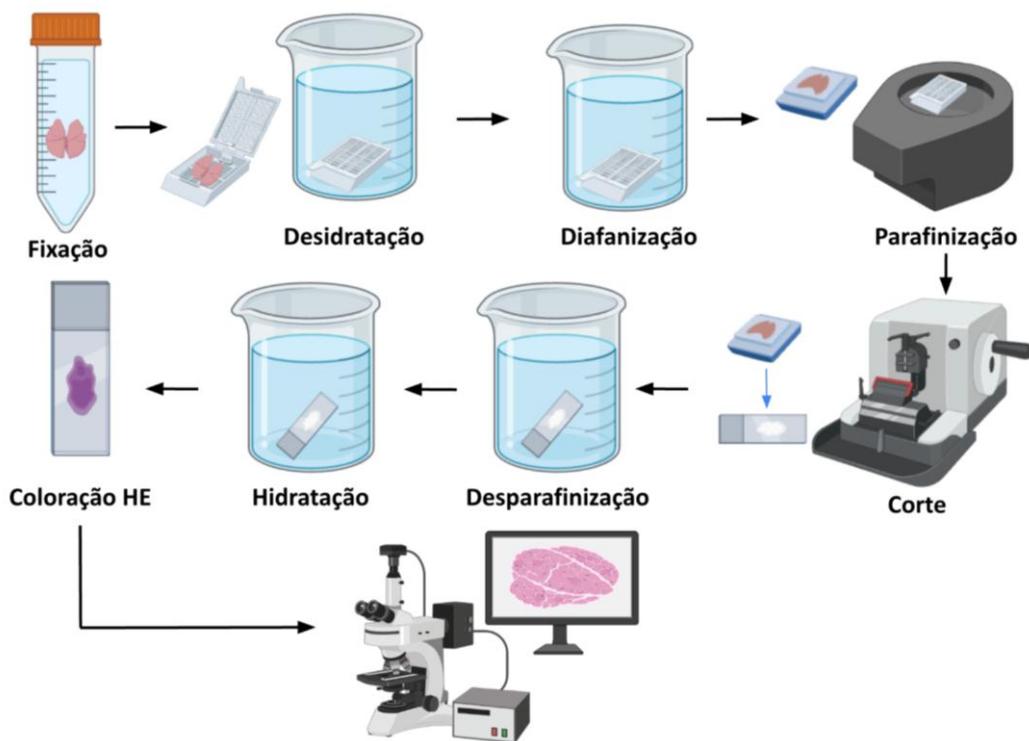
C = membranas hialinas

D = detritos celulares / material proteico intra-alveolar

E = espessamento do septo alveolar

Sistema de pontuação (*score*): cada parâmetro foi avaliado em *score* ordinal (0 = ausente, 1 = discreto, 2 = moderado, 3 = intenso), em campos escolhidos de forma sistemática.

**Figura 14.** Esquema representativo do protocolo experimental de histologia do tecido pulmonar.

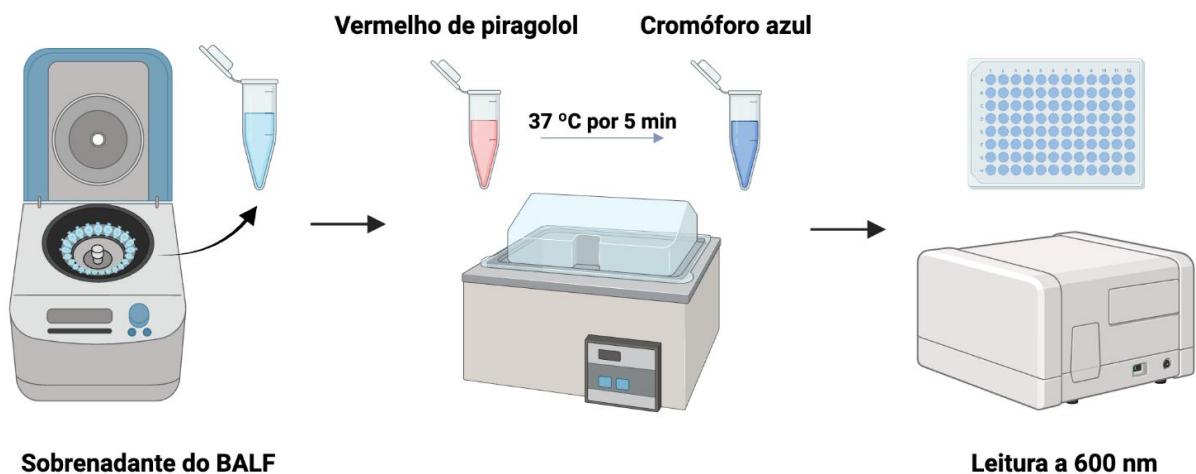


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

#### 4.4.9 Dosagem de proteínas totais do BALF

Para a determinação das proteínas totais, o BALF coletado foi centrifugado (210 rcf por 5 minutos a 4 °C) e a partir do sobrenadante obtido foi realizado o método colorimétrico do vermelho de pirogalol (Kit Sensiprot REF 36-50 - Labtest). O vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido, resulta em um cromóforo azul. A leitura foi realizada utilizando um leitor de placa a 600 nm.

**Figura 15.** Esquema representativo do protocolo experimental de dosagem de proteínas totais.

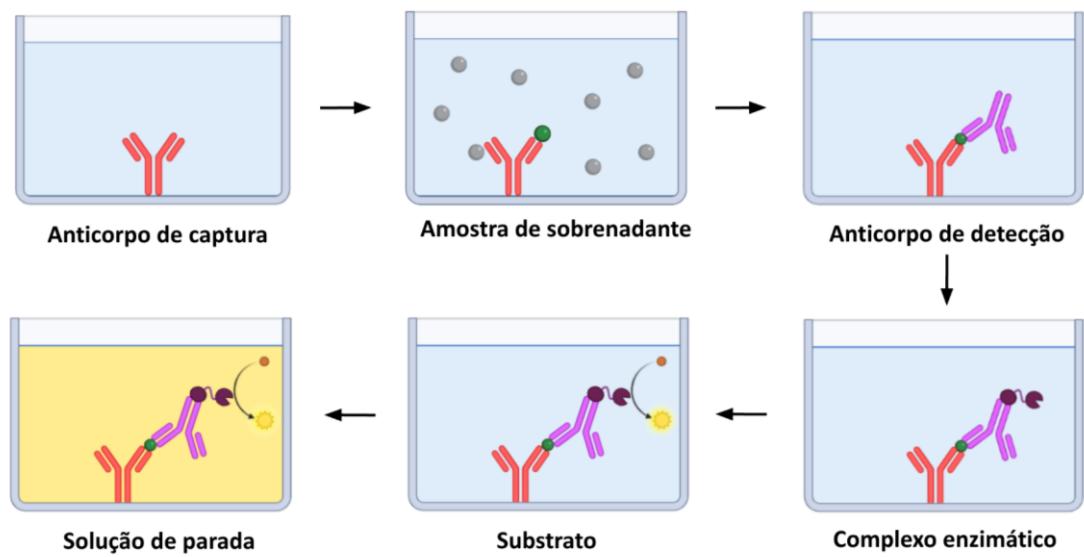


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

#### 4.4.10 Ensaio imunoenzimático para dosagem das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ do BALF

Para a dosagem das citocinas IL-6 (eBioscience) e TNF- $\alpha$  (Wuhan USCN Business Co.), o BALF coletado foi centrifugado (210 rcf por 5 minutos a 4 °C) e a partir do sobrenadante obtido foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, de acordo com as informações do fabricante. Inicialmente, as placas de ELISA foram sensibilizadas com os anticorpos de captura anti-IL-6 e anti-TNF- $\alpha$ , após esse período, os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio. Posteriormente, foram adicionadas as amostras de sobrenadantes a serem analisadas e, após isso, o anticorpo de detecção referente a cada citocina foi adicionado. Após isso, o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionado e posteriormente foi adicionada a solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB), após 15 minutos essa reação foi interrompida com a solução de parada e realizada a leitura em leitor de placa a 450 nm.

**Figura 16.** Esquema representativo do protocolo experimental de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

#### 4.5 Análises estatísticas

Todos os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m) e foi realizado 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  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, US) e para a análise dos dados obtidos no citômetro de fluxo foi utilizado o Software FlowJo versão 10.

### 5. RESULTADOS

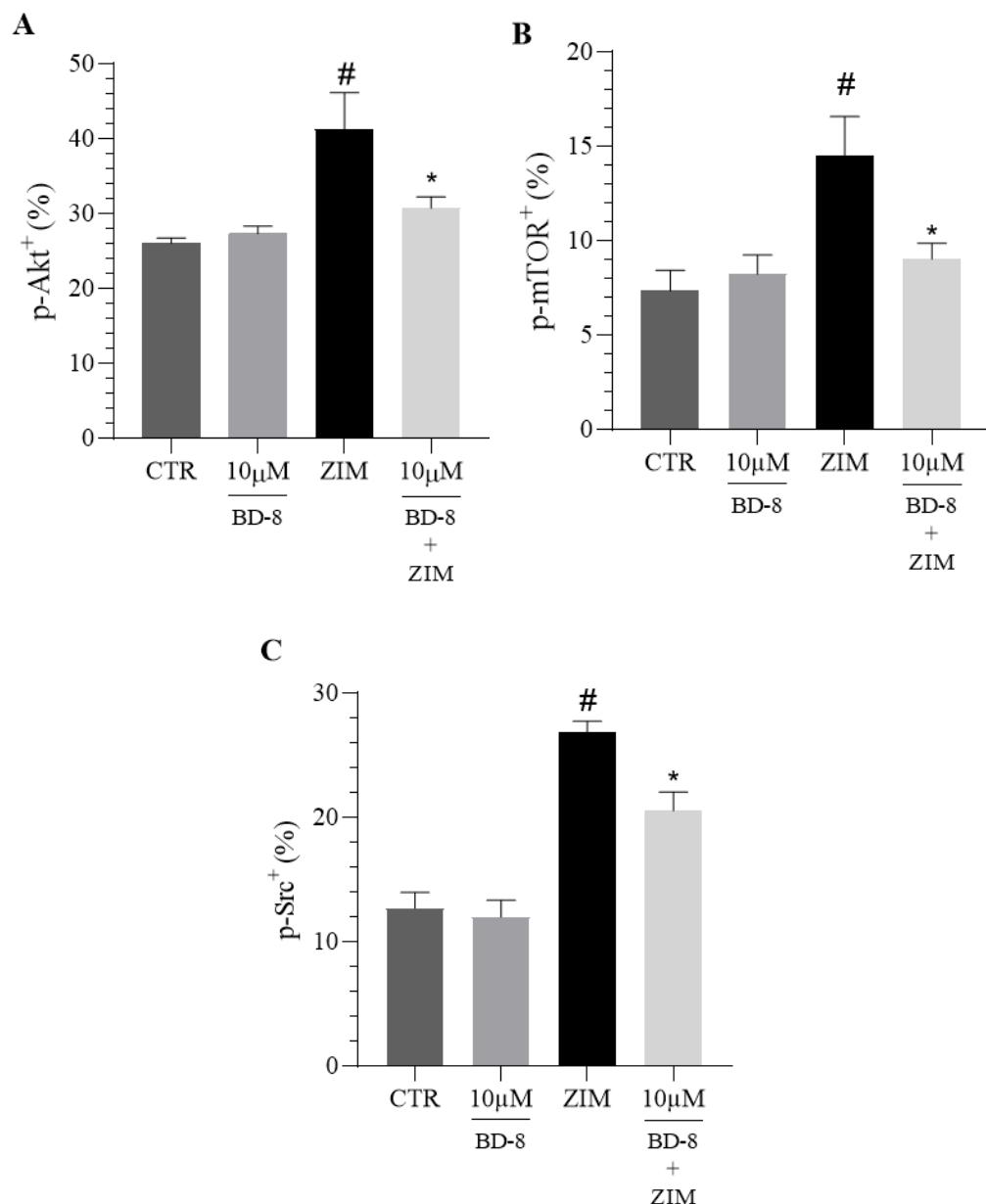
#### 5.1 Resultados *in vitro*

##### 5.1.1 Efeito do BD-8 nas vias Akt, mTOR e Src

Como mostrado na figura 17, nos gráficos A, B e C, o grupo zimosan (ZIM) induziu um aumento significativo na ativação das proteínas Akt, mTOR e Src. Este dado está representado pela maior porcentagem de células positivas para a fosforilação dessas proteínas após o estímulo, em comparação ao grupo controle (CTR). O tratamento isolado do BD-8 na

concentração de 10  $\mu$ M não apresentou modulação significativa em relação ao grupo CTR. Entretanto, nas células estimuladas com o ZIM e tratadas com o BD-8, na concentração de 10  $\mu$ M, foi observado redução na fosforilação das proteínas Akt (26%) (Figura 17A), mTOR (38%) (Figura 17B) e Src (24%) (Figura 17C) em comparação ao grupo apenas estimulado com ZIM.

**Figura 17.** Efeito do BD-8 nas proteínas Akt, mTOR e Src em macrófagos peritoneais.



Legenda: Macrófagos peritoneais estimulados com zimosan. A. p-Akt+. B. p-mTOR+. C. p-Src+. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  epm, com n=5 e 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 zimosan. CTR: Controle; BD-8:  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8; ZIM: Zimosan.

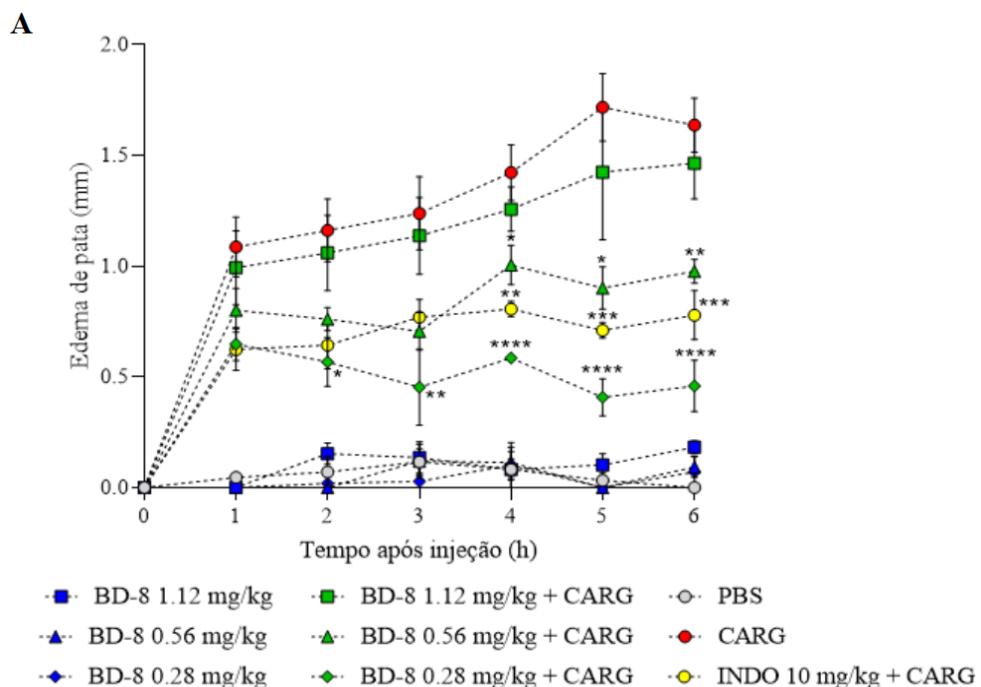
## 5.2 Resultados *in vivo*

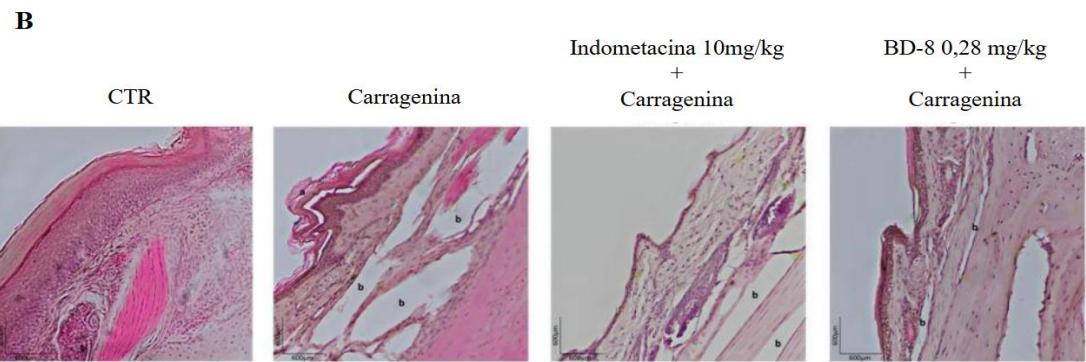
### 5.2.1 Efeito do BD-8 no edema de pata induzido por carragenina

Como mostrado na figura 18 (A, B), a carragenina promoveu aumento significativo do edema de pata em comparação com o grupo CTR. O tratamento com BD-8 nas doses de 0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg previneu o edema da pata, onde a dose de 0,56 mg/kg apresentou maior redução em 6 horas (40,5%). No entanto, o efeito mais significativo foi observado na dose mais baixa de BD-8 0,28 mg/kg em 5 horas, com uma redução da inflamação de 76,8%, sendo esse efeito maior do que a redução ocasionada pela droga-padrão indometacina (52,4%). Por outro lado, a dose de BD-8 a 1,12 mg/kg não inibiu o edema.

Na análise histológica (figura 18B), é possível observar que o grupo carragenina apresentou formação de edema (representado por b) em comparação ao grupo CTR. Por outro lado, os animais tratados com indometacina e BD-8 0,28 mg/kg apresentaram diminuição do edema em comparação ao grupo carragenina.

**Figura 18.** Efeito do BD-8 no edema de pata induzido por carragenina em camundongo.





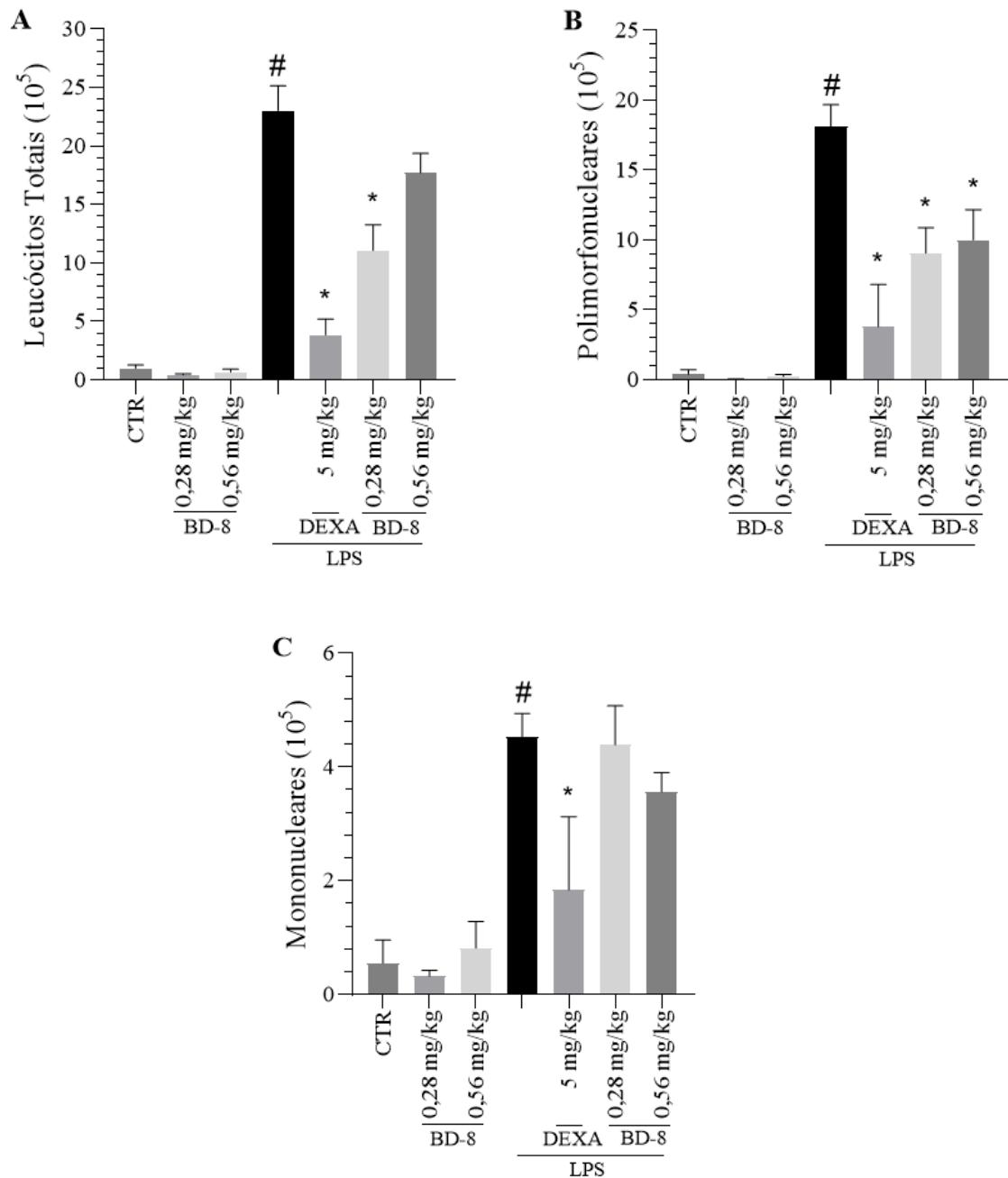
Legenda: Edema de pata induzido por carragenina. A. Curva dose-resposta. B. Imagens representativas da pata de camundongos para cada grupo de tratamento coradas por HE. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  epm, com  $n=5$  e analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. \*  $p<0,05$ , significativo em relação ao grupo carragenina. BD-8:  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8; CARG: Carragenina; INDO: Indometacina; b: Formação do edema.

### 5.2.2 Efeito do BD-8 na migração de células totais e diferenciais durante a LPA induzida por LPS

Como mostrado na figura 19A, a administração de LPS promoveu aumento significativo no número de leucócitos totais no BALF em comparação ao grupo CTR. O tratamento com o BD-8 sem estímulo do LPS nas doses de 0,28 e 0,56 mg/kg não provocou diferença significativa em relação ao grupo CTR. Por outro lado, nos animais com LPA tratados com BD-8 na menor dose de 0,28 mg/kg foi observado redução do número de leucócitos totais em 49%. Os animais tratados com a dexametasona apresentaram redução de 82% na migração celular.

Na contagem de células diferenciais, foi observado que o LPS promoveu a migração de células polimorfonucleares e mononucleares para a região bronco-alveolar. O tratamento com o BD-8 sem estímulo do LPS nas doses testadas manteve-se semelhante ao grupo CTR. Nos animais com LPA tratados com o BD-8 houve uma redução de 50% e 44,8% na migração de polimorfonucleares nas doses de 0,28 mg/kg e 0,56mg/kg, respectivamente. Os animais tratados com a dexametasona também apresentaram redução (79%) na migração desse tipo celular (figura 19B). Entretanto, os tratamentos com o BD-8 não modularam a migração de células mononucleares (figura 19C).

**Figura 19.** Efeito do BD-8 na migração de células totais e diferenciais durante a LPA induzida por LPS em camundongo.

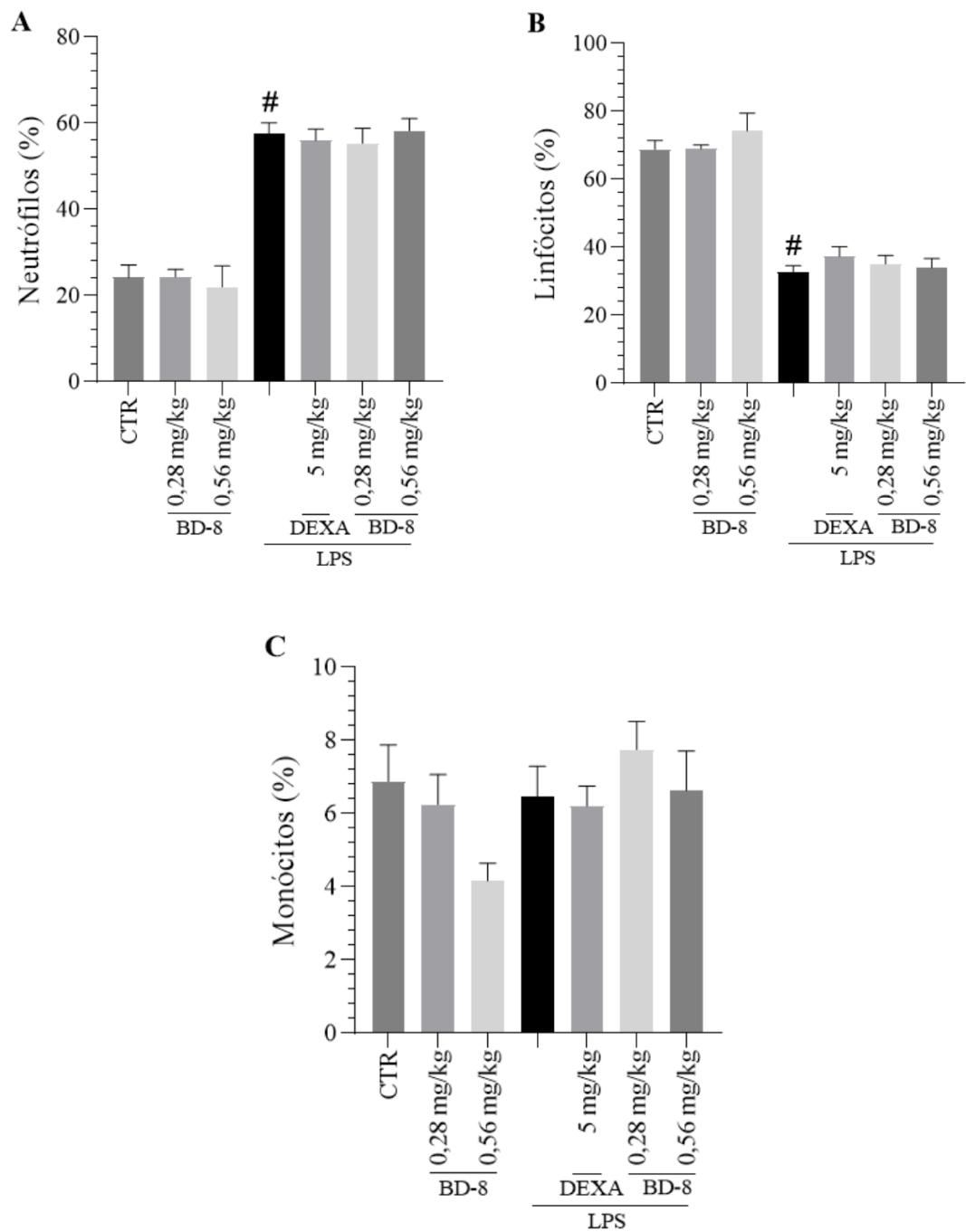


Legenda: Número de leucócitos no lavado broncoalveolar de camundongos com LPA. A. Número de leucócitos totais. B. Número de leucócitos polimorfonucleares. C. Número de leucócitos mononucleares. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  epm, foram realizados quatro experimentos independentes e 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 LPS. CTR: Controle; BD-8:  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8; DEXA: Dexametasona.

### 5.2.3 Efeito do BD-8 nos leucócitos na circulação sanguínea durante a LPA induzida por LPS

O grupo LPA apresentou, no sangue, aumento significativo do percentual de neutrófilos (figura 20A) com diminuição de linfócitos (figura 20B) quando comparados ao grupo CTR. Entretanto, nos animais com LPA tratados com o BD-8 e dexametasona não houve alteração do percentual desses leucócitos circulantes em comparação ao grupo LPA. Com relação aos monócitos, não houve alteração significativa em nenhum dos grupos.

**Figura 20.** Efeito do BD-8 nos leucócitos na circulação sanguínea durante a LPA induzida por LPS em camundongo.



Legenda: Número de leucócitos na circulação sanguínea de camundongos com LPA. A. Porcentagem de neutrófilos. B. Porcentagem de linfócitos. C. Porcentagem de monócitos. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  epm, foram realizados quatro experimentos independentes e analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. #  $p < 0,05$ , significativo em relação ao grupo controle. CTR: Controle; BD-8:  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8; DEXA: Dexametasona.

### 5.2.4 Efeito do BD-8 no tecido pulmonar durante a LPA induzida por LPS

A análise do efeito do BD-8 no tecido pulmonar foi realizada na dose de 0,28 mg/kg por ter sido a dose que reduziu a migração de células totais no BALF e que apresentou melhor redução do número de células polimorfonucleares.

Como é possível observar na figura 21, nos animais do grupo CTR, o parênquima pulmonar apresentou arquitetura preservada, com alvéolos bem aerados, septos delgados e mínima presença de células inflamatórias no interstício, com *score* histológico médio de  $0,14 \pm 0,3$  confirmando a integridade do parênquima pulmonar e a ausência de lesão aguda.

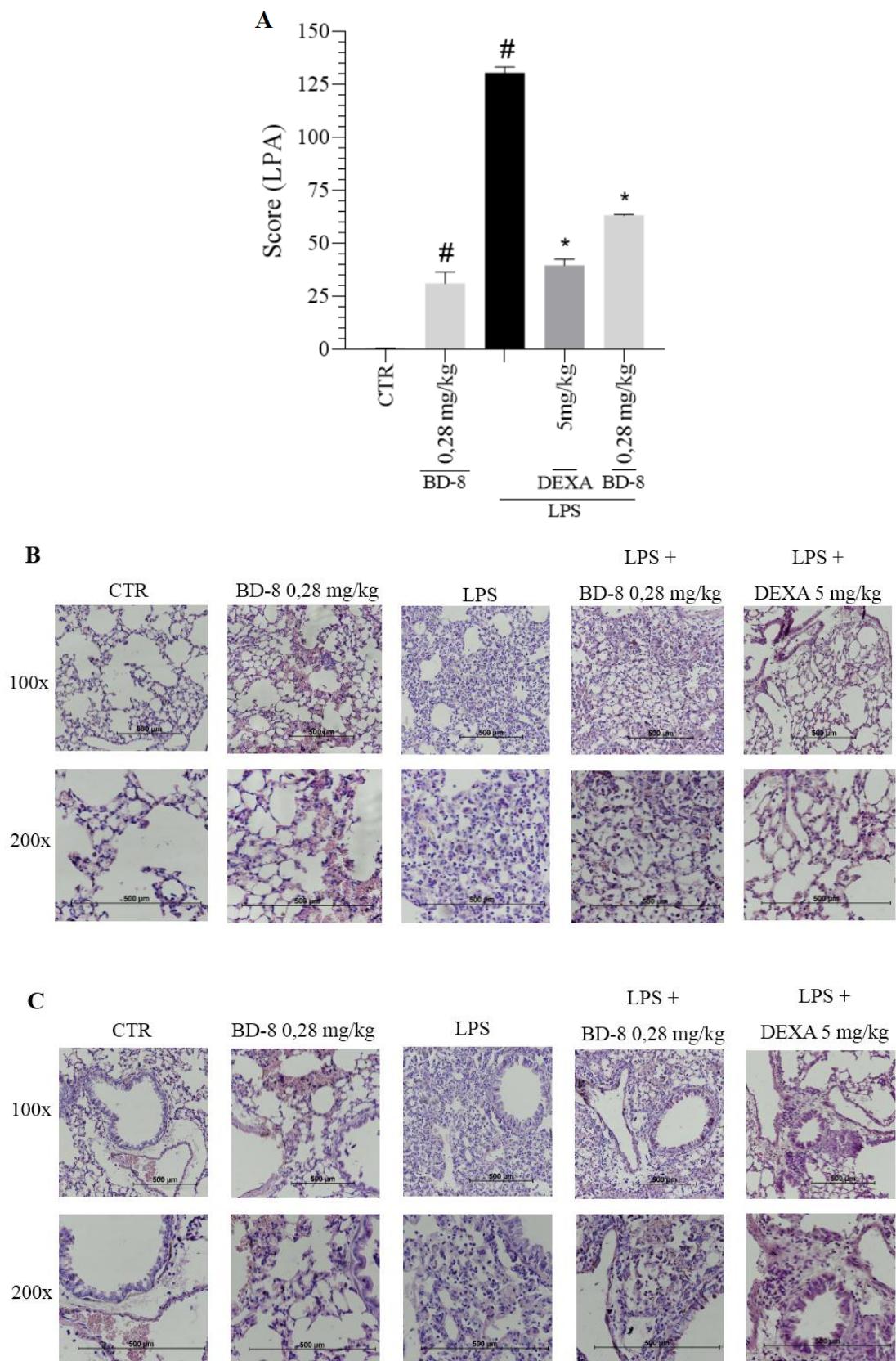
Os animais tratados apenas com BD-8 não apresentaram alterações histopatológicas compatíveis com LPA, foi observado parênquima pulmonar com arquitetura preservada, septos alveolares delgados, escassa infiltração inflamatória e ausência de deposição significativa de material proteico intra-alveolar, com *score* médio de  $33,8 \pm 14,8$  (figura 21A, B).

Por outro lado, os animais do grupo LPS apresentaram espessamento difuso dos septos alveolares, congestão vascular e infiltração inflamatória predominantemente neutrofílico, tanto no interstício quanto no espaço alveolar. Além disso, verificou-se a presença de edema interalveolar, áreas focais de hemorragia e formação de membranas hialinas recobrindo a superfície dos alvéolos, resultando em um *score* médio de  $130,4 \pm 7,7$  (figura 21A, B).

Nos animais com LPA tratados com BD-8, foi possível observar espessamento septal moderado, presença de infiltração neutrofílico difuso e acúmulo de material proteico intra-alveolar. Membranas hialinas estavam presentes, mas de forma menos extensa em relação ao grupo LPA, resultando em um *score* médio de  $63,2 \pm 1,1$  (figura 21A, B).

Os animais com LPA tratados com dexametasona apresentaram atenuação da LPA em relação ao grupo LPS, caracterizada por infiltração neutrofílico moderado, espessamento septal discreto e exsudato proteico intra-alveolar limitado. Membranas hialinas foram pouco frequentes e de distribuição focal, enquanto a hemorragia mostrou-se mínima, com *score* médio de  $39,6 \pm 7,7$  (figura 21A, B).

**Figura 21.** Efeito do BD-8 no tecido pulmonar durante a LPA induzida por LPS em camundongo.

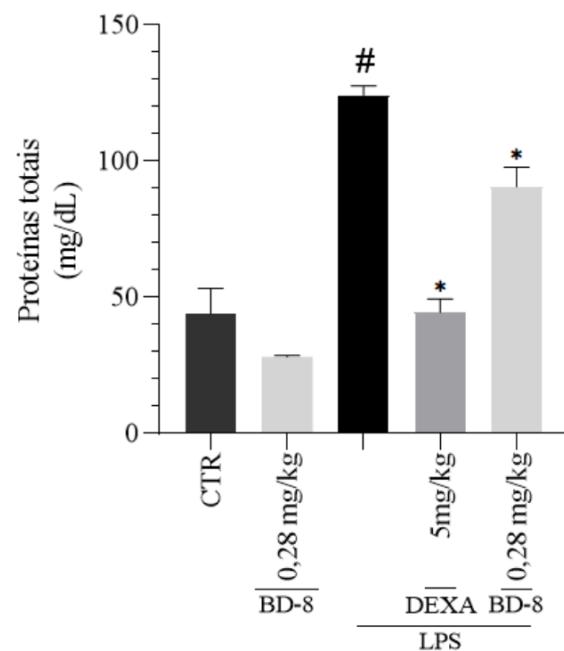


Legenda: Efeito do BD-8 no tecido pulmonar durante a LPA. A. Score de LPA. B. Imagens representativas do tecido pulmonar da região alveolar coradas por HE. C. Imagens representativas do tecido pulmonar da região peribronquiolar e perivasculares coradas por HE. n=3. CTR: Controle; BD-8:  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8; DEXA: Dexametasona. BR = bronquiolo, VS = vaso sanguíneo, AL = alvéolos pulmonares.

### 5.2.5 Efeito do BD-8 nos níveis de proteínas totais durante a LPA induzida por LPS

Os animais com LPA apresentaram aumento significativo de proteínas no BALF quando comparados ao grupo CTR. O tratamento com o BD-8 sem estímulo do LPS não promoveu alteração dos níveis de proteínas em relação ao grupo CTR. Por outro lado, os tratamentos com o BD-8 e dexametasona nos animais com LPA diminuíram 27% e 64%, respectivamente, os níveis de proteínas totais no BALF em relação aos animais com LPA (figura 22).

**Figura 22.** Efeito do BD-8 nos níveis de proteínas totais durante a LPA induzida por LPS em camundongo.

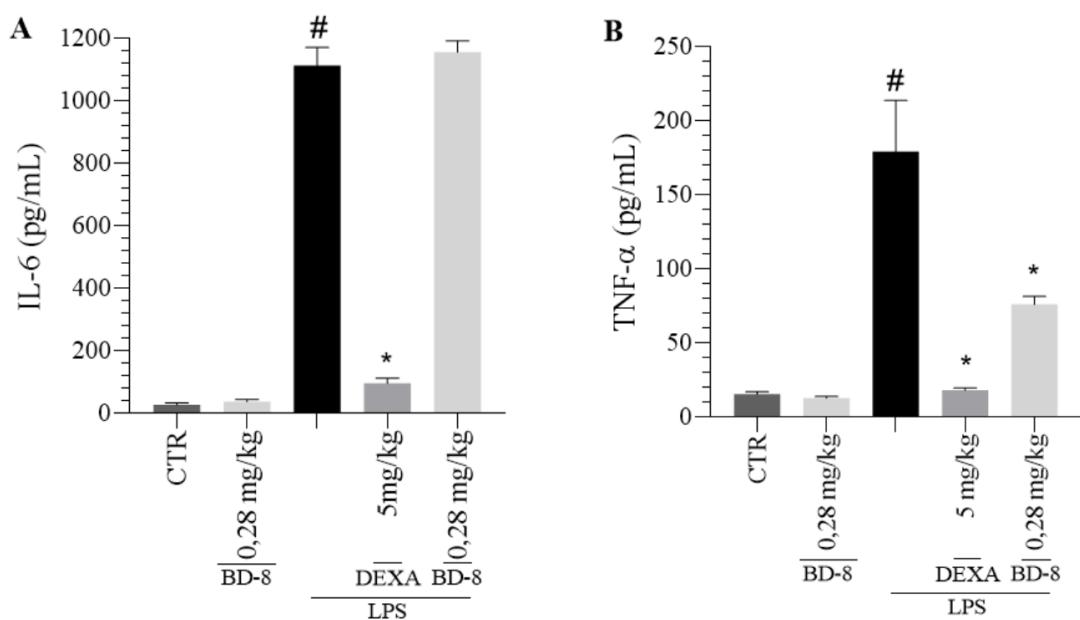


Legenda: Quantificação de proteínas totais do BALF. Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  epm, com n=4 e analisados por meio de análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida de pós-teste de Tukey. # p<0,05, significativo em relação ao grupo controle; \* p<0,05, significativo em relação ao grupo LPS. CTR: Controle; BD-8:  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8; DEXA: Dexametasona.

### 5.2.6 Efeito do BD-8 nos níveis de citocinas pró-inflamatórias durante a LPA induzida por LPS

Os animais com LPA apresentaram aumento dos níveis das citocinas IL-6 (97,8%) e TNF- $\alpha$  (91,3%) em relação ao grupo CTR. O tratamento com o BD-8 sem estímulo do LPS não promoveu alteração dos níveis das citocinas em relação ao grupo CTR. O tratamento com BD-8 não alterou os níveis de IL-6 (figura 23A), por outro lado, reduziu TNF- $\alpha$  em 57,6% (figura 23B). Os animais com LPA tratados com dexametasona reduziram IL-6 e TNF- $\alpha$  em 91,4% e 90,5%, respectivamente.

**Figura 23.** Efeito do BD-8 nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  durante a LPA induzida por LPS em camundongo.



Legenda: Quantificação de citocinas pró-inflamatórias do BALF. A. IL-6. B. TNF- $\alpha$ . Os dados numéricos são apresentados como média  $\pm$  epm, com n=4 e 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 LPS. CTR: Controle; BD-8:  $\gamma$ -Benzilideno Digoxina 8; DEXA: Dexametasona.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho faz parte de um projeto amplo que possui o objetivo de elucidar os efeitos biológicos de novas BDs semi-sintetizadas por colaboradores, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos, com um melhor efeito biológico e menor toxicidade. Diversos trabalhos demonstraram o potencial dos ECTs como compostos imunomoduladores (Carvalho *et al.*, 2022 e 2025; Cavalcante-Silva *et al.*, 2020 e 2021; De Vasconcelos *et al.*,

2011; Galvão *et al.*, 2017 e 2022; Leite *et al.*, 2015; Magalhães, 2025), assim como os efeitos anti-inflamatórios do BD-8 *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2024). No entanto, ainda não foram realizados estudos *in vivo* com esta molécula. Dessa forma, o presente trabalho avaliou pela primeira vez o papel desse esteroide em processos inflamatórios agudos *in vivo*.

Os macrófagos teciduais desempenham um importante papel na homeostase e no processo inflamatório. A inflamação pode alterar o subtipo dos macrófagos para os perfis M1 (inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório), sendo prevalente o perfil M1 em processos inflamatórios agudos, lesões teciduais e presença de microrganismos. Por outro lado, os macrófagos de perfil M2 estão mais presentes em processos de restauração da homeostase (Mamilos *et al.*, 2023). Os macrófagos são derivados de monócitos da circulação e demoram cerca de dois a quatro dias para maturar no peritônio, diante disso, foi utilizada a injeção intraperitoneal de tioglicolato como agente elicitador. Este estímulo tem a vantagem de recrutar células para o peritônio, sem aumentar a atividade microbicida dos macrófagos. Com isso, esse estímulo ocasiona o aumento do número de leucócitos na cavidade peritoneal, atingindo o maior número de macrófagos no quarto dia após a injeção (Leijh *et al.*, 1984).

O zimosan é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, esse composto é utilizado em modelo de inflamação por induzir as características da inflamação aguda (Cash; White; Greaves, 2009). As partículas de zimosan são reconhecidas através do estímulo de receptores de reconhecimento imunológico inato Toll tipo 2 (TLR2) e Toll tipo 6 (TLR6), sendo esse estímulo suficiente para estimular a sinalização inflamatória que inclui Akt, mTOR e Src, proteínas envolvidas na sobrevivência celular, recrutamento e ativação de leucócitos (Sun *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). Esse efeito foi observado no presente trabalho, onde os macrófagos peritoneais murinos estimulados com o zimosan apresentaram um aumento da fosforilação dessas proteínas.

Neste trabalho, foi utilizado o tratamento *in vitro* com o BD-8 na concentração de 10  $\mu$ M, essa concentração foi escolhida devido a maior redução dos níveis de NO e IL-1 $\beta$  em estudos anteriores utilizando o mesmo modelo (Ferreira *et al.*, 2024). No presente estudo, o BD-8 reduziu a fosforilação das proteínas Akt, mTOR e Src. De forma semelhante, o tratamento com ouabaína foi capaz de regular negativamente a ativação de Akt/mTOR em células de glioma, mostrando efeitos supressores no crescimento e na motilidade das células tumorais (Yang *et al.*, 2018). Além da ouabaína, a digoxina apresentou também efeito similar a partir da redução da fosforilação de Akt/mTOR e outras moléculas de sinalização da via PI3K/Akt, que são conhecidas por estarem envolvidas na sobrevivência, proliferação, metástase e autofagia de

células tumorais. Além disso, a digoxina também atuou na supressão de Src (Wang *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2015).

Um outro indutor inflamatório é a carragenina, um mucopolissacarídeo extraído da alga vermelha *Chondrus crispus*. A inflamação induzida por esse composto é aguda e caracteriza-se pelos sinais cardinais da inflamação, que aparecem imediatamente após a sua injeção subcutânea.

A resposta inflamatória é geralmente quantificada pelo aumento do tamanho da pata (edema), que é máximo em torno de 5 horas após a injeção de carragenina (Morris, 2003). Essa resposta foi observada no presente trabalho, no qual camundongos estimulados com carragenina desenvolveram o edema de pata, com o maior tamanho do edema registrado após 5 horas.

Dessa forma, foi realizado o pré-tratamento com BD-8 nas doses de 1,12 mg/kg, 0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg, sendo essas doses baseadas em trabalhos anteriores com a ouabaína (De Vasconcelos *et al.*, 2011). O pré-tratamento com o BD-8 a 1,12 mg/kg não demonstrou efeito na redução do edema de pata, por outro lado, o BD-8 a 0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg preveniram efetivamente o edema induzido pela carragenina, com efeito mais significativo na menor dose. Esse achado corrobora com o observado anteriormente com a ouabaína, que em doses menores apresentou efeito anti-inflamatório, enquanto que em concentrações mais altas apresentou características pró-inflamatórias (Leite *et al.*, 2022). Com isso, as doses de 0,56 mg/kg e 0,28 mg/kg de BD-8 foram escolhidas para os estudos posteriores *in vivo*. Esse resultado corrobora outros achados que utilizaram esteroides cardiotônicos, como a bufalina, que causou redução no edema de pata induzido por carragenina, devido à inibição da ativação de NF-κB (Wen *et al.*, 2014) e com a ouabaína, que previu o edema induzido por diferentes estímulos inflamatórios (De Vasconcelos *et al.*, 2011).

Um outro modelo de inflamação aguda é a LPA, esta é uma doença inflamatória causada por vários fatores patogênicos que podem levar à atelectasia e até mesmo à SDRA (Tang *et al.*, 2021). O LPS é um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas e tem ação indutora no sistema imunológico (Rietschel *et al.*, 2024). A administração intranasal do LPS em animais induz características da LPA, como o recrutamento de leucócitos no pulmão, edema pulmonar e hipoxemia nas alterações histopatológicas (Tang *et al.*, 2021).

Neste estudo, observou-se que o estímulo com LPS aumentou a migração de leucócitos para a região broncoalveolar durante a LPA experimental, principalmente de neutrófilos. Este tipo celular é o principal responsável pela resposta inflamatória envolvida nessa patologia (Dhaliwal *et al.*, 2012). Por outro lado, o pós-tratamento de três dias consecutivos com BD-8 atenuou a migração dos leucócitos totais no lavado broncoalveolar durante a LPA na menor

dose de 0,28 mg/kg, indicando uma possível ação protetora. Além disso, as duas doses testadas do BD-8 reduziram significativamente o número de polimorfonucleares no BALF. Esses achados são semelhantes aos obtidos para a ouabaína, que demonstrou diminuir a infiltração de neutrófilos para a região broncoalveolar em modelo de LPA (Wang *et al.*, 2018).

A LPA é caracterizada por intensa produção de neutrófilos nas primeiras horas da doença (Scozzi *et al.*, 2022), e isso foi observado no presente estudo onde os camundongos que receberam a instilação nasal de LPS tiveram aumento dos níveis séricos de neutrófilos. Por outro lado, os animais com LPA tiveram redução dos níveis séricos de linfócitos, isso pode ser devido ao recrutamento dessas células para o pulmão durante a LPA (Venet *et al.*, 2009). O tratamento com o BD-8 não modulou o número de neutrófilos, linfócitos e monócitos sanguíneos demonstrando que a molécula apresenta ação local e não sistêmica no tempo testado.

Dados complementares foram obtidos a partir da análise histológica, onde foi observado a diminuição do padrão de inflamação pulmonar nos camundongos com LPA, dentre eles, o edema alveolar, infiltrado neutrofílico, pontos hemorrágicos e acúmulo de material proteico após o tratamento com BD-8. Esses dados corroboram com os achados da ouabaína, onde o tratamento com esse esteroide apresentou efeito na redução do edema intersticial, hemorragia alveolar, espessura do septo pulmonar e infiltração de células inflamatórias em animais com LPA (Wang *et al.*, 2018).

A inflamação aguda inicia-se após uma lesão específica, desencadeando a liberação de mediadores solúveis, como citocinas, proteínas de fase aguda e quimiocinas que promovem a migração dos leucócitos para o local da inflamação, na LPA, o aumento da permeabilidade vascular facilita essa migração de células e proteínas para a cavidade pulmonar (Schoppmeyer; Van Buul, 2021; Ferreira *et al.*, 2022). Isso foi observado no presente estudo, onde os animais com LPA apresentaram aumento dos níveis de proteínas totais no BALF, por outro lado, o tratamento com o BD-8 reduziu significativamente esse exsudato proteico.

Além disso, as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  são importantes mediadores da inflamação aguda, estando aumentadas em processos inflamatórios (Wautier; Wautier, 2023). Esse efeito foi observado no presente trabalho, onde os animais estimulados com o LPS tiveram um aumento na produção dessas citocinas. Entretanto, o tratamento com BD-8 reduziu os níveis de TNF- $\alpha$ , essa redução também foi observada *in vivo* com outros esteroides cardiotônicos, como a ouabaína em modelo de peritonite induzida por zymosan e inflamação pulmonar alérgica induzida por ovalbumina (Leite *et al.*, 2015; Galvão *et al.*, 2017). A modulação do TNF- $\alpha$  pode ser associada à regulação do NF- $\kappa$ B, cuja a ativação é influenciada por vias de

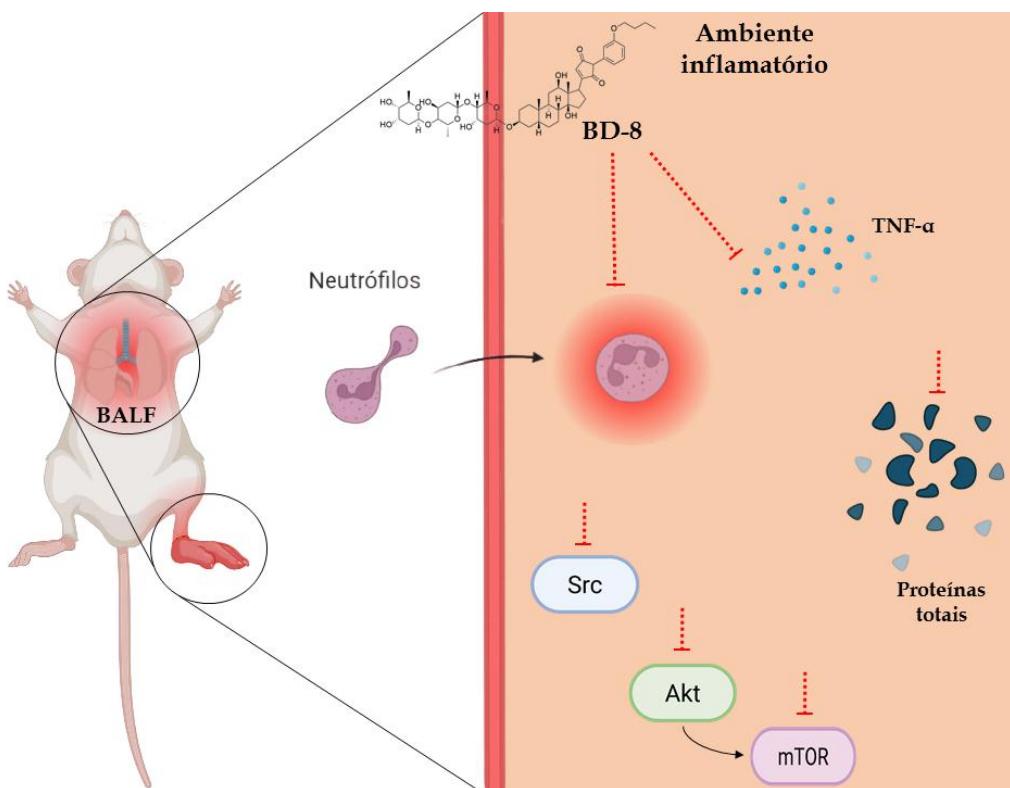
sinalização que podem envolver as proteínas Akt e mTOR (Zinatizadeh *et al.*, 2021; Torrealba *et al.*, 2020). No modelo *in vitro* do presente trabalho, observou-se uma redução da fosforilação dessas proteínas.

Desse modo, os resultados desse estudo demonstraram a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora do BD-8, evidenciando sua ação em processos inflamatórios *in vivo* e contribuindo para melhor entendimento do efeito biológico desse esteroide cardiotônico.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a molécula BD-8 exerce um efeito imunomodulador tanto *in vitro*, ao reduzir a fosforilação das vias de sinalização Akt, mTOR e Src, quanto *in vivo*, ao atenuar o edema de pata, a migração de leucócitos, proteínas totais e os níveis da citocina TNF- $\alpha$  no BALF em modelo de LPA. Esses achados destacam o potencial anti-inflamatório do composto, embora estudos adicionais sejam necessários para melhor elucidar seus mecanismos de ação.

**Figura 24.** Efeito imunomodulador do BD-8 *in vitro* e em modelos *in vivo*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025. Criado com Biorender.

## REFERÊNCIAS

- ABBATE, A. *et al.* Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 126, n. 9, p. 1260-1280, 2020.
- BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological reviews**, v. 61, n. 1, p. 9-38, 2009
- BARUNG, E. N. *et al.* Egg white-induced inflammation models: A study of edema profile and histological change of rat's paw. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 12, n. 2, p. 109-112, 2021.
- BASILE, M. S. *et al.* The PI3K/Akt/mTOR pathway: A potential pharmacological target in COVID-19. **Drug discovery today**, v. 27, n. 3, p. 848-856, 2022.
- BLAUSTEIN, M. P.; HAMLYN, 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.
- BEZERRA, F. S. *et al.* Oxidative stress and inflammation in acute and chronic lung injuries. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 548, 2023.
- BORGES, L. *et al.* COVID- 19 and neutrophils: the relationship between hyperinflammation and neutrophil extracellular traps. **Mediators of inflammation**, v. 2020, n. 1, p. 8829674, 2020.
- BURN, G. L. *et al.* The neutrophil. **Immunity**, v. 54, n. 7, p. 1377-1391, 2021.
- CARVALHO, D. C. M. *et al.* Marinobufagenin inhibits neutrophil migration and proinflammatory cytokines. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, n. 1, p. 1094520, 2019.
- 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**, v. 33, n. 2, p. 465-470, 2025.
- CASH, J. L.; WHITE, G. E.; GREAVES, D. R. Zymosan- induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. **Methods in enzymology**, v. 461, p. 379-396, 2009.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. *et al.* Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 787-793, 2020.
- CAVALCANTE- SILVA, L. H. A. *et al.* Ouabain inhibits p38 activation in mice neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 1829-1833, 2021.

- CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 48, n. 10, p. 445-453, 1994.
- CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204, 2018.
- 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 VASCONCELOS, D. I. B. *et al.* Anti- inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2011, n. 1, p. 912925, 2011.
- DHALIWAL, K. *et al.* Monocytes control second-phase neutrophil emigration in established lipopolysaccharide-induced murine lung injury. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 6, p. 514-524, 2012.
- DVELA, M. *et al.* Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. **Pathophysiology**, v. 14, n. 3-4, p. 159-166, 2007
- 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.
- FERENTINOS, P. *et al.* Interleukin-1 Beta in peripheral blood mononuclear cell lysates as a longitudinal biomarker of response to antidepressants: a pilot study. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, p. 801738, 2021.
- FERREIRA, D. A. *et al.* Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of the New Cardiotonic Steroid  $\gamma$ -Benzylidene Digoxin 8 (BD-8) in Mice. **Cells**, v. 13, n. 18, p. 1568, 2024.
- FERREIRA, L. A. M. P. *et al.* Curine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by downregulating the TLR4/MD-2/NF- $\kappa$ B (p65) signaling pathway. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 1, p. 111-121, 2022.
- FERREIRA, T. Z. *et al.* Novos valores de referência para hemogramas. **Hematology, Transfusion and cell therapy**, v. 43, p. S428, 2021.
- FILIPPI, M. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 20, p. 2149-2158, 2019.
- FRADE-SOSA, B.; SANMARTÍ, R. Neutrophils, neutrophil extracellular traps, and rheumatoid arthritis: An updated review for clinicians. **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 19, n. 9, p. 515-526, 2023.
- FORSHAMMAR, J. *et al.* Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na+/K+-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.

- GADELHA, F. A. A. F. *et al.* Musa paradisiaca L. Inflorescence Abrogates Neutrophil Activation by Downregulating TLR4/NF-KB Signaling Pathway in LPS-Induced Acute Lung Injury Model. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 1, p. 8, 2024.
- GALVÃO, J. G. F. M. *et al.* Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, p. 1117-1130, 2017.
- GALVÃO, J. G. F. M. *et al.* Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 109, p. 108808, 2022.
- GARCIA, C. S. N.; PELOSI, P.; ROCCO, P. R. M. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different?. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, p. 178-183, 2008.
- GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular medicine**, v. 17, n. 3-4, p. 293-307, 2011.
- 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.
- HERRERO-CERVERA, A.; SOEHNLEIN, O.; KENNE, E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. **Cellular & molecular immunology**, v. 19, n. 2, p. 177-191, 2022.
- HIRANO, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International immunology**, v. 33, n. 3, p. 127-148, 2021.
- HOLBROOK, J. *et al.* Tumour necrosis factor signalling in health and disease. **F1000Research**, v. 8, p. F1000 Faculty Rev-111, 2019.
- 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.
- KELLY, R. A.; SMITH, T. W. Endogenous cardiac glycosides. **Advances in Pharmacology**, v. 25, p. 263-288, 1994.
- 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.
- 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.
- KULKARNI, H. S. *et al.* Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American Thoracic Society workshop report. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 66, n. 2, p. e1-e14, 2022.

- LAREDO, J.; HAMILTON, B. P.; HAMLYN, J. M. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 212, n. 2, p. 487-493, 1995.
- LEITE, J. A. *et al.* Ouabain modulates zymosan-induced peritonitis in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 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.
- LI, D.; WU, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 291, 2021.
- LI, N. *et al.* Src family kinases: a potential therapeutic target for acute kidney injury. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, p. 984, 2022.
- LIBERALE, L. *et al.* Cytokines as therapeutic targets for cardio-and cerebrovascular diseases. **Basic Research in Cardiology**, v. 116, n. 1, p. 23, 2021.
- LIN, S. *et al.* Digoxin suppresses tumor malignancy through inhibiting multiple Src-related signaling pathways in non-small cell lung cancer. **PLoS one**, v. 10, n. 5, p. e0123305, 2015.
- LIU, C. *et al.* Cytokines: from clinical significance to quantification. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, p. 2004433, 2021.
- MAGALHÃES, D. W. A. *et al.* Evaluation of the anti-mycobacterial and anti-inflammatory activities of the new cardiotonic steroid  $\gamma$ -benzylidene digoxin-15 in macrophage models of infection. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 269, 2025.
- MAMILOS, A. *et al.* Macrophages: from simple phagocyte to an integrative regulatory cell for inflammation and tissue regeneration—a review of the literature. **Cells**, v. 12, n. 2, p. 276, 2023.
- MARGRAF, A.; LOWELL, C. A.; ZARBOCK, A. Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 139, n. 14, p. 2130-2144, 2022.
- MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. **Science**, v. 374, n. 6571, p. 1070-1075, 2021.
- MIRICESCU, D. *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 1, p. 173, 2020.
- MOKRA, D. Acute lung injury—from pathophysiology to treatment. **Physiological Research**, v. 69, n. Suppl 3, p. S353, 2020.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Inflammation protocols**, p. 115-121, 2003.

- MORTAZ, E. *et al.* Update on neutrophil function in severe inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2171, 2018.
- NI, J. *et al.* Esculin alleviates LPS-induced acute lung injury via inhibiting neutrophil recruitment and migration. **International immunopharmacology**, v. 119, p. 110177, 2023.
- 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, p. 67, 2021.
- PAVLOVIC, D. Endogenous cardiotonic steroids and cardiovascular disease, where to next?. **Cell Calcium**, v. 86, p. 102156, 2020.
- PESSÔA, M. T. C. *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.
- PIRAHANCHI, Y.; JESSU, R.; AEDDULA, N. R. Physiology, sodium potassium pump. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2023.
- QI, Y. *et al.* Inflammatory and immune mechanisms in COPD: current status and therapeutic prospects. **Journal of Inflammation Research**, p. 6603-6618, 2024.
- RANI, V. *et al.* Role of pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease and neuroprotective effects of pegylated self-assembled nanoscaffolds. **Current research in pharmacology and drug discovery**, v. 4, p. 100149, 2023.
- RAJI, L.; TETTEH, A.; AMIN, A. R. Role of c-Src in carcinogenesis and drug resistance. **Cancers**, v. 16, n. 1, p. 32, 2023.
- REN, J. *et al.* Research progress in pharmacological activities and applications of cardiotonic steroids. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 902459, 2022.
- RIETSCHEL, E. T. *et al.* Biochemistry of lipopolysaccharides. In: Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. **CRC Press**, p. 3-41, 2024.
- ROGNANT, S. *et al.* The microtubule network enables Src kinase interaction with the Na,KATPase to generate  $\text{Ca}^{2+}$  flashes in smooth muscle cells. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1007340, 2022.
- ROSE- JOHN, S. Local and systemic effects of interleukin- 6 (IL- 6) in inflammation and cancer. **FEBS letters**, v. 596, n. 5, p. 557-566, 2022.
- SCHONER, W; SCHEINER-BOBIS, G. Role of endogenous cardiotonic steroids in sodium homeostasis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 9, p. 2723-2729, 2008.
- SCHOPPMEYER, R.; VAN BUUL, J. D. The diapedesis synapse: dynamic leukocyte-endothelium interactions. **Current Opinion in Physiology**, v. 19, p. 1-9, 2021.

- SCOZZI, D. *et al.* The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 953195, 2022.
- SOLIMAN, A. M.; BARREDA, D. R. Acute inflammation in tissue healing. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 1, p. 641, 2022.
- SOUZA, R. F. *et al.* Study of tumor necrosis factor receptor in the inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 18, p. 2733, 2023.
- SUN, K. *et al.* The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 28, n. 4, p. 400-409, 2020.
- TANG, J. *et al.* Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **International immunopharmacology**, v. 91, p. 107272, 2021.
- TIAN, L.; SMIT, D. J.; JÜCKER, M. The role of PI3K/AKT/mTOR signaling in hepatocellular carcinoma metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 3, p. 2652, 2023.
- TORREALBA, N. *et al.* TGF- $\beta$ /PI3K/AKT/mTOR/NF- $\kappa$ B pathway. Clinicopathological features in prostate cancer. **The Aging Male**, 2020.
- VENET, F. *et al.* Lymphocytes in the development of lung inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells in indirect pulmonary lung injury. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 5, p. 3472-3480, 2009.
- WANG, C. *et al.* Ouabain protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 24, p. 4455, 2018.
- WANG, Y. *et al.* Digoxin exerts anticancer activity on human nonsmall cell lung cancer cells by blocking PI3K/Akt pathway. **Bioscience reports**, v. 41, n. 10, p. BSR20211056, 2021.
- WAUTIER, J.; WAUTIER, M. Pro-and anti-inflammatory prostaglandins and cytokines in humans: a mini review. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 11, p. 9647, 2023.
- WEN, L. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of bufalin in rodents. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.
- XAVIER, B. M. N. *et al.* MHTP, a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF- $\kappa$ B signaling pathway-TLR4 dependent. **Inflammation Research**, v. 68, p. 1061-1070, 2019.
- XU, Y. *et al.* Bioassay-Guided Fractionation and Biological Activity of Cardenolides from Streptocaulon juventas. **Planta Medica**, v. 89, n. 15, p. 1444–1456, 1 dez. 2023.

YANG, X. *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.

YANG, S. *et al.* Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. **Biomedical Journal**, v. 44, n. 4, p. 439-446, 2021.

ZHANG, C. *et al.* Xuebijing alleviates LPS-induced acute lung injury by downregulating pro-inflammatory cytokine production and inhibiting gasdermin-E-mediated pyroptosis of alveolar epithelial cells. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 21, n. 8, p. 576-588, 2023.

ZHANG, H.; DHALLA, N. S. The role of pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 1082, 2024.

ZHANG, Q. *et al.* Inflammation and Infection in Pain and the Role of GPR37. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14426, 2022.

ZINATIZADEH, M. R. *et al.* The Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in cancer development and immune diseases. **Genes & diseases**, v. 8, n. 3, p. 287-297, 2021.

## ANEXO I



Universidade  
Federal da  
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO : EMENDA v05/12/2024

Certificamos que a EMENDA (versão de 05/12/2024) da proposta intitulada "ANÁLISE DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ESTEROIDE CARDIOTÔNICO BD-8 IN VIVO", CEUA nº 9923131223 (ID 080524), sob a responsabilidade de **Sandra Rodrigues Mascarenhas** - 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 05/02/2025.

Pedido apresentado à CEUA: O projeto [ANÁLISE DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ESTEROIDE CARDIOTÔNICO BD-8 IN VIVO], aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, requer a inclusão de novas metodologias e o uso adicional de animais para a continuidade da pesquisa. Essa solicitação se justifica pela necessidade de aperfeiçoar os experimentos realizados, como a indução de peritonite. Durante os testes, a indução revelou-se ineficaz, resultando em comprometimento dos experimentos, já que a contagem de células no grupo que recebeu o agente inflamatório apresentou resultados semelhantes ao grupo controle, indicando que o estímulo esperado não ocorreu. Diante disso, solicito a alteração do projeto de pesquisa e a ampliação do número de animais para viabilizar a continuidade dos estudos.

Considerações da CEUA: A pesquisadora responsável solicita emenda para o projeto de pesquisa intitulado [ANÁLISE DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ESTEROIDE CARDIOTÔNICO BD-8 IN VIVO]. A solicitação se justifica pela necessidade de aperfeiçoar os experimentos realizados, como a indução de peritonite. Durante os testes, a indução revelou-se ineficaz, resultando em comprometimento dos experimentos, já que a contagem de células no grupo que recebeu o agente inflamatório apresentou resultados semelhantes ao grupo controle, indicando que o estímulo esperado não ocorreu. Diante disso, é solicitada a alteração do projeto de pesquisa e a ampliação do número de animais para viabilizar a continuidade dos estudos. No projeto alterado foi incluído novos objetivos específicos: □ In vivo, após a indução de lesão pulmonar aguda com o LPS: a) Analisar o efeito da BD-8 na migração de leucócitos encontrados no lavado broncoalveolar, avaliando o número de células e as subpopulações; b) Analisar os efeitos da BD-8 na produção das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12. Novas informações metodológicas foram adicionadas para contemplar os novos objetivos. Essas alterações requerem a adição de 72 animais. A pesquisa está prevista para finalizar em setembro de 2025. Diante do exposto, somos de parecer favorável à aprovação da emenda.

Término previsto: 09/2025

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Camundongos heterogênicos sexo: Fêmeas idade: 6 a 8 semanas Quantidade solicitada: 72

Linhagem: Swiss Peso: 25 a 35 g

## ANIMAIS UTILIZADOS

	Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	217	0

João Pessoa, 04 de março de 2025

Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares Moreira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

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



## ANEXO II



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
Linhagem:	Swiss		Peso: 25 a 30 g
			Quantidade solicitada: 130

#### ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos heterogênicos	Fêmeas	208	0

João Pessoa, 04 de março de 2025

Profa. Dra. Juliana Késsia Barbosa Soares Moreira  
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 III



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>2</sup>, José Augusto Ferreira Perez Villar <sup>2</sup> , Leandro Augusto Barbosa <sup>2</sup>, Cristoforo Scavone <sup>3</sup>, Marcelo Tigre Moura <sup>4</sup> and Sandra Rodrigues-Mascarenhas <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58.051-900, PB, Brazil; daviazavedoferreira@utf.ufpb.br (D.A.F.); annabbeatriz@gmail.com (A.B.A.M.); marimsoares@gmail.com (M.M.S.); essia\_almeida@hotmail.com (É.d.A.L.); gabrielacarolina10@gmail.com (G.C.S.L.d.O.); mateusvidamb@gmail.com (M.B.d.S.L.)
- <sup>2</sup> Laboratory of Cellular Biochemistry, Campus Centro-Oeste Dona Lindú, Federal University of São João del-Rei, Divinópolis 35.501-296, MG, Brazil; mateusmg15@gmail.com (M.V.M.); zevillar@ufs.edu.br (J.A.F.P.V.); lbarbosa.ufs@gmail.com (L.A.B.)
- <sup>3</sup> Laboratory of Neuropharmacology Research, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences ICB-1, University of São Paulo, São Paulo 05.508-900, SP, Brazil; cristoforo.scavone@gmail.com
- <sup>4</sup> Laboratory of Cellular Reprogramming, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58.051-900, PB, Brazil; marcelotmoura@gmail.com

\* Correspondence: sandra@cbiotec.ufpb.br



**Citation:** Ferreira, D.A.; Medeiros, A.B.A.; Soares, M.M.; Lima, É.d.A.; Oliveira, G.C.S.L.d.; Leite, M.B.d.S.; Machado, M.V.; Villar, J.A.F.P.V.; Barbosa, L.A.; Scavone, C.; et al. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of the New Cardiotonic Steroid  $\gamma$ -Benzylidene Digoxin 8 (BD-8) in Mice. *Cells* **2024**, *13*, 1568. <https://doi.org/10.3390/cells13181568>

Academic Editor: Guo-Chang Fan

Received: 31 July 2024

Revised: 10 September 2024

Accepted: 16 September 2024

Published: 18 September 2024

**Abstract:** Cardiotonic steroids are known to bind to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and regulate several biological processes, including the immune response. The synthetic cardiotonic steroid  $\gamma$ -Benzylidene Digoxin 8 (BD-8) is emerging 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

