



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

MARIA BEATRIZ CALADO DA SILVA

Interferência da Ouabaína no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich

JOÃO PESSOA

2019

MARIA BEATRIZ CALADO DA SILVA

Interferência da Ouabaína no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich

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

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

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

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

C141i Calado, Maria Beatriz Silva.

Interferência da ouabaina no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich / Maria Beatriz Silva Calado. - João Pessoa, 2019.

44 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: Fabíola Cruz Nunes.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Ouabaina. 2. Tumor Sólido. 3. Inflamação. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Nunes, Fabíola Cruz. III. Título.

UFPB/BC

Membro Titular



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




ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e cinco dias do mês de abril de 2019, às 14:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Fabíola da Cruz Nunes e composta pelos avaliadores: 1. Me. José Guilherme Ferreira Marques Galvão (PPgPNSB/UFPB); 2. Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam (DFPT/CCS/UFPB), a discente Maria Beatriz Calado da Silva, matrícula 11503857, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **"Interferência da Ouabaína no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich"**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Fabíola da Cruz Nunes, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.



Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 25 de abril de 2019.

*A todas as meninas que sonham em se tornar cientistas e a
todas as mulheres que tornaram isto possível*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Sandra Mascarenhas por toda a paciência, incentivo e ensinamentos imensuráveis ao longo dos últimos anos. O brilhantismo e capacidade de inspirar que compõem a sua essência não é algo fácil de se encontrar, o que me faz acreditar que foi um grande privilégio compor o seu time de pesquisadores e amantes de ciência. Nunca conseguirei expressar o meu carinho e admiração por você.

À minha co-orientadora Fabíola Cruz por sempre se mostrar disponível e disposta a contribuir com este trabalho. Você é admirável de diferentes formas e me sinto honrada em tê-la comigo neste momento.

À minha banca examinadora por aceitar contribuir de tão bom grado com o meu trabalho. Nunca pensei em pessoas melhores para participar deste momento.

À professora Vivian Rumjanek por viabilizar de diferentes formas a realização deste projeto e pelos gigantescos ensinamentos em um intervalo tão curto de tempo. Me sinto extremamente honrada por tudo isso.

Ao Projeto Nacional de Cooperação acadêmica (PROCAD), fomentado pela CAPES, que viabilizou financeiramente a execução deste trabalho.

À minha mãe, que me permitiu sair de casa aos 16 anos para dar o primeiro passo em direção a conquista de tudo que sempre sonhei. Sem seu apoio e incentivo nos últimos quatro anos isto não seria possível. À minha tão amada avó, pelo apoio incondicional e incentivo constante, por sempre ter feito parte da minha vida de uma forma tão singular e nunca ter me deixado sozinha nos momentos mais difíceis. Me faltam palavras para descrever o tamanho da minha admiração e amor por você.

As amigas que tanto amo, Clara Mass e Débora Lemos, por participar diretamente de tudo que vivi ao longo dos últimos anos. Clara, obrigada por ser “my person”, se não fosse nossas longas conversas filosóficas no seu carro diversas situações teriam sido ainda mais difíceis e sua amizade é uma das melhores coisas que a graduação me proporcionou. Débora Lemos, a bela amizade que temos hoje foi algo que nunca imaginei, mas obrigada por sempre me ouvir, incentivar e pelas incontáveis vezes em que você melhorou o meu dia. As coisas que aprendi com você sempre ficarão gravadas em mim.

Ao Neto Rodrigues por todo o amor, paciência e principalmente, todo o incentivo para que este ciclo fosse concluído. Obrigada por ter acreditado em mim quando nem eu mesma era capaz, por todas as vezes que você tornou tudo mais leve e parou o seu mundo para estar comigo, bem como por todos os importantíssimos e maravilhosos almoços que você preparou enquanto eu precisava estudar e só queria comer biscoito treloso. Sou grata por cada pequena coisa que você fez pensando no meu bem.

Aos queridos amigos que trabalharam diretamente na realização deste projeto pois sem vocês este trabalho não teria sido concluído. Amanda, o aprendizado que tive com você foi essencial para minha formação, obrigada por tudo. Gabriel, agradeço toda a dedicação e cuidado em tudo que fizemos, você foi fundamental para estarmos aqui hoje. Eu precisaria de diversas páginas para descrever o quanto foi bom trabalhar com vocês, e o Trio do Ehrlich é algo que levarei pra sempre em meu coração. A Beatriz Fernandes e Mateus Matias por todo o suporte que viabilizou a execução dos experimentos, afinal, seria humanamente impossível fazer o que fizemos sem vocês.

Ao “Team Mascarenhas”, em especial a Deyse, Éssia, Zé Guilherme e Luiz Agra por serem pessoas incríveis e pesquisadores maravilhosos sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário. Espero sempre estar rodeada de colegas como vocês, afinal todos desejam ter por perto uma equipe de tamanha qualidade e com a imensa sintonia que vemos em nosso lab.

Aos meus amigos recifenses, em especial a Gabriela Rodrigues e Keylon Andrade pois 130 km de distância nunca impediu que eu me sentisse amada por vocês.

Aos meus amigos da graduação: Felipe Jordão, João Gabriel, Beatriz Lopes, Matheus Fabião, Lucas Terceiro, Mickael Luz e Brenno Fernandes. Obrigada por compartilharem comigo tantos momentos importantes, vou sentir profunda saudade.

A todos aqueles que contribuíram para o presente momento e que não foram anteriormente citados, mas são igualmente importantes.

*“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja nossa própria substância,
já que viver é ser livre.”*

Simone de Beauvoir

RESUMO

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia murina de origem epitelial maligna, com comportamento agressivo que pode desenvolver-se de forma ascítica quando inoculado no peritônio, ou de forma sólida quando injetado via subcutânea ou intramuscular. A ouabaína, uma substância endógena capaz de inibir a Na^+/K^+ -ATPase afeta diversos mecanismos fisiopatológicos, dentre eles, a resposta inflamatória. Visto que a oncogênese afeta diretamente vários aspectos do sistema imunológico e que não há relatos na literatura sobre a influência da ouabaína na resposta inflamatória atrelada ao tumor sólido de Ehrlich, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dessa substância sobre os parâmetros inflamatórios associados ao modelo em questão. Inicialmente, camundongos *Swiss* fêmeas foram distribuídos em três grupos experimentais: tumor (animais inoculados com células de Ehrlich via intraplantar na pata esquerda), ouabaína (cujo os animais foram pré-tratados por três dias consecutivos com ouabaína na concentração de 0,56 mg/kg e receberam solução salina via intraplantar) e tumor + ouabaína (onde os camundongos receberam o pré-tratamento com ouabaína por três dias consecutivos na concentração de 0,56 mg/kg e tiveram células do tumor de Ehrlich inoculadas via intraplantar em sua pata esquerda). As patas dos animais foram medidas imediatamente após a inoculação, 24 horas depois e a cada 4 dias até o décimo terceiro dia de desenvolvimento tumoral com o auxílio de um paquímetro digital. Após este intervalo, os camundongos foram eutanasiados, os linfonodos poplíteos das patas direita e esquerda foram removidos, pesados e macerados para contagem de células total e diferencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Foi observado que o pré-tratamento com a ouabaína reduziu significativamente o crescimento tumoral em 15%, 21% e 14,5% no quinto, nono e décimo terceiro dia, respectivamente, em relação ao grupo não tratado. Adicionalmente, constatou-se também a redução do peso tumoral em 17% e do linfonodo poplíteo em 48% no grupo pré-tratado. O número de células totais e a contagem diferencial obtida a partir do linfonodo não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. Portanto, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, a capacidade da ouabaína em modular a carcinogênese no modelo experimental de tumor de Ehrlich através da diminuição do crescimento tumoral, peso do tumor e do linfonodo sugerindo assim, outras ações fisiopatológicas para essa substância.

Palavras-chave: Ouabaína. Tumor Sólido. Inflamação.

ABSTRACT

Ehrlich tumor is a murine neoplasm of malignant epithelial origin with aggressive behavior and may develop a ascitic form when inoculated into the peritoneum, or a solid form when injected subcutaneously or intramuscularly. Ouabain, an endogenous substance capable of inhibiting Na^+/K^+ -ATPase, affects several pathophysiological mechanisms, among them, inflammatory response. Since oncogenesis directly affects several aspects of the immune system and there are no reports in the literature on the influence of ouabain on the inflammatory response linked to Ehrlich solid tumor, the present study aims to evaluate the effects of this substance on the inflammatory parameters using this model. Initially, female Swiss mice were divided into three groups: tumor (not treated with ouabain and Ehrlich cells inoculated on the left footpad), ouabain (whose animals were pretreated for three consecutive days with 0,56mg/kg ouabain and received saline solution in the footpad) and tumor + ouabain (where the mice received pre-treatment with 0.56mg/kg ouabain and had Ehrlich tumor cells inoculated into their left paw). The paws of the animals were measured immediately after inoculation, 24 hours later and every 4 days until the thirteenth day of tumor development with the aid of a digital caliper. After this interval, the mice were euthanized, the popliteal lymph nodes of the right and left paws were removed, weighed and macerated for total and differential cell counts. The data were analyzed using One-Way ANOVA followed by the Tukey post-test. It was observed that pre-treatment with ouabain significantly reduced tumor growth by 15%, 21% and 14.5% on the fifth, ninth and thirteenth day, respectively, relative to the untreated group. Tumor weight reduction was also observed in 17% and popliteal lymph node in 48% in the pre-treated group. The number of total cells and the differential count obtained from the lymph node did not present significant difference between the experimental groups. This study demonstrated for the first time that ouabain is capable of modulating carcinogenesis in the Ehrlich solid tumor experimental model by decreasing tumor growth, tumor weight and lymph node size, thus suggesting other pathophysiological actions for this substance.

Keywords: Ouabain. Solid Tumor. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estrutura química da ouabaína.....	16
FIGURA 2 - Esquema demonstrativo das etapas de pré-tratamento e inoculação em camundongos Swiss.....	21
GRÁFICO 1 - Evolução do tamanho do tumor sólido ao longo dos dias, nos diferentes grupos estudados.....	25
GRÁFICO 2 - Peso das patas direita e esquerda dos grupos experimentais no 13º dia desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.....	27
GRÁFICO 3 - Peso do linfonodo poplíteo removido das patas direita e esquerda dos animais experimentais.....	28
GRÁFICO 4 - Contagem celular dos linfonodos poplíteos após o processamento...29	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de variância

AV3V: Região anteroventral do terceiro ventrículo

ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico

CD: Do inglês “*cluster of differentiation*”

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

IL: Interleucina

IFN- γ : Interferon gamma

Na⁺/K⁺ ATPase: sódio-potássio ATPase

NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B

NK: Células natural *killer*

OUA: Ouabaína

PD: Pata direita

PE: Pata esquerda

PGs: Prostaglandinas

rpm: Rotações por minuto

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

i.m.: Intramuscular

i.p.: Intraperitoneal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	TUMOR DE ERLICH.....	12
2.2	OUABAÍNA	15
2.2.1	Ouabaína e o Sistema Imunológico.....	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4	METODOLOGIA	20
4.1	ANIMAIS	20
4.2	TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH E PREPARO PARA INOCULAÇÃO	20
4.3	FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E PRÉ-TRATAMENTO COM OUABAÍNA	20
4.4	INOCULAÇÃO DO TUMOR NO COXIM PLANTAR	21
4.5	EUTANÁSIA	22
4.6	ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TUMORAL	22
4.7	REMOÇÃO E PESAGEM DO LINFONODO POPLÍTEO.....	22
4.8	PESO DO TUMOR	23
4.9	CONTAGEM CELULAR TOTAL E DIFERENCIAL DO LINFONODO POPLÍTEO.....	23
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5	RESULTADOS	24
5.1	PRÉ-TRATAMENTO COM OUABAÍNA.....	24
5.1.1	Crescimento do Tumor	24
5.1.2	Peso do Tumor	25
5.1.3	Peso do Linfonodo Poplíteo	26
5.1.4	Contagem de Células Totais	27
5.1.5	Contagem Diferencial	28
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O aumento exponencial a diversos agentes carcinógenos e a perpetuação de hábitos deletérios a saúde humana refletem-se nos números crescentes de pessoas diagnosticadas com câncer em todo o mundo, bem como nas previsões para os próximos anos. De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), em 2018, houve aproximadamente 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de óbitos em decorrência do câncer a nível global. As projeções apontam uma incidência de 29,5 milhões de pessoas afetadas por câncer em 2040 (OMS, 2019a). No Brasil, foi estimado o surgimento de 582.590 novos casos em 2018, com 300.140 homens afetados e 282.450 mulheres atingidas (INCA, 2018).

A palavra câncer refere-se de forma genérica a um conjunto de mais de 100 doenças (INCA, 2019) desencadeadas pelo aumento de proliferação celular (HUBBI; SEMENZA, 2015), mutações sequenciais e alterações epigenéticas (BAYLIN; JONES, 2011) que promovem modificações em diversos mecanismos relacionados a homeostasia e transformam células normais em células cancerígenas (EVANGELISTA, 2018).

Frequentemente encontram-se novas características que são próprias de tumores ou influenciam em sua progressão, contudo, alguns fatores são inerentes à sua existência, dentre eles estão: a capacidade de sustentar sinais de proliferação, alterando a função e arquitetura de tecidos normais; a supressão de genes atrelados à inibição de proliferação, tornando-se mais resistente aos mecanismos que levam a morte celular e a indução da angiogênese para o suprimento de oxigênio e nutrientes tumoral (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; SNAEBJORNSSON; SCHULZE, 2019).

Nas últimas décadas, houve um aumento progressivo de evidências que correlacionam a desregulação da resposta inflamatória com a patogênese de diferentes doenças, dentre elas, o câncer (PRASAD; RAVINDRAN; AGGARWAL, 2010). Durante o desenvolvimento de tumores, as respostas inflamatórias podem coexistir com papéis pró-tumoral e antitumoral, sendo necessária uma sobreposição eficiente dos mecanismos antitumorais para evitar que as vias de favorecimento ao crescimento do tumor tornem-se dominantes (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

De caráter espécie-específico, o tumor de Ehrlich é um carcinoma mamário de camundongo fêmea utilizado para a prospecção de drogas antineoplásicas, para o entendimento de mecanismos tumorais e para a elucidação de diferentes carcinógenos sobre o desenvolvimento tumoral (MATSUZAKI, 2003; GUERRA, 1983)

Procura-se expandir as estratégias terapêuticas atuais, seja por drogas com maior especificidade, pela utilização de moléculas que possam agir paralelamente em diferentes alvos ou de adjuvantes que possam ser combinados visando a diminuição dos efeitos agressivos das quimioterapias atuais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

A ouabaína é uma molécula pertencente a classe dos glicosídeos cardíacos, inicialmente encontrada apenas em espécies vegetais da família *Apocynaceae*. Contudo, foi elucidada como um hormônio circulante em mamíferos superiores, sendo indistinguível em estrutura e efeitos biológicos, daquela encontrada em vegetais. (HAMLYN et al., 1991). Sua secreção pode ocorrer em resposta ao estresse induzido por exercício físico, por estimulação adrenérgica ou em resposta a angiotensina II (LAREDO et al, 1997; BAUER et al, 2005). Apesar dos papéis desempenhados pela ouabaína no organismo não estarem completamente estabelecidos, sabe-se do seu papel imunomodulador em diferentes modelos de inflamação (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017; DE VASCONCELOS et al., 2011; GALVÃO et al., 2017; JACOB et al., 2013; LEITE et al., 2015).

Portanto, o presente trabalho justifica-se pela escassez de informações entre o referido hormônio e modelos experimentais de tumores sólidos, e a necessidade do entendimento de fatores que modulam a resposta imunológica frente a tumores. Para isso, utilizou-se o modelo experimental de Ehrlich para observação da formação do edema de pata e crescimento tumoral, bem como observações pertinentes ao linfonodo poplíteo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TUMOR DE ERLICH

Em 1909, Paul Ehrlich propôs que células alteradas surgem continuamente no organismo, sendo responsabilidade do sistema imunológico debelar estas células modificadas, propondo de forma breve o que seria posteriormente descrito como vigilância imunológica. Em 1950, Macfarlane e Burnet postularam o papel do sistema imune no monitoramento do organismo, bem como o reconhecimento e eliminação das células transformadas que surgem com certa frequência, controlando então, o aparecimento de tumores incipientes. Esta teoria acaba por apresentar o papel determinante do sistema imunológico do hospedeiro como fator determinante para a progressão de células neoplásicas (KIM; EMI; TANABE, 2007; MACFARLANE, 1957).

Células não-cancerígenas - incluindo as células do sistema imunológico - podem ser cooptadas a funcionar de forma que permita o desenvolvimento tumoral, subvertendo suas características originais. O papel destas células no microambiente tumoral pode envolver, dentre diversos mecanismos, o desencadeamento de eventos responsáveis pelo “sucesso tumoral” tais como o remodelamento tecidual, angiogênese (normalmente atrelada a processos inflamatórios), produção de nitrogênio, fatores de crescimento, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na tumorigênese são extremamente complexos, envolvendo questões genéticas e ambientais que culminam no surgimento e progressão tumoral, portanto, é necessário que haja o aprimoramento de ferramentas destinadas à pesquisa a fim de compreender os processos relacionados ao crescimento tumoral, além da prospecção de agentes terapêuticos. Com isso, surgiu a oncologia experimental, um ramo da oncologia que utiliza tumores transplantáveis na elucidação de questões relevantes dentro da temática do câncer, e um modelo amplamente empregado nessa área é o tumor de Ehrlich. (BABA; CÂTOI, 2007; MERTENS et al., 2015).

Descrito por Paul Ehrlich em 1905, o tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental originada do adenocarcinoma mamário murino, transplantável, de fácil

monitoramento, com um rápido crescimento e caráter agressivo (RIZZO, 2000). Na oncologia experimental, tal modelo é bastante utilizado como uma ferramenta para responder perguntas relacionadas à influência de diferentes tipos de carcinógenos no surgimento de tumores, ação antineoplásica de diferentes moléculas, aspectos imunológicos, bioquímicos ou terapêuticos e cinética tumoral (AGRAWAL et al., 2001; SAAD; HASSANIEN; EL-LBAN, 2017, SYMCHYCH et al., 2017). A sua vasta aplicação em pesquisa decorre, também, da facilidade em quantificar as células tumorais, resultando na possibilidade de padronização e ajuste da concentração a ser inoculada em animais experimentais. Além disso, é um modelo de baixo custo, capaz de desenvolver-se na maioria das linhagens de camundongos – sendo BALB/c e *Swiss* as comumente utilizadas – e não apresenta regressão espontânea (CHEN; WATKINS, 1970; OZASLAN et al., 2011).

Morfologicamente, as células do tumor de Erlich caracterizam-se por um núcleo denso, redondo ou ovóide, citoplasma escasso e variação de tamanho e forma, também chamado de anaplasia (GUERRA, 1983). Em análise histológica, o tumor apresenta fibras colágenas e capilares neoformados, extensas áreas de necrose decorrentes da intensa morte das células neoplásicas mesmo na primeira semana de inoculação, alto índice mitótico e elevada invasividade (FRAJACOMO et al., 2016; THAPLIYAL et al., 2019; DA SILVA et al., 2017).

A proliferação celular acelerada e agressividade, características desejáveis pela perspectiva experimental, advém da não expressão de MHC classe II por essa linhagem tumoral que reflete na baixa imunogenicidade observada nesse tipo de tumor. Acredita-se que esse fenótipo foi adquirido após sucessivas passagens *in vitro* com o intuito de obter uma linhagem maligna transformada (CHEN; WATKINS, 1970).

Originalmente, o crescimento do tumor de Ehrlich se dava de forma sólida, contudo, em 1932 Loewenthal e Jahn passaram a utilizar o tumor de forma ascítica. Portanto, seu desenvolvimento está intrinsecamente relacionado com a via de inoculação, podendo ocorrer de forma ascítica (quando inoculado via intraperitoneal) ou sólida (quando inoculado via subcutânea ou intramuscular). Após a inoculação das células via intraperitoneal, progressivamente ocorrerá o aumento do número de células tumorais e volume de líquido ascítico, sendo esse aumento de volume relacionado ao aumento da permeabilidade dos capilares no peritônio e o processo

inflamatório local decorrente das células tumorais naquela região e a liberação de substâncias por células mortas (FASTAIA; DUMONT, 1976).

A sobrevivência dos animais portadores do tumor em sua forma ascítica tende a ser menor em comparação a aqueles cujo o desenvolvimento do tumor se deu de forma sólida. Acredita-se que um dos motivos para tal comportamento é a elevada hemorragia intraperitoneal, visto que camundongos com tumor ascítico que tiveram sua morte retardada apresentaram líquido ascítico menos hemorrágico em comparação a animais que morreram em menor intervalo de tempo. A pressão mecânica exercida pelo fluido e substâncias tóxicas liberadas pelas células tumorais também influenciam no tempo de sobrevivência dos animais (KLEIN; KLEIN, 1951; HARTVEIT, 1963).

A forma sólida, por sua vez, ocorre quando as células são inoculadas via intramuscular ou subcutânea. Logo após a inoculação, ocorre migração de células pró inflamatórias e formação de edema em decorrência ao estresse mecânico sofrido. Há também a migração das células tumorais para os linfonodos de drenagem mais próximos ao sítio inflamado, o que causa a proliferação de linfócitos e o aumento do tamanho desses órgãos. Esta característica permitiu a validação de um método para estudo de metástases, uma vez que ocorre disseminação linfática das células cancerígenas através dos linfonodos (DAGLI; GUERRA; SALDIVA, 1992). De maneira geral, a forma sólida apresenta crescimento mais lento em comparação ao tumor ascítico devido à alta taxa de morte celular e alterações em características metabólicas no microambiente tumoral como a oxigenação do tecido e a concentração de nutrientes. O pico de crescimento tumoral tende a ocorrer sete dias após a inoculação, apresentando uma massa palpável de superfície lisa e formato irregular (GARE, 2008; GUERRA, 1983).

De acordo com os princípios da oncogênese atual, para que ocorra o aparecimento de um tumor é necessário entre duas a seis (ou mais) mutações genéticas interferindo em mecanismos fisiológicos de reparo, diferenciação, proliferação e morte celular, sendo raras as vezes que uma única mutação é capaz de desencadear uma neoplasia (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010). Não obstante, organismos estão suscetíveis ao eventual surgimento de neoplasias, resultando na necessidade de eliminação destas células pelo sistema imunológico através de um evento caracterizado como imunovigilância, capaz de reconhecer e promover a morte de células tumorais em desenvolvimento (ZITVOGEL et al., 2016). As células

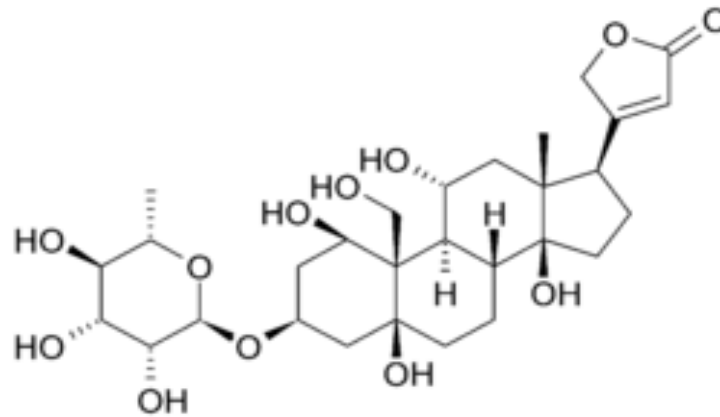
efetoras deste processo são linfócitos T (helper e citotóxico), linfócitos B, células NK, macrófagos e células dendríticas. No caso de tumores colorretais e melanoma, a presença destas células no infiltrado estão atreladas a um bom prognóstico, enquanto em câncer de mama, ocorre o inverso (PAGES, et al., 2010; TSUTSUI et al., 2005).

No desenvolvimento tumoral decorrente da inoculação das células de Ehrlich, diferentes perfis de resposta podem ser observados a depender da concentração celular inoculada, número de dias de crescimento do tumor ou da linhagem de camundongo utilizada. Fernandes e colaboradores (2015) observaram uma diminuição de células polimorfonucleares e aumento de células mononucleares 24 horas após a inoculação do tumor, assim como o aumento de mediadores inflamatórios como óxido nítrico e PGE2. Citocinas como IL-1 β , IFN- γ e IL-10 também apresentaram aumento em diferentes tempos ao longo do experimento.

2.2 OUABAÍNA

Os glicosídeos cardiotônicos são uma classe de compostos naturais que apresentam grande diversidade estrutural, mas partilham o mesmo núcleo esteroidal, responsável pela atividade deste grupo (SCHONFELD et al., 1985). Dentre as substâncias inseridas nesta categoria encontra-se a ouabaína, um glicosídeo cardiotônico estruturalmente formado por um esteroide (ouabagenina) e um açúcar (ramnose) unidos por ligações glicosídicas (LEITE, 2012).

FIGURA 1. Estrutura química da ouabaína



FONTE: Leite, 2012.

Inicialmente, a ouabaína foi encontrada em algumas plantas da família *apocynacea*, mais especificamente nas cascas da árvore *Acokanthera ouabaio* e em sementes maduras de *Strophanthus gratus* e *Strophanthus kombé*. Em 1785, digitálicos como a ouabaína foram introduzidos na clínica por Willian Withering para o tratamento de certas arritmias, choque e principalmente insuficiência cardíaca (WILKINS; KENDALL; WADE, 1785).

Esse digitálico possui a capacidade de inibir a Na^+/K^+ -ATPase pela ligação no domínio extracelular da subunidade alfa, resultando em um desbalanço hidroelettrico em decorrência do aumento citoplasmático de sódio e diminuição dos níveis do íon potássio. Como um reflexo ao aumento intracelular de sódio, ocorre uma diminuição da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ resultando em uma maior concentração de Ca^{2+} livre no interior da célula (WENCESLAU, 2007).

No ano de 1991, Hamlyn descreveu a ouabaína como sendo uma substancia endógena, circulante no plasma de mamíferos superiores, e da perspectiva estrutural, biológica e imunológica, uma molécula indistinguível da encontrada em vegetais (HAMLYN et al., 1991). A partir disto, a ouabaína passou a ser considerada um hormônio, presente até mesmo no líquido cefalorraquidiano (DVELLA et al., 2011), cujo papel fisiológico precisava ser compreendido.

A biossíntese da ouabaína endógena ocorre na hipófise, glândula adrenal, hipotálamo e região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) (GOTO et al., 1992; SCHONER, 2000; PAMNANI et al., 1981) e sua concentração pode variar entre

50pM e 80nM (FERRANDI et al., 1997). Alterações na síntese ou liberação deste hormônio estão relacionados com o estado fisiológico do organismo, sendo influenciada por estresse agudo decorrente do exercício físico, metabolismo de hormônios esteroides (HAMLYN et al., 2003), aumento da concentração de sódio, angiotensina II, norepinefrina (BAUER et al, 2015) e hormônio adrenocorticotrófico (DE WARDENER, 1961). Em humanos, alterações na síntese ou concentração da ouabaína se relaciona com a gênese de doenças como insuficiência renal crônica (HAMLYN et al., 1996), insuficiência cardíaca congestiva (GOTTLIEB et al, 1992) e infarto agudo do miocárdio (BAGROV et al., 1994).

Sabe-se que baixas concentrações de ouabaína não são capazes de inibir totalmente a enzima Na^+/K^+ -ATPase, no entanto, promovem alterações conformacionais nessa enzima que por sua vez, resulta na ativação de vias de sinalização que regulam processos como crescimento, proliferação e motilidade celular. (AIZMAN et al., 2001; FONTANA et al., 2013).

2.2.1 Ouabaína e o Sistema Imunológico

Embora o papel fisiológico da ouabaína não esteja completamente elucidado, sua classificação como uma molécula imunomoduladora é algo difundido na comunidade científica, visto que possui a capacidade de modular diversos mecanismos do sistema imune (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017 ECHEVARRIA-LIMA et al., 2003).

Em timócitos, células precursoras dos linfócitos T, a OUA apresentou um efeito inibitório frente a diferentes mitógenos como concanavalina-A (RODRIGUES-MASCARENHAS et al, 2009) éster de forbol (TPA) (OLEJ et al., 1994) e IL-2 (STOECK; NORTHOFF; RESCH, 1983). Nessas mesmas células murinas, esse glicosídeo foi capaz de induzir a expressão de CD69, uma molécula importante para a maturação dos timócitos, através do influxo de cálcio do meio extracelular (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003). Este hormônio também está relacionado a processos apoptóticos, uma vez que a despolarização da membrana plasmática induzida pela inibição da Na^+/K^+ ATPase por altas concentrações de ouabaína reduz os níveis de K^+ e induz a atividade das caspases (BORTNER et al., 1997). Tal influencia foi comprovada através da morte por apoptose em células

Jurkat (ORLOV et al., 1999), linfócitos ativados (ESTEVES et al., 2005) e do sangue periférico (ANNER et al., 1994).

Diversos trabalhos do nosso grupo corroboram o papel imunomodulador da ouabaína (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). Em modelo de inflamação pulmonar alérgica, a ouabaína foi capaz de modular os níveis de IL-4, IL-13 e IFN- γ , bem como inibir o recrutamento de linfócitos CD3⁺ e reduzir o influxo de eosinófilos para o pulmão (GALVÃO et al., 2017). Adicionalmente, esse glicosídeo modula negativamente a inflamação desencadeada por *Leishmania amazonenses*, reduzindo a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e diminuindo o nível das citocinas TNF- α e IFN- γ (JACOB et al., 2013). A ouabaína também foi capaz de inibir eventos atrelados à inflamação aguda e reduzir o edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos, como a carragenina, composto 48/80 e zimosan, e diminuir o extravasamento de exsudato para a cavidade peritoneal (DE VASCONCELOS et al., 2011).

Estudos *in vivo* apontam ainda o sinergismo da ouabaína com glicocorticoides modulando a diferenciação de linfócitos B, visto que após o tratamento com ouabaína, os animais apresentaram diminuição no número destas células no sangue periférico, baço e medula óssea (RODRIGUES-MASCARENHAS; DOS SANTOS; RUMJANEK, 2006). Adicionalmente, em modelo de inflamação aguda induzida por zimosan, a ouabaína foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β e TNF- α , além da migração de neutrófilos para o peritônio decorrente da inibição do NF-kB (LEITE et al., 2015).

Apesar das pesquisas delinearem progressivamente o papel anti-inflamatório da ouabaína (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017), pouco se entende sobre a ação deste hormônio em situações de desenvolvimento tumoral. Considerando que o processo inflamatório está positivamente associado ao crescimento tumoral (WALLACE, 2002), esse trabalho teve como objetivo estudar o efeito dessa molécula no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tratamento com ouabaína no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich, pela análise da formação do edema de pata e do linfonodo de drenagem.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em animais pré-tratados ou não com a ouabaína:

- Analisar a evolução do crescimento tumoral através da averiguação da formação do edema de pata e do peso tumoral;
- Observar o efeito da ouabaína no linfonodo poplíteo (linfonodo de drenagem) pela análise do seu peso e celularidade.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos fêmeas não isogênicos da linhagem *Swiss*, com idade entre 6 e 8 semanas e peso corporal entre 25 e 30g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Professor Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e foram mantidos em suas instalações com água e ração *ab libtum*, submetidos a ciclos claro-escuro de 12 horas em salas com temperatura entre 21±1 °C. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos/UFPB com o número 093/2016.

4.2 TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH E PREPARO PARA INOCULAÇÃO

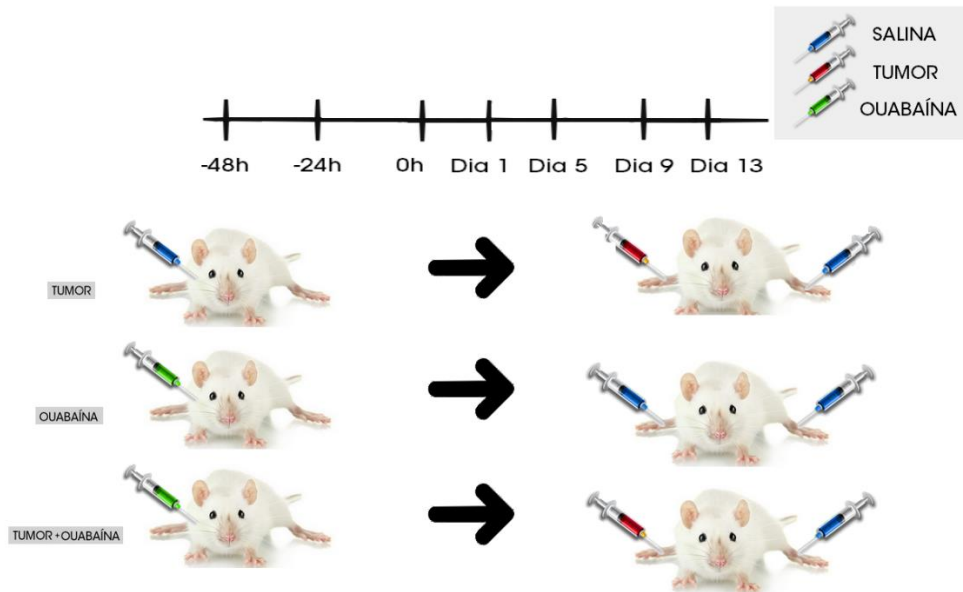
É característico desta linhagem celular o desenvolvimento do tumor ascítico, independente da forma de crescimento objetivada no estudo *in vivo*, isto porque é a partir das células obtidas em suspensão que se realiza o transplante subsequente em animais. Para tal, criotubos previamente congelados seguiram o protocolo de descongelamento descrito por PERES e CURI, 2005. A viabilidade foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan e a concentração ajustada para 1×10^6 em um volume de 300 μL por animal. A inoculação foi feita via i.p nos camundongos, visando, posteriormente, a transferência de células para outro animal, o que é referido como repique.

Cinco dias após o primeiro repique, o camundongo foi submetido à eutanásia e o líquido ascítico formado na cavidade peritoneal foi removido, seguindo-se então os procedimentos de contagem e inoculação descritos acima. Apenas a partir das células provenientes do segundo repique realizou-se a inoculação em pata.

4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E PRÉ-TRATAMENTO COM A OUABAÍNA

A fim de avaliar o efeito do pré-tratamento com ouabaína no desenvolvimento do tumor Sólido de Ehrlich, camundongos foram separados aleatoriamente em diferentes grupos e acondicionados em caixas de polipropileno. O esquema de divisão e tratamento está ilustrado na figura 2.

FIGURA 2. Esquema demonstrativo das etapas de pré-tratamento e inoculação em camundongos Swiss.



Fonte: autoral

Durante três dias consecutivos foram realizadas injeções (i.p) nos grupos cabíveis, sendo o último pré-tratamento realizado uma hora antes da inoculação do tumor. Utilizou-se uma concentração de 0,56 mg/kg de ouabaína, previamente utilizada em outros trabalhos do nosso grupo (RODRIGUES-MASCARENHAS et al. 2006; DE VASCONCELOS, et al., 2011; JACOB et al., 2012; LEITE et al., 2015; GALVÃO et al., 2017) em um volume de 200 µL para cada animal. O mesmo volume de solução salina foi injetada pela mesma via no grupo tumor para mimetizar o estresse sofrido pelas injeções.

4.4 INOCULAÇÃO DO TUMOR NO COXIM PLANTAR

Para o desenvolvimento da forma sólida, as células de Ehrlich provenientes do repique foram ajustadas para uma concentração de 1×10^5 células/animal em 50 μ l e foram inoculadas, de forma subcutânea, no coxim plantar da pata esquerda. No membro contra-lateral foi injetado solução salina no mesmo volume para mimetizar as respostas locais que ocorrem em detrimento da injúria mecânica.

No 13° dia de desenvolvimento tumoral, os animais foram eutanasiados, suas patas foram medidas com micrômetro (Digimess), os linfonodos poplíteos da pata direita e esquerda foram removidos, pesados, macerados e a suspensão celular obtida foi contada em câmara de Neubauer.

4.5 EUTANÁSIA

Uma solução de ketamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg foi injetada via intramuscular. Após a anestesia do animal, foi realizado o deslocamento cervical. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.6 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TUMORAL

A espessura da massa tumoral em desenvolvimento foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (Digimess) uma hora após a inoculação, 24 horas depois e posteriormente a cada quatro dias até a eutanásia. Este intervalo de tempo foi estabelecido pensando em minimizar o estresse aos animais.

4.7 REMOÇÃO E PESAGEM DO LINFONODO POPLÍTEO

Após a eutanásia, foi feita a assepsia do animal com álcool 70% e realizada uma incisão com o intuito de expor a área onde localiza-se o linfonodo em questão. Após a cautelosa remoção com o auxílio de pinças cirúrgicas, o órgão foi pesado em balança eletrônica de precisão em filtro de papel.

4.8 PESO DO TUMOR

Os coxins plantares direito e esquerdo foram removidos pela desarticulação das patas na junção tíbio-társica seguido de pesagem em balança eletrônica de precisão (JUNIOR et al., 2007).

4.9 CONTAGEM CELULAR TOTAL E DIFERENCIAL DO LINFONODO POPLÍTEO

Linfonodos da pata esquerda e direita foram macerados em placa de Petri com o auxílio de um embolo de seringa e uma peneira de polipropileno em 6ml de solução salina. Esta suspensão foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e o pellet formado ressuspensionado em 1 mL de solução salina, onde uma alíquota de 10 μ L foi retirada para contagem em câmara de Neubauer com o azul de Trypan na proporção de 1:10 respectivamente.

Para contagem diferencial, 200 μ L de suspensão de células foi centrifugado em centrífuga citospin a 1500 rpm por 10 min. Em seguida, as lâminas foram coradas com kit Panótico, composto por uma solução fixadora (etanol), corante basófilo (eosina) e corante acidófilo (azul de metileno), onde as lâminas ficaram submersas em diferentes tempos estipulados pelo fabricante. Após a secagem por 24 horas em temperatura ambiente, as lâminas foram percorridas até a contagem de 100 células diferenciadas em macrófagos, linfócitos e neutrófilos baseados em sua morfologia.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5 RESULTADOS

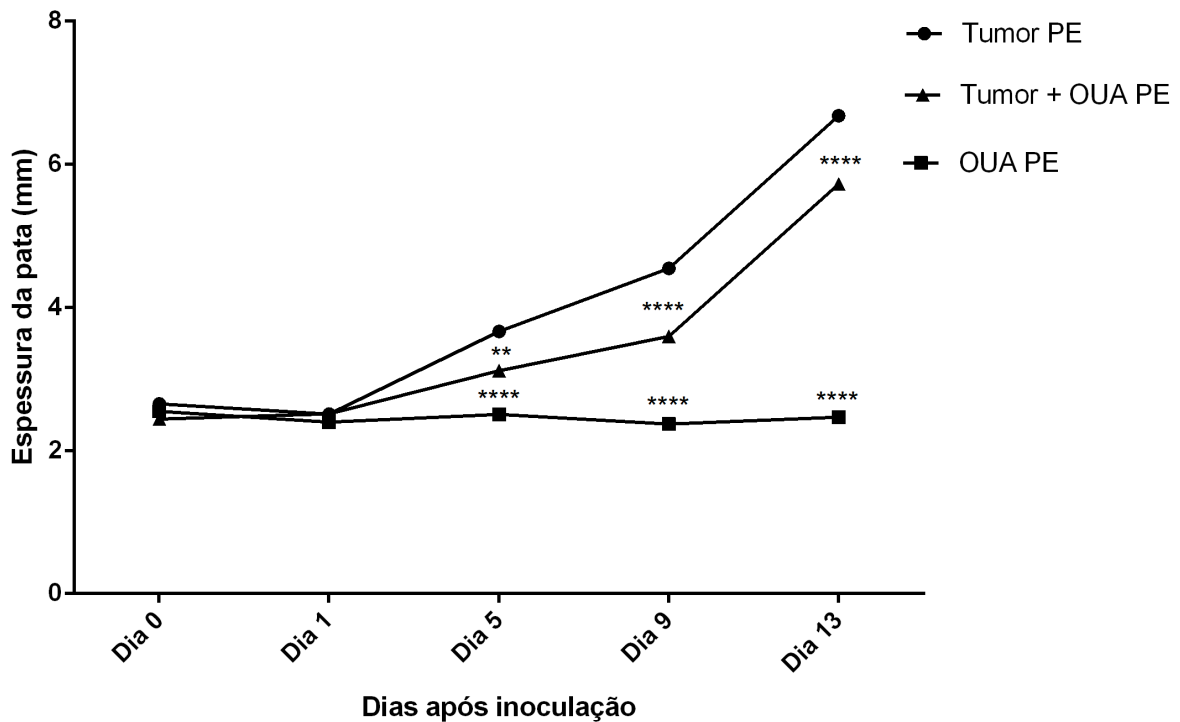
5.1 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM OUABAÍNA

5.1.1 Crescimento do Tumor

A partir da inoculação das células de Ehrlich no coxim plantar de camundongos *Swiss*, foi possível observar um aumento progressivo no tamanho e peso tumoral.

Na primeira medição e 24 horas após a inoculação do tumor, não foi possível observar diferença em relação as patas direita e esquerda dos grupos experimentais. Contudo, a partir do quinto dia de desenvolvimento tumoral foi possível constatar a evolução do crescimento do tumor com diferença significativa entre os grupos. Observa-se ainda um pico de crescimento após o nono dia em ambos os grupos que possuíam tumor (Figura 3).

Gráfico 1. Evolução do tamanho do tumor sólido ao longo dos dias nos diferentes grupos estudados.



PE = Pata Esquerda; PD = Pata Direita. **** ($p < 0,0001$) e ** ($p < 0,01$) quando comparado a pata esquerda do grupo tumor.

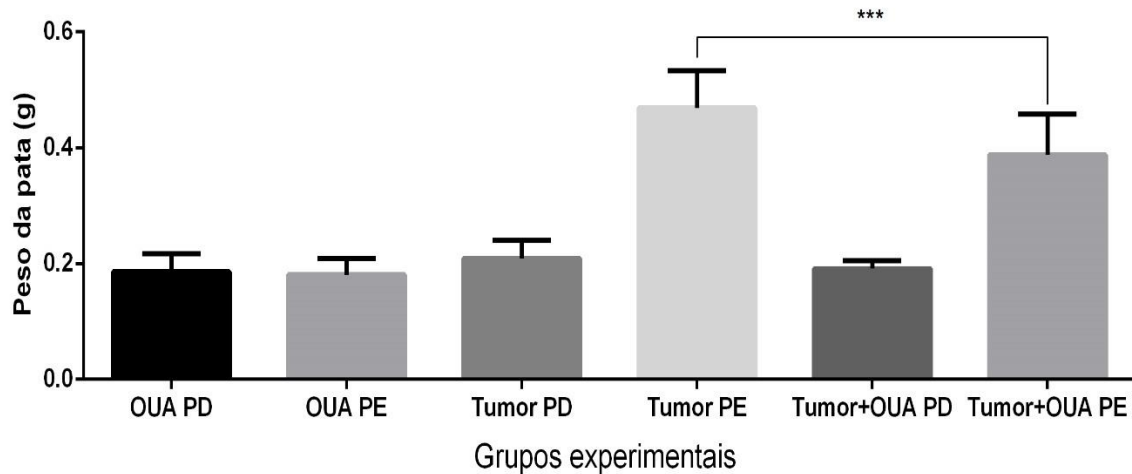
Apenas as patas esquerdas foram representadas graficamente visto que os animais não recebem células tumorais na pata direita.

A inoculação de células tumorais na pata do animal causou o desenvolvimento do tumor sólido e um aumento progressivo de 38%, 71% e 151% na espessura da pata do animal, no quinto, nono e décimo-terceiro dias respectivamente. Os resultados obtidos indicam ainda, que a ouabaína foi capaz de diminuir o desenvolvimento da massa tumoral em 15%, 21% e 14,5% em comparação com o grupo não tratado, em todo o período avaliado (Figura 3). O tratamento apenas com a ouabaína na ausência de células tumorais não interfere no crescimento das patas.

5.1.2 Peso do Tumor

A partir da inoculação de células viáveis e de comportamento agressivo em camundongos saudáveis, espera-se o desenvolvimento do tumor no local de injeção. O peso do tumor reflete proporcionalmente o crescimento tumoral, portanto, compreende-se os valores obtidos para cada um dos grupos (Figura 4).

Gráfico 2. Peso das patas direita e esquerda dos grupos experimentais no 13º dia desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich.



PD = Pata Direita; PE = Pata Esquerda. *** $p < 0,001$ quando comparado a pata esquerda do grupo tumor.

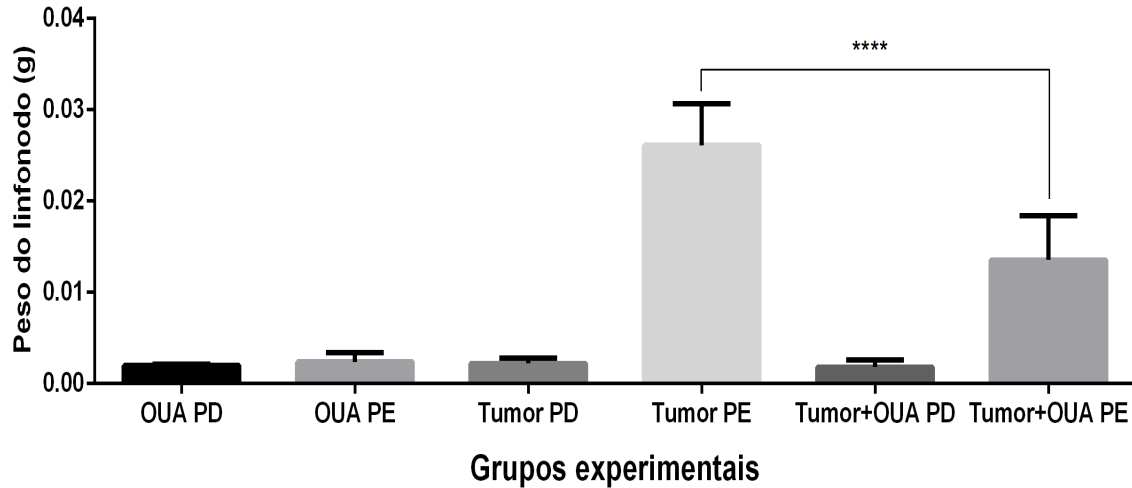
A administração de solução salina nas patas contra-lateral (PD) a que foi injetada o tumor (PE) representa o controle experimental e demonstram um grau de similaridade por terem sido submetidas ao mesmo estresse mecânico no início na experimentação, sem apresentarem modificações quanto ao peso das patas.

Em relação ao grupo tumor, a pata esquerda (PE) inoculada com células tumorais apresentou aumento de 44,5% do seu peso em relação à pata controle (PD). No entanto, o pré-tratamento com a ouabaína foi capaz de reduzir em 17% o aumento do peso da pata desencadeado pela inoculação de células tumorais quando comparado ao grupo tumor. Constatou-se também que a ouabaína isoladamente não é capaz de modificar o peso das patas.

5.1.3 Peso do Linfonodo Poplíteo

Após treze dias de crescimento tumoral, foi observado aumento de volume dos linfonodos poplíteos removidos da pata esquerda dos grupos tumor e Tumor + OUA. Linfonodos removidos das patas contra-laterais dos grupos experimentais, e da pata esquerda do grupo OUA, apresentaram pesos semelhantes.

Gráfico 3. Peso do linfonodo poplíteo removido das patas direita e esquerda dos animais experimentais.



PD = Pata Direita; PE = Pata Esquerda. **** $p < 0,0001$ quando comparado a pata esquerda do grupo tumor.

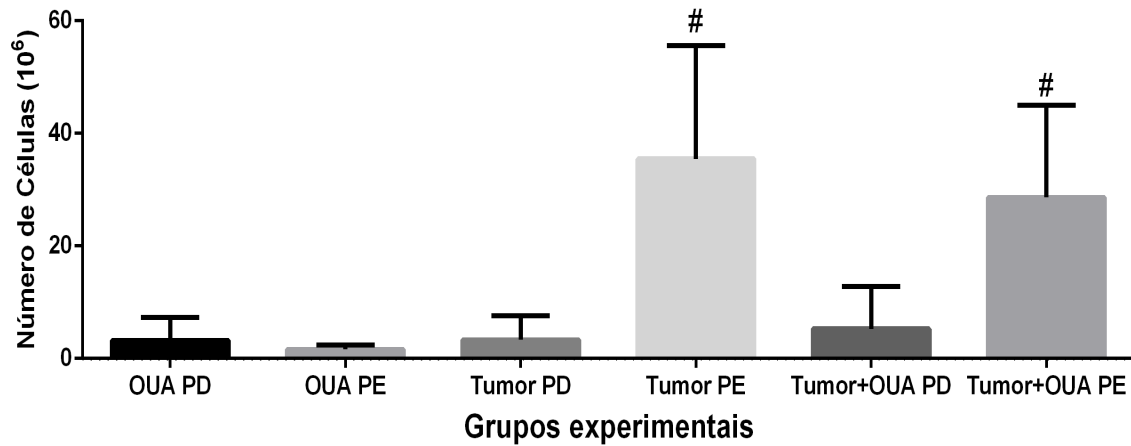
A redução de 48% observada entre o peso do órgão do grupo não tratado e o pré-tratado com a ouabaína demonstra, novamente, a influência deste hormônio sobre o modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich. Os linfonodos das patas controle (PD) e das patas do grupo apenas pré-tratado com ouabaína não apresentaram diferença significativa entre seus pesos.

5.1.4 Contagem de Células Totais

Os valores obtidos a partir da suspensão celular proveniente da maceração dos linfonodos poplíteos das patas com tumor não foram capazes de apontar mudanças significantes entre as patas esquerda do grupo Tumor e do grupo Tumor + OUA.

Também não foi possível observar mudanças significativas no número de células totais entre os linfonodos controle e o órgão da pata esquerda do grupo OUA.

Gráfico 4. Contagem celular dos linfonodos poplíteos após o processamento.



PE = Pata Esquerda; PD = Pata Direita. # ($p < 0,001$) quando comparado com a pata contralateral do grupo experimental.

5.1.5 Contagem Diferencial

A contagem diferencial de células a partir da suspensão obtida com a maceração do linfonodo poplíteo apresenta a predominância de linfócitos, seguido de macrófagos e neutrófilos e, nesta última, a porcentagem de células não foi superior a 1% nos grupos experimentais (tabela 1).

Tabela 1. Contagem diferencial das células obtidas a partir do linfonodo poplíteo.

	LINFÓCITO	MACRÓFAGO	NEUTRÓFILO
OUA PD	87 ± 4,2	12,7 ± 18,5	0,3 ± 0,5
OUA PE	98,3 ± 2,8	1,7 ± 2,8	0
TUMOR PD	76 ± 2,9	3,7 ± 2,6	0,3 ± 0,7
TUMOR PE	89,50 ± 6,3	9,9 ± 5,9	0,5 ± 0,6
TUMOR+OUA PD	93,6 ± 8,2	6,2 ± 8,2	0,2 ± 0,4
TUMOR+OUA PE	94,6 ± 4,2	5,2 ± 4,2	0,2 ± 0,44

PE = Pata Esquerda; PD = Pata Direita. Os resultados expressam a média do número de células (1×10^5) nos diferentes grupos experimentais.

Não foi possível constatar diferenças significativas entre os tipos celulares quando observados isoladamente em cada um dos grupos experimentais.

6 DISCUSSÃO

O tumor de Ehrlich é um carcinoma da glândula mamária de camundongos fêmea, espécie-específico, de comportamento agressivo e rápido crescimento. Tal linhagem é bastante utilizada na oncologia experimental, ramo da oncologia que utiliza tumores transplantáveis, mantidos em cultura celular ou através de passagens subsequentes em animais imunocompetentes, para análise da influência de carcinógenos químicos, físicos ou biológicos em diferentes aspectos atrelados ao desenvolvimento tumoral (PALERMO-NETO, 2003).

O desenvolvimento de neoplasias malignas e o processo inflamatório são eventos intimamente ligados. Inflamações crônicas tornam indivíduos susceptíveis a progressão de diferentes tumores (MANTOVANI et al, 2008; DIAKOS et al, 2014). Em paralelo, o surgimento do câncer consegue cooptar células da resposta imune inata para a liberação de moléculas sinalizadoras como citocinas e quimiocinas, capazes de promover mudanças na estrutura de tecidos, formação de novos vasos ou outros eventos que auxiliam na progressão tumoral (MANTOVANI, 2005).

Apesar da característica clássica de inibição da Na^+/K^+ ATPase, diversos eventos celulares e moleculares podem ser modulados por este hormônio, dentre eles a resposta imunológica (DE VASCONCELOS et al., 2011; ECHEVARRIA-LIMA; RUMJANEK, 2006; LEITE et al., 2015; RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2009, CAVALCANTE et al., 2017; GALVÃO et al., 2017; JACOB et al., 2013; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2006). Um trabalho anterior desenvolvido pelo nosso grupo demonstrou a capacidade da ouabaína em modular as células do sistema imune na cavidade peritoneal através da diminuição do número de neutrófilos e macrófagos, bem como o aumento de linfócitos, em modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich, apresentando, portanto, novas ideias sobre a influência da ouabaína em meio biológico (SALMERON, 2018).

A curva de crescimento do tumor, assim como o aumento do peso tumoral, são fatores interdependentes e que refletem a cinética de crescimento bem como a capacidade de desenvolvimento da linhagem. Estes dois parâmetros são os indicadores mais comumente utilizados para verificar a progressão de tumores sólidos (CONSTANTINO; SEROTINI; MATSUMOTO, 2017). De acordo com Dagli (1992), nas primeiras 48 horas, observa-se aumento da espessura das patas seguida de uma súbita diminuição, e só a partir deste intervalo, ocorre o crescimento

exponencial decorrente da inoculação do tumor. Este fenômeno resulta do estresse mecânico causado no momento da inoculação tumoral, que induz uma resposta inflamatória local (JUNIOR et al. 2007). Contudo, observamos que 24 horas após a inoculação, o inchaço resultante já havia se dissipado e espessura das patas estavam próximas ao nível normal. Portanto, os dados obtidos a partir da terceira medição, realizada no quinto dia de desenvolvimento tumoral, podem ser desvinculados do edema de pata e atribuídos ao crescimento do tumor sólido. O que corrobora tal afirmativa é que este comportamento foi observado também nas patas contra-laterais e na pata esquerda do grupo OUA, que receberam apenas solução salina (dados não mostrados) e mantiveram sua espessura estável nas medições subsequentes.

Diferente da forma ascítica, onde o pico de proliferação tumoral ocorre nos sétimos primeiros dias, o tumor sólido apresenta a potencialização do seu crescimento de forma mais tardia, a partir do sétimo dia. O provável motivo para tal diferença são as condições mais propícias ao crescimento do tumor no peritônio devido à maior oferta de espaço, de nutrientes e ausência de tensões. (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006).

Um trabalho anterior do nosso grupo apresentou a interferência negativa da ouabaína no modelo de desenvolvimento ascítico do tumor de Ehrlich em 3 dias de crescimento tumoral, sendo possível constatar a agressividade da linhagem através do aumento de aproximadamente quatro vezes no número de células na cavidade peritoneal em relação ao grupo saudável (SALMERON, 2018). No presente trabalho, apesar do crescimento ser observado desde o quinto dia, nossos resultados demonstram um pico de crescimento a partir do nono dia de inoculação do tumor, com a maior espessura da pata sendo observada no décimo terceiro dia. Estes dois resultados apontam para uma conformidade em relação ao comportamento das linhagens mantidas em nosso laboratório, característica importante quando se pensa em reprodutibilidade científica e comparação com outros achados descritos na literatura.

Constatamos que o pré-tratamento com a ouabaína foi capaz de reduzir o crescimento do tumor em comparação ao grupo não tratado, indicando a capacidade da ouabaína de interferir no desenvolvimento tumoral. Além disto, o peso do tumor, diretamente relacionado com a evolução tumoral, apresentou menores valores no grupo pré-tratado com a ouabaína por três dias consecutivos.

Há diversas lacunas no conhecimento relativo à diminuição do crescimento de tumores sólidos, no entanto, diversos estudos apontam a prostaglandina E2 como um fator associado ao crescimento tumoral (DONG et al., 2014; CONSTANTINO; SEROTINI; MATSUMOTO, 2017). Trabalhos utilizando o tumor de Ehrlich *in vivo* demonstram o aumento expressivo de PGE2 em diferentes condições experimentais (FECCHIO et al., 1990; DE-MATOS-GOMES et al, 2008; KANENO et al., 2004). Paralelamente, a ouabaína mostrou-se capaz de reduzir a formação do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos através da inibição de PGE2 e outros mediadores inflamatórios (DE VASCONCELOS et al, 2011). Desse modo, tem-se a possibilidade da ouabaína interferir no crescimento tumoral pela modulação moléculas ou vias atreladas a PGE2.

Utilizando modelos *in vitro*, diversos trabalhos apontam a capacidade da ouabaína de intervir no crescimento tumoral em diferentes linhagens celulares (WINNICKA et al., 2008; SIMPSON et al., 2009; RIGANTI et al, 2009). Entretanto, considerando que em baixas concentrações a ouabaína não é capaz de inibir a bomba de Na⁺/K⁺-ATPase e atendo-se apenas a resultados que utilizem a ouabaína nestas condições, é possível constatar que este glicosídeo é capaz de atenuar o crescimento tumoral principalmente por induzir vias apoptóticas (HARWOOD; YAQOUB, 2005; HUANG et al, 2004; KULIKOV et al, 2007) sugerindo portanto, uma alternativa para o que foi observado, além sugerir outras possibilidades de investigação para os resultados obtidos.

Os linfonodos são órgãos de disseminação linfática espontânea para esta linhagem tumoral e parece haver uma correlação entre a quantidade de células inoculadas no coxim plantar e as células presentes no linfonodo poplíteo. Adicionalmente, sabe-se que o tamanho do linfonodo está associado a metástases em humanos e camundongos. Durante a resposta imunológica, pode ocorrer aumento de tamanho e remodelamento do linfonodo em um evento denominado linfangiogênese, comumente presente em tumores sólidos decorrente da modificação da drenagem e aumento do fluxo linfático através destes linfonodos (HABENICHT et al., 2017).

Constatamos que os linfonodos poplíteos das patas esquerdas dos grupos cuja as células foram inoculadas no coxim plantar, apresentaram maior volume em relação as patas que receberam apenas solução salina. Além disto, o grupo pré-tratado com ouabaína apresentou redução significativa no peso do linfonodo em

comparação ao grupo não tratado. O aumento do peso observado pode estar atrelado à migração de células tumorais, as quais aumentam a estimulação de células linfoides. Conforme o esperado, as patas contra-lateral dos grupos Tumor e Tumor + Ouabaína, bem como as patas direita e esquerda do grupo Ouabaína apresentaram pesos semelhantes.

A partir da contagem celular total foi possível constatar o aumento do número de células nas patas inoculadas com o tumor de Ehrlich, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratado e não tratado com ouabaína. Esses dados sugerem que a redução do volume induzida pela ouabaína está associada à modificações na drenagem linfática do órgão. Esse dado está de acordo com trabalhos de nosso grupo, onde foi constatado a capacidade da ouabaína em reduzir a permeabilidade vascular e o edema (DE VASONCELOS et al, 2011; LEITE et al, 2015).

A contagem diferencial demonstrou a presença majoritária de linfócitos, seguido de macrófagos e raros neutrófilos em todos os grupos experimentais, sem alterações significativas entre os grupos. Em condições fisiológicas, a população predominante nos linfonodos são linfócitos maduros, entretanto, em resposta a estimulação antigênica, células do plasma podem ser encontradas no órgão em decorrência de mudanças estruturais encontradas no órgão.

7 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados observados, foi possível concluir que a ouabaína é capaz de modular negativamente o desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich por diminuir o crescimento tumoral e reduzir o peso do tumor e do linfonodo poplíteo. Observou-se também que esse hormônio não foi capaz de interferir nas patas contra-laterais dos grupos experimentais. Este trabalho apresenta novas perspectivas acerca do potencial antitumoral da ouabaína e expande as possibilidades de aplicação dessa molécula.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Anjali et al. Radiation induced oxidative stress: I. Studies in Ehrlich solid tumor in mice. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 223, n. 1-2, p. 71-80, 2001.

AIZMAN, Oleg et al. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13420-13424, 2001.

BABA, Alecsandru Ioan; CĂTOI, Cornel. **Comparative oncology**. Bucharest: Publishing House of the Romanian Academy, 2007.

BAGROV, A. Y.; KUZNETSOVA, E. A.; FEDOROVA, O. V. Endogenous digoxin-like factor in acute myocardial infarction. **Journal of internal medicine**, v. 235, n. 1, p. 63-67, 1994.

BAUER, N.; MÜLLER-EHMSSEN, J.; KRÄMER, U.; HAMBARCHIAN, N.; ZOBEL, C.; Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs - Effects of β -Blockade and AngiotensinConverting Enzyme Inhibition. **Hypertension**, pp. 1024-1028, 2005.

BAUER, Natali et al. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of β -blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 1024-1028, 2005.

BAYLIN, Stephen B.; JONES, Peter A. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726, 2011.

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

CARRY, Paul J.; PRESCOTT, David M.; OGILVIE, Gregory K. Resistance to Ehrlich ascites tumor in a strain of dystrophic mice. **Cancer research**, v. 39, n. 6 Part 1, p. 2139-2140, 1979.

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

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

CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim; SEROTINI, Bruno Henrique; MATSUMOTO, Mariza Akemi. Role of Meloxicam as a selective inhibitor of COX-2 in the inhibition of Ehrlich solid tumor growth. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 26, p. 295-299, 2017.

COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

DAGLI, Maria Lúcia Zaidan; GUERRA, José Luiz; SALDIVA, Paulo Hilário Nascimento. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 1992.

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

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

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

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

DONG, Xiaofeng et al. Meloxicam executes its antitumor effects against hepatocellular carcinoma in COX-2-dependent and-independent pathways. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. e92864, 2014.

DVELA, Moran et al. Endogenous ouabain regulates cell viability. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 2011.

FASTAIA, Joseph; DUMONT, Allan E. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 3, p. 547-550, 1976.

FERNANDES, Patrícia Dias et al. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 71, p. 83-89, 2015.

FERRANDI, M. et al. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 886-96, 1997.

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

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

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

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

GOTTLIEB, Stephen S. et al. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 86, n. 2, p. 420-425, 1992.

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

GREAVES, Mel. Evolutionary determinants of cancer. **Cancer discovery**, v. 5, n. 8, p. 806-820, 2015.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

HABENICHT, Lauren M. et al. Focus: Comparative Medicine: Tumor Regulation of Lymph Node Lymphatic Sinus Growth and Lymph Flow in Mice and in Humans. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 3, p. 403, 2017.o

HAMLIN, John M. et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 14, p. 6259-6263, 1991.

HAMLIN, John M.; HAMILTON, Bruce P.; MANUNTA, Paolo. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. **Journal of hypertension**, v. 14, n. 2, p. 151-167, 1996.

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

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

HARTVEIT, Flora. Sex differences in the intraperitoneal growth of Ehrlich's ascites carcinoma. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 25-32, 1963.

HARWOOD, Steven; YAQOUB, Muhammad M. Ouabain-induced cell signaling. **Front Biosci**, v. 10, p. 2011-2017, 2005.

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

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

INCA, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 23/03/2019.

INCA, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 23/03/2019.

JACOB, P. L. et al. Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania amazonensis*-infected Swiss mice. **Parasitology research**, v. 112, n. 3, p. 1313-1321, 2013

JUNIOR, D. Verçosa et al. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 1, 2007.

KANENO, Ramon et al. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 909-916, 2004.

KLEIN, George; KLEIN, Eva. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into an "ascites tumor". **Cancer Research**, v. 11, n. 6, p. 466-469, 1951.

KULIKOV, Andrey et al. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 7, p. 1691-1702, 2007.

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

LEITE, J. A. **Atividade imunomoduladora da ouabaína no processo inflamatório agudo**. 2012. 131 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012

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

LOEWENTHAL, Hans; JAHN, Gertrud. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 37, n. 1, p. 439-447, 1932.

MALZAHN, K. et al. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 433, n. 2, p. 119-129, 1998.

MANTOVANI, Alberto. Cancer: inflammation by remote control. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 752, 2005.

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

MATSUZAKI, Patrícia et al. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life sciences**, v. 74, n. 5, p. 573-579, 2003.

MCGRANAHAN, Nicholas; SWANTON, Charles. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 613-628, 2017.

MERTENS, Fredrik et al. The emerging complexity of gene fusions in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 6, p. 371, 2015.

OMS, 2019. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>. Acesso em: 15/03/2019.

OMS, 2019. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 15/03/2019.

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

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

PAGES, F. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, n. 8, p. 1093, 2010.

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

PAMNANI, M. B. et al. Studies on the role os humoral sodium-transport inhibitor and the anteroventral third ventricle (AV3V) in experimental low-renin hypertension. **Clinical science**, v. 61, n. s7, p. 57s-60s, 1981.

PRASAD, Sahdeo; RAVINDRAN, Jayaraj; AGGARWAL, Bharat B. NF- κ B and cancer: how intimate is this relationship. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 336, n. 1-2, p. 25-37, 2010.

RIGANTI, Chiara et al. Digoxin and ouabain induce P-glycoprotein by activating calmodulin kinase II and hypoxia-inducible factor-1 α in human colon cancer cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 240, n. 3, p. 385-392, 2009.

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

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

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

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

SALMERON, AMANDA COSTA AYRES. **ANÁLISE DO PRÉ-TRATAMENTO COM OUABAÍNA NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, 2018.

SCHONER, W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 108, n. 7, p. 449-54, 2000.

SCHÖNFELD, Werner et al. The lead structure in cardiac glycosides is 5 β , 14 β -androstane-3 β , 14-diol. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 329, n. 4, p. 414-426, 1985.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G. A.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 58, n. 4, p. 658-61, 2006.)

SIMPSON, Craig D. et al. Inhibition of the sodium potassium adenosine triphosphatase pump sensitizes cancer cells to anoikis and prevents distant tumor formation. **Cancer research**, v. 69, n. 7, p. 2739-2747, 2009.

SNAEBJORNSSON, Marteinn Thor; SCHULZE, Almut. Tumours use a metabolic twist to make lipids. **Nature**, 2019.

SYMCHYCH, T. V. et al. Anticancer effect and immunologic response to xenogeneic embryonic proteins in mice bearing Ehrlich solid carcinoma. **Experimental oncology**, 2017.

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

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

UNDERWOOD, J. C. Lymphoreticular infiltration in human tumours: prognostic and biological implications: a review. **British journal of cancer**, v. 30, n. 6, p. 538, 1974.

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

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

WILKINS, M.R.; KENDALL, M.J.; WADE, O.L. Regular Review William Withering an digitalis. **British Medical Journal**, pp. 7-8, 1785.

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

ZITVOGEL, Laurence et al. Microbiome and anticancer immunosurveillance. **Cell**, v. 165, n. 2, p. 276-287, 2016.

ANEXO A - CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Resistência a Múltiplas drogas em células tumorais – Estudo colaborativo para investigar o fenótipo e a sensibilidade de agentes quimioterápicos com diferentes alvos celulares”, protocolo nº 093/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Marcia Regina Piuvezam – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 19/04/2017.

Vigência do Projeto	2016 - 2018
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Número de animais	188 animais
Idade/peso	6 - 8 semanas (25-30g)
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Prof. Dra. Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB