



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA COSTA AYRES SALMERON

**ANÁLISE DO PRÉ-TRATAMENTO COM OUABAÍNA NOS PARÂMETROS
INFLAMATÓRIOS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

JOÃO PESSOA

2018

AMANDA COSTA AYRES SALMERON

**ANÁLISE DO PRÉ-TRATAMENTO COM OUABAÍNA NOS PARÂMETROS
INFLAMATÓRIOS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Biotecnologia do
Centro de Biotecnologia da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Dra Sandra Rodrigues Mascarenhas

Co-orientadora:

Profa. Dra Márcia Regina Piuvezam

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S171a Salmeron, Amanda Costa Ayres.

Análise do pré-tratamento com ouabaína nos parâmetros inflamatórios do tumor ascítico de Ehrlich / Amanda Costa Ayres Salmeron. - João Pessoa, 2018.

57 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: Márcia Regina Piuvezam.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. ouabaína; tumor de Ehrlich; inflamação. I. Rodrigues Mascarenhas, Sandra. II. Regina Piuvezam, Márcia. III. Título.

UFPB/BC



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

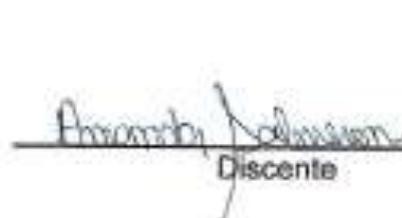


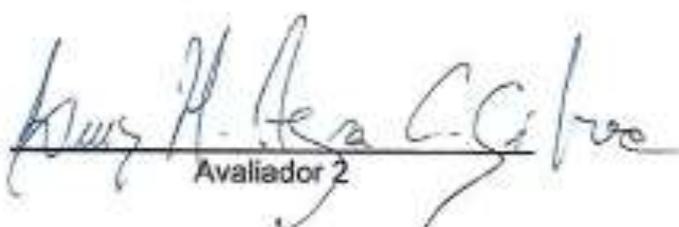
ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos sete dias do mês de junho de 2018, às 10:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas e composta pelos avaliadores 1. Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam (CCS/UFPB); 2. Mestre Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva (PgPNSB/UFPB), a discente Amanda Costa Ayres Salmeron, matrícula 11312884, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Análise do pré-tratamento com ouabaina nos parâmetros inflamatórios de tumor ascítico 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, Sandra Rodrigues Mascarenhas, 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, 07 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Escrevendo os agradecimentos do meu Trabalho de Conclusão de Curso, percebi o quanto as coisas mudaram durante esses cinco anos de graduação. Quantas pessoas passaram, quantas pessoas ficaram, quantas pessoas levaram um pouco e me deixaram muito. Esses cinco anos de amadurecimento, autoconhecimento, e desenvolvimento acadêmico, só foram possíveis por sempre ter tido pessoas maravilhosas ao meu lado, que me incentivaram, me mostraram novos caminhos, novas ideias, e que me apresentaram à ciência. Que fizeram eu me apaixonar pelo meu curso, pela vida dentro dos laboratórios, que me ensinaram a ter persistência, e que acima de tudo, tiveram paciência durante os momentos difíceis, durante as dúvidas e incertezas.

Gostaria de agradecer à Universidade Federal da Paraíba e todos os funcionários da instituição, por proporcionar a oportunidade de vislumbrar novos caminhos após essa graduação. A universidade é um local que tem a capacidade de mudar a realidade das pessoas, de mostrar coisas novas e diferentes, e somente através da educação que poderemos buscar novos rumos, não apenas para nossas próprias vidas, mas para o País e Mundo que almejamos.

À minha orientadora Sandra Mascarenhas, uma das pessoas mais brilhantes que já conheci, por toda a paciência, compreensão, e orientação durante esses anos. Trabalhar ao seu lado foi um prazer enorme. Admiro muito sua forma de fazer ciência, de orientar os alunos e de viver a vida. Aprendi muito com você.

À minha co-orientadora Márcia Piuvezam, obrigada por ter me acolhido no Laboratório de Imunofarmacologia, por todas as conversas e incentivos, pela atenção, carinho e orientação. Sinto uma gratidão enorme por ter encontrado pessoas tão maravilhosas no meu caminho.

À minha banca examinadora, pois mais do que examinadores, vocês fizeram parte dessa pesquisa desde o começo. Agradeço a paciência e disponibilidade por estarem contribuindo mais uma vez para o meu desenvolvimento e para o desenvolvimento do meu trabalho. É um privilégio muito grande ter vocês na banca.

Aos meus queridos professores, meu eterno obrigada! Foram vocês os responsáveis pela minha paixão pela ciência. Foi observando vocês, de que eu tive a certeza do que queria fazer pelo resto da minha vida. Foi com vocês que aprendi o amor pelo laboratório, aprendi que passaria muitos finais de semana e feriados na universidade, foram vocês que me

ensinaram compromisso, pontualidade e a resolver o problema que tinha que ser resolvido. Vocês sempre foram meus exemplos, e tenho o maior orgulho de dizer isso. Talvez no meio de tantos alunos, e com tantas coisas para resolver, vocês não se deem conta do quanto vocês nos influenciam. Pelo menos em mim, as influências foram as melhores possíveis.

Não poderia deixar de agradecer especialmente à Professora Tat, minha primeira orientadora, que apostou em uma menina de 19 anos, do segundo período e que me ensinou muito do que eu sei hoje, me ensinou até a fazer cultura em caixa de isopor. Muito obrigada por ter acreditado em mim, até quando eu não acreditava.

Muito obrigada à equipe do Laboratório de Imunobiologia, uma equipe unida, amiga, sempre disposta a ajudar, proporcionando um ambiente onde pude explorar ao máximo o meu potencial. Gabriel e Bia, minha dupla preferida de trabalho, meus amigos, companheiros de lab e de vida, vocês merecem muito mais do que apenas um agradecimento, sem vocês, nada disso teria acontecido. Obrigada por me aguentarem esses anos, terem paciência durante meus surtos, nos experimentos de manhã (por causa do meu mau humor matinal) e por sempre me manterem alimentada (porque eu sempre estou com fome). Vocês são duas pessoas incríveis, com um potencial gigantesco, e eu fico muito grata por ter participado, um pouco que seja, do crescimento acadêmico de vocês.

Minha mãe rainha, maravilhosa, sempre me encorajando a buscar coisas novas, afinal, o mundo é meu, não é mesmo? Eu sei que esse é apenas mais um ciclo, de muitos dos quais passei, e dos quais ainda vou passar, mas obrigada por estar presente em todos eles, sempre tendo paciência, e tentando entender minhas escolhas. Você é mais que minha mãe, é minha melhor amiga, e ainda vem muita coisa pela frente, mas sempre estaremos juntas. Sei o quanto você se sente orgulhosa por essa minha conquista, e você é uma porcentagem enorme nisso tudo. Te amo muito.

Obrigada ao meu Gui, que não é acadêmico, mas que veio recheiar minha vida de amor, e que veio me ensinar a viver por dois, a ser mais simpática e menos egoísta. Eu não poderia ter um irmão melhor, mais companheiro e amigo, do que você. Se fosse possível, daria minha vida pela sua, porque nada me deixa mais feliz do que a sua felicidade. Torço sempre pelo seu sucesso. Te amo.

Meu agradecimento aos meus avós, meus ídolos, meus maiores exemplos de vida, de amor, de integridade, de respeito, de amor pela profissão, como sou sortuda por ter tido vocês na minha vida. Minha avó, obrigada por estar sempre ao meu lado, sempre vibrando a cada nova conquista. Meu avô, a pessoa com um dos melhores corações que eu já conheci, espero

que você esteja comemorando por ai também, mas por aqui, vai faltar você para dançar a valsa comigo. Amo vocês infinitamente.

Mille, obrigada por entrar na minha vida. Você me faz acreditar em um mundo melhor e me dá coragem de persistir nos meus sonhos. Obrigada por ser sempre minha companheira, por me fazer querer ser alguém melhor, me mostrar tantas novidades e possibilidades e por me fazer tão feliz.

Obrigada aos meus amigos, aos que estão perto e aos que estão longe também, acompanhando minha jornada, vocês fizeram esses anos mais leves. Meu agradecimento especial à Júlia, minha amiga do coração, pelos hambúrgueres, pelas praias, pelas conversas nos finais de semana, e por ter sido sempre minha amiga fiel. Ainda bem que a gente tem a gente.

Muito obrigada a todos que participaram diretamente ou indiretamente durante esses anos de graduação, hoje eu tenho a certeza ainda maior, que não existe nada que possamos fazer sozinhos, e ter vocês ao meu lado, foi essencial para os meus resultados. Apenas gratidão por estar cercada por pessoas tão queridas!

“Para que o mal triunfe, basta que os bons não façam nada” (Edmund Burke).

RESUMO

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário que acontece espontaneamente em camundongos, apresenta comportamento agressivo e afeta a resposta inflamatória. Inoculado na cavidade peritoneal de camundongos, o tumor de Ehrlich cresce de forma ascítica. A ouabaina (OUA), um potente inibidor da Na^+/K^+ ATPase, foi identificado como uma substância endógena e embora o papel fisiológico da OUA não tenha sido totalmente elucidado, foi demonstrado que pode afetar vários aspectos da resposta inflamatória. No entanto, o possível papel da ouabaína no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich não foi abordado anteriormente. Diante disso, o objetivo do trabalho foi investigar os efeitos da OUA nos parâmetros inflamatórios no modelo de tumor ascítico de Ehrlich. Foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas. Primeiramente foi realizado um curva de crescimento *in vivo* para entender o desenvolvimento desse tipo de tumor e posteriormente, os animais foram divididos em quatro grupos: saudável (n = 6), tumor (n = 6), cisplatina (n = 5) e OUA (n = 14). O pré-tratamento com OUA (0,56 mg/kg i.p.) foi realizado durante três dias. No terceiro dia, 1h após o último tratamento, as células tumorais de Ehrlich (1×10^5 i.p.) foram injetadas. Os animais foram pesados diariamente durante todo o procedimento de pré-tratamento e também durante as 72h de desenvolvimento do tumor, após esse período, foram anestesiados com uma injeção intramuscular de solução de ketamina/xilazina e eutanasiados por deslocamento cervical. O lavado peritoneal foi coletado para contagem de células totais e diferenciais. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi observado que após a inoculação de 10^5 células de Ehrlich o número de células totais aumentou cerca de quatro vezes como consequência do desenvolvimento tumoral e o pré-tratamento com cisplatina reduziu o número de células totais (57,1%) assim como a ouabaína (46%), quando comparado ao grupo tumoral. Além disso, observou-se que o pré-tratamento com ouabaína reduziu o número de neutrófilos (81%) e aumentou a quantidade de linfócitos (182,17%), sugerindo um novo modo de ação desta substância. A ouabaína também foi capaz de reduzir o peso corporal (8,1%) dos animais em relação ao grupo tumoral. O significado biológico desses resultados na evolução do tumor está em investigação e traz novas idéias sobre o papel fisiopatológico da ouabaína.

Palavras-chave: ouabaína; tumor de Ehrlich; inflamação.

ABSTRACT

Ehrlich tumor is a breast adenocarcinoma with aggressive behavior that affects the inflammatory response. Inoculated in the peritoneal cavity of mice, Ehrlich's tumor grows in the ascitic form. ouabain (OUA), a potent Na⁺/K⁺ ATPase inhibitor, has been identified as an endogenous substance and although the physiological role of the OUA has not been fully elucidated, it has been shown that it can affect several aspects of the inflammatory response. However, the possible role of ouabain in the development of Ehrlich ascites tumor has not been previously discussed. The objective of this work was to investigate the effects of OUA on inflammatory parameters in the Ehrlich ascitic tumor model. Swiss albino mice females, were used. The animals were divided into four groups: healthy (n = 6), tumor (n = 6), cisplatin (n = 5) and OUA (n = 14). Pre-treatment with OUA (0.56 mg / kg i.p.) was performed for three days. On the third day, 1h after the last treatment, Ehrlich tumor cells (1x10⁵ i.p.) were injected. The animals were weighed daily throughout the pre-treatment procedure and also during the 72 hours of tumor development, after that period the animals were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine/xylazine solution and euthanized by cervical dislocation. Peritoneal fluid was collected for total and differential cell counts. The differences between the experimental groups were compared by analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test (p <0.05). It was found that after inoculation of 10⁵ Ehrlich cells, the total number of cells increased about four-fold as a consequence of tumor development. Pre-treatment with cisplatin reduced the number of total cells (57,1%) as well as ouabain (46%) when compared to the tumor group. It was observed that pre-treatment with ouabain reduced the number of neutrophils (81%) and increased the amount of lymphocytes (182,17%), suggesting a new mode of action of this substance. Ouabain was also able to reduce body weight (8,1%) of the animals relative to the tumor group. The biological significance of these results in tumor evolution is now under investigation and brings new insight into the physiopathological role of the ouabain.

Keywords: ouabain; Ehrlich's tumor; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estrutura química da cisplatina | 18 |
| Figura 2. Estrutura química da ouabaína | 23 |
| Figura 3. Esquema do protocolo de pré-tratamento com a ouabaína..... | 29 |
| Figura 4. Peso dos animais durante a curva de crescimento..... | 30 |
| Figura 5. Volume do tumor analisado durante cada ponto da curva de crescimento. | 31 |
| Figura 6. Comparação do peritônio de um animal saudável e um animal com 19 dias de desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich. | 32 |
| Figura 7. Peso do tumor durante a curva de crescimento. | 33 |
| Figura 8. Circunferência peritoneal dos animais durante a curva de crescimento. | 34 |
| Figura 9. Animal do décimo quinto dia da curva de crescimento antes da eutanásia. | 34 |
| Figura 10. Contagem de células vivas em cada ponto analisado da curva de crescimento. | 35 |
| Figura 11. Contagem de células mortas em cada ponto analisado da curva de crescimento.. | 36 |
| Figura 12. Análise do peso dos animais no pré-tratamento com ouabaína..... | 37 |
| Figura 13. Contagem de células vivas no pré-tratamento com ouabaína. | 38 |
| Figura 14. Contagem diferencial das células no pré-tratamento com ouabaína. | 39 |

Figura 15. Micrografia das células coradas com o kit panótico para contagem diferencial de células com a objetiva de 100X.40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

ACTH: hormônio adrenocorticotrópico

ANG II: angiotensina II

CD: *cluster of differentiation*

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CIS: cisplatina

DNA: ácido desoxirribonucleico

IL: interleucina

M1: macrófagos clássicos

M2: macrófagos alternativos

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

n: número de animais

Na⁺/K⁺ ATPase: sódio-potássio ATPase

OUA: ouabaína

NFATc1: fator nuclear de ativação de células T c1

PBS: tampão salina fosfato

Pol II: polimerase II

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

TAE: tumor ascítico de Ehrlich

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

i.m.: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1. Aspectos gerais do câncer | 17 |
| 2.2. Papel da inflamação no desenvolvimento do tumor..... | 19 |
| 2.3. Ouabaína..... | 21 |
| 3. OBJETIVOS | 24 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 24 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 24 |
| 4. METODOLOGIA | 25 |
| 4.1. Animais | 25 |
| 4.2. Eutanásia | 25 |
| 4.3. Manutenção das células <i>in vivo</i> | 25 |
| 4.4. Indução do tumor ascítico de Ehrlich para experimentação <i>in vivo</i> | 26 |
| 4.5. Coleta do lavado peritoneal..... | 26 |
| 4.6. Análise dos parâmetros inflamatórios | 26 |
| 4.6.1. Contagem total e diferencial de células | 26 |
| 4.6.2. Análise do desenvolvimento tumoral | 27 |
| 4.7. Curva de crescimento <i>in vivo</i> | 27 |
| 4.8. Pré-tratamento com ouabaína..... | 28 |
| 4.9. Análise estatística..... | 29 |
| 5. RESULTADOS..... | 30 |
| 5.1. Curva de crescimento <i>in vivo</i> | 30 |
| 5.1.1. Peso dos animais..... | 30 |
| 5.1.2. Volume do tumor..... | 31 |
| 5.1.3. Peso do tumor | 32 |
| 5.1.4. Circunferência | 33 |
| 5.1.5. Contagem de células totais | 35 |
| 5.2. Pré-tratamento com ouabaína..... | 36 |
| 5.2.1. Peso dos animais..... | 36 |
| 5.2.2. Contagem de células viáveis..... | 37 |
| 5.2.3. Contagem diferencial de células | 38 |

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 6. DISCUSSÃO | 41 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 45 |
| REFERÊNCIAS..... | 46 |
| ANEXO A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) | |
| ANEXO B – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO EM SIMPÓSIO | |

1. INTRODUÇÃO

O câncer é atualmente responsável por uma em cada seis mortes no mundo. Mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos, e as previsões são que 21 milhões de pessoas desenvolvam a doença em 2030 (NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL, 2017).

As pesquisas em busca de novos fármacos antineoplásicos cresceram nos últimos vinte anos, assim como a busca por novas técnicas para o estudo de tumores. Um exemplo são os tumores experimentais em animais, que auxiliam as pesquisas na área da oncologia. Devido a sua facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich (TAE) tem sido extensamente utilizado na oncologia experimental, dedicado ao desenvolvimento dos chamados tumores transplantáveis (EHRlich, 1906; BHATTACHARYYA et al., 2003; RIZZO, 2000).

O tumor de Ehrlich foi descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Esse tumor pode se desenvolver tanto na forma sólida, quando as células são injetadas via subcutânea ou no coxim plantar, como na forma ascítica, quando as células são injetadas no peritônio dos animais (EHRlich, 1906; RIZZO, 2000).

Atualmente existem várias medidas em relação ao tratamento do câncer, como a inibição ou reversão da carcinogênese, que pode acontecer por administração de uma ou mais substâncias químicas, por exemplo, uma substância isolada bastante utilizada no tratamento do câncer na clínica é a cisplatina (CIS) (BHATTACHARYYA et al., 2003). Mesmo com os avanços tecnológicos, a quimioterapia antineoplásica ainda é bastante limitada, principalmente pela falta de especificidade dos agentes quimioterápicos convencionais, ou seja, sua falta de predileção pelos tecidos tumorais, que geralmente provoca diversos efeitos colaterais indesejados e em alguns casos o desenvolvimento de células tumorais resistentes à múltiplas drogas (ALAPATI et al., 2012).

O estudo dos produtos naturais revelou diversas propriedades farmacológicas, que podem ser aplicadas na clínica. Um exemplo de produto de origem natural usado atualmente é a vincristina, e outros compostos de origem marinha. Hoje em dia, aproximadamente 60% das drogas aprovadas para o tratamento de câncer são de origem natural (DYKEWICZ et al., 1998).

O microambiente inflamatório do tumor é considerado uma característica do câncer. A ouabaína (OUA), um esteroide cardiotônico que foi extraída primeiramente da semente

madura de *Strophanthusgratus* e *Strophanthuskombé* e das cascas de uma planta chamada *Acokanthera ouabaio* (BLAUSTEIN, 1993) apresenta um papel imunomodulador em diferentes modelos de inflamação (TAKADA et al., 2009; DE VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2012; LEITE, 2012; LEITE et al., 2015).

Em 1991, foi descoberto que a ouabaína é um hormônio, sendo estruturalmente, biologicamente e imunologicamente, indistinguível da ouabaína obtida a partir de vegetais (HAMLYN et al., 1991). Estudos mostram que a ouabaína endógena é produzida pela adrenal, hipotálamo e hipófise (HAMLYN et al., 1991; LAREDO & HAMILTON; 1994; FERRANDI et al., 1997) e que pode ser secretada em resposta a diferentes estímulos, como o aumento da concentração plasmática de sódio seguido por expansão aguda de volume (WARDENER et al., 1961; BLAUSTEIN, 1993; GOTO et al., 1998), estimulação adrenérgica e ação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e da angiotensina II (ANG II) (LAREDO et al., 1995; LAREDO et al., 1997; SHAH et al., 1999; BAUER et al., 2005).

Dessa forma, esse trabalho visa investigar o papel imunomodulador da ouabaína no modelo murino de tumor ascítico de Ehrlich.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais do câncer

O câncer é caracterizado pelo crescimento de células desordenado, com a capacidade de entrar em metástase e interferir na função dos órgãos afetados (INCA, 2015). O desenvolvimento do tumor é um conjunto de vários passos complexos, nos quais as células vão adquirindo um fenótipo neoplásico de maneira progressiva. Além disso, a região em que essas células neoplásicas se desenvolvem, tem a capacidade de produzir novos vasos, chamado de angiogênese, o que garante a nutrição dessas células, e permite que o tumor possa continuar crescendo (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente no mundo e com maior incidência nas mulheres (FERLAY et al., 2010). Na tentativa de minimizar os efeitos adversos que são frequentes nos tratamentos convencionais, foi iniciada uma busca por terapias alternativas no combate ao câncer (JACONODINO; AMESTOY; THOFEHRN, 2008). Dessa forma, a busca por produtos naturais que tivessem essa finalidade, se intensificou, visto que hoje em dia diversos produtos medicinais e medicamentos que são usados na clínica foram obtidos de fontes naturais (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

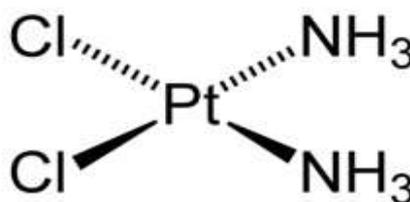
Devido à versatilidade das células tumorais em desenvolver estratégias de sobrevivência, como instabilidade genômica, capacidade de produzir fatores de crescimento e reprogramação de sua energia metabólica permitindo sua sobrevivência e proliferação, atualmente, os estudos sobre as novas terapias visam conhecer melhor as vias de sinalização que influenciam no desenvolvimento tumoral (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ et al., 2015).

O tumor transplantável de Ehrlich em camundongos foi descrito por Paul Ehrlich em 1906 (RIZZO, 2000). Foi originado de um carcinoma espontâneo de glândula mamária, e vem sendo utilizado amplamente para diversos estudos na área da oncologia experimental (MATSUZAKI, 2003). Assim como outros tumores transplantáveis, esse modelo é muito útil, uma vez que é possível determinar a concentração do número de células neoplásicas a serem inoculadas e também quantificar o crescimento e a regressão da massa tumoral, podendo desenvolvê-lo sob a forma ascítica (quando as células são injetadas via intraperitoneal) e sólida (quando as células são injetadas de forma subcutânea ou no coxim plantar) (EHRlich, 1906).

Esse tumor corresponde a um carcinoma de comportamento agressivo, crescimento rápido, induz a mielossupressão em camundongos e afeta a resposta inflamatória (SANTOS et al., 2016). As células do tumor de Ehrlich são um modelo bastante utilizado para a análise dos efeitos de drogas, agentes ambientais, dentre outros na proliferação de células cancerígenas (BROZOVIC et al., 2009; LI et al., 2009, PESSINA et al., 1980 e SEGURA et al., 2000). Estudos anteriores mostraram que o diazepam, por exemplo, foi capaz de aumentar o crescimento do tumor de Ehrlich. Este aumento ainda foi relacionado com um pequeno número de leucócitos peritoneais recuperados após a injeção do tumor de Ehrlich (SAKAI et al., 2006).

Por outro lado, a cisplatina, composto cis-diaminodichloroplatina (II) (Figura 1), é uma droga comumente utilizada como agente antineoplásico para diferentes tipos de tumores. Foi descoberta na década de 60 e resultou em um importante avanço no combate a vários cânceres, como o de mama, pulmão, cabeça e pescoço, ovário e testículo. Seu mecanismo de atuação está relacionado à interação da cisplatina com o DNA da célula, inibindo a replicação de DNA e como consequência causa morte celular por apoptose (JAMIESON; LIPPARD, 1999). No entanto, existem algumas limitações no uso da cisplatina, como por exemplo, seu pequeno espectro de atividade, surgimento de resistência celular, sua baixa solubilidade em água, além de causar diversos efeitos colaterais, ao sistema nervoso, renal e ao trato intestinal, que se manifestam através de náuseas e vômitos intensos (FONTES, ALMEIDA, NADER, 1997; HAMBLEY, 1997).

Figura 1. Estrutura química da cisplatina



Fonte: FONTES, ALMEIDA, NADER, 1997.

2.2. Papel da inflamação no desenvolvimento do tumor

A imunologia é uma área da ciência que busca compreender as respostas e mecanismos utilizados pelo sistema imunológico capaz de manter a homeostase de um organismo. O sistema imunológico é composto por células, moléculas e tecidos, que para manter a homeostase, também atua na prevenção ou combate de infecções por antígenos não próprios. Todos os organismos, quando entram em contato com diferentes agentes infecciosos, desencadeiam uma vasta variabilidade de respostas imunes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Células do sistema imunológico possuem diferentes efeitos sobre as células tumorais, exercendo um papel dual no desenvolvimento do tumor. Como por exemplo, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, pode estar envolvido na angiogênese do tumor, mas também pode tentar debelar células com a expressão de antígenos associados a tumores (VISSER et al., 2006).

O ambiente tumoral é um microambiente inflamado, devido o crescimento desordenado das células e a resposta do sistema imunológico para debelar o tumor. A inflamação é a resposta do organismo ao tentar restaurar sua homeostase, e se dar por diferentes formas e mecanismos de indução, regulação e resolução, e consiste em uma resposta biológica complexa. O processo inflamatório foi inicialmente caracterizado pela presença de cinco sinais cardinais: calor, rubor, dor, edema e perda de função e pode ocorrer em dois estágios: inflamação aguda e inflamação crônica. A inflamação aguda consiste na resposta inflamatória inicial, de curta duração e resulta da ativação da imunidade inata; se a inflamação continuar por um longo período de tempo instala-se a inflamação crônica (AGGARWAL et al., 2006).

A inflamação crônica está associada a várias patologias, como doenças cardiovasculares e diabetes, assim como é uma condição promotora tumoral, através do estímulo à proliferação celular (AGGARWAL et al., 2006). Estudos epidemiológicos em seres humanos e estudos moleculares realizados em ratos modificados geneticamente sugerem que os tumores surgem frequentemente em locais de inflamação crônica e que células inflamatórias estão presentes em biópsias tumorais (AGGARWAL et al., 2006). A inflamação aguda também se caracteriza por uma resposta vascular com recrutamento de leucócitos, como por exemplo neutrófilos, que podem ativar linfócitos ou monócitos, que se diferenciam em macrófagos localmente (KARIN; LAWRENCE; NIZET, 2006).

O nível de linfócitos pode ser um marcador prognóstico da agressividade do tumor, uma vez que isso pode ser um indicador de um sistema imunológico suprimido. Foi observado que níveis mais baixos de linfócitos foram associados com um maior grau de desenvolvimento tumoral e formação de metástases (COFFELT et al., 2015).

Macrófagos são derivados a partir de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e possuem um papel central na fagocitose (DRIESSCHE et al., 2013). Existem dois fenótipos de macrófagos, os chamados "M1" ou clássicos, que estão associados com a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α); e os conhecidos como "M2" ou alternativo, que possuem caráter anti-inflamatório, como a secreção de citocinas como a interleucina-10 (IL-10) (RAWJI; YONG, 2013). Tem sido demonstrado que o microambiente tumoral polariza os macrófagos associados ao tumor em direção a um fenótipo pró-tumoral (M2) versus um fenótipo antitumoral (M1) (FRIDLENDER, 2009).

Os neutrófilos associados aos tumores podem polarizar para um fenótipo N1 (anti-tumoral) ou para um fenótipo N2 (pró-tumoral). As atividades anti-tumorais do fenótipo N1 incluem a expressão de citocinas e quimiocinas mais imuno-ativantes, níveis mais baixos de arginase e maior capacidade de matar células tumorais. No entanto, estudos recentes descrevem que a mobilização de neutrófilos do sangue periférico para o microambiente tumoral está mais relacionada à polarização desta célula para o fenótipo N2, relacionando a depleção dos polimorfos em modelos experimentais à redução no número de metástases, sem o auxílio do foco neoplásico primário (GALDIERO et al., 2013; ANDZINSKI et al., 2016; GABRILOVICH, OSTRAND-ROSENBERG, BRONTE, 2012; ERUSLANOV et al., 2014).

A complexa interação entre células tumorais e a resposta imune do hospedeiro tem grande importância no desenvolvimento de diferentes tumores, como por exemplo, o câncer de mama. Ou seja, muitos tumores tem a capacidade de alterar e controlar o microambiente, de forma a interferir na resposta imune do hospedeiro e promover uma estratégia de sobrevivência (MADERA et al., 2015).

Entender o desenvolvimento da inflamação que ocorre durante a evolução do tumor e buscar novas substâncias que possam alterar os parâmetros inflamatórios, como migração celular e número de células viáveis, pode ser uma forma de retardar o crescimento tumoral, e dessa forma, aumentar a expectativa de vida do paciente, possibilitando uma janela de tempo maior para o tratamento.

2.3. Ouabaína

Os glicosídeos cardíacos constituem um grupo de produtos naturais que apresentam uma grande diversidade estrutural, no entanto, todos possuem um núcleo esteroidal em sua estrutura, que é considerado o grupo farmacofórico responsável pela atividade desses compostos (SCHONFELD et al., 1985). Historicamente, o uso de glicosídeos foi iniciado em 1775 por Willian Withering, o qual utilizou o extrato da dedaleira (*Digitallis purpurea*), para o tratamento da insuficiência cardíaca. A partir desse momento houve a introdução desses glicosídeos cardíacos no contexto da insuficiência cardíaca (WILKINS, 1785).

Dentre os vários glicosídeos, a ouabaína (Figura 2) foi identificada como um hormônio por Hamlyn, em 1991. Em 1960, foi descoberto que a ouabaína atua semelhantemente aos outros glicosídeos, inibindo a atividade da Na^+/K^+ ATPase. Estudos demonstram que a produção de ouabaína pode ser alterada de acordo com o estado fisiológico em que se encontra o organismo. E também se sabe que o exercício físico é capaz de aumentar os níveis de ouabaína em ratos, cachorros e seres humanos alguns minutos após o início da atividade física (GOTO et al., 1995; BAUER et al., 2005).

Embora o papel fisiológico da ouabaína ainda não tenha sido totalmente esclarecido, diversos estudos mostram que esse hormônio participa da resposta do organismo ao estresse agudo, regulado pela secreção de norepinefrina e angiotensina (GOTO, et al., 1992; BAUER, et al., 2005), pode funcionar como um hormônio natriurético (BLAUSTEIN,1993; FERRANDI, et al., 1997), possui papel importante no crescimento, diferenciação e morte celular por apoptose (HUANG, et al., 1997; KOMETIANI,et al., 1998; ISAEV, et al., 2000), tem ação neuromoduladora no sistema nervoso central, estimulando a atividade neuronal simpática em ratos (DE WARDENER, 2001), tem sido relacionada à distúrbios psíquicos como o distúrbio bipolar, uma vez que a injeção intracerebral dessa substância em ratos aumenta a expressão da isoforma α -2 da Na^+/K^+ ATPase no ganglio basal e α -3 em neurônios do córtex pré-frontal (HAMID, et al., 2009), é capaz de ativar diferentes vias de sinalização e tem papel imunomodulador (ECHEVARIA-LIMA, 2006; RODRIGUES-MASCARENHAS, et al., 2009).

Em testes *in vitro*, a ouabaína induziu o aumento de apoptose nos linfócitos B e inibiu a proliferação dos mesmos em resposta ao LPS. *In vivo*, o tratamento com ouabaína induziu aumento das células B nos linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c. As demais

populações de linfócitos B, como as B regulatórias e B1 do baço não foram afetadas, assim como as células B1 do peritônio (SILVA, 2013). Em contraste, trabalhos recentes mostram que a ouabaína diminui o número total de células da medula óssea, como reflexo da diminuição de células B maduras. Diminuição esta, que se repete no sangue periférico e no baço e provavelmente resulta do sinergismo da ouabaína com glicocorticoides, o que impede a maturação das células B (DE PAIVA et al., 2011). A modulação dos níveis de citocinas na presença de ouabaína pode afetar a produção de células progenitoras de maneira dose-dependente (SPIVAK et al, 1980).

Nosso grupo tem demonstrado que a ouabaína pode agir modulando diversos aspectos da resposta imunológica (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2009; CAVALCANTE et al, 2017). Alguns trabalhos mostraram que a ouabaína interfere na resposta inflamatória aguda induzida por diferentes agentes flogísticos (DE VASCONCELOS et al., 2011; LEITE, 2012; LEITE et al., 2015). Assim como também foi capaz de interferir no perfil inflamatório característico de modelos experimentais de leishmaniose desencadeados pela *Leishmania amazonensis*. Os animais tratados com ouabaína apresentaram redução de células na cavidade peritoneal devido à inibição da migração de neutrófilos induzida pelo protozoário. Também foi observado que na presença de ouabaína houve redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IFN- γ nos animais infectados (JACOB et al., 2012).

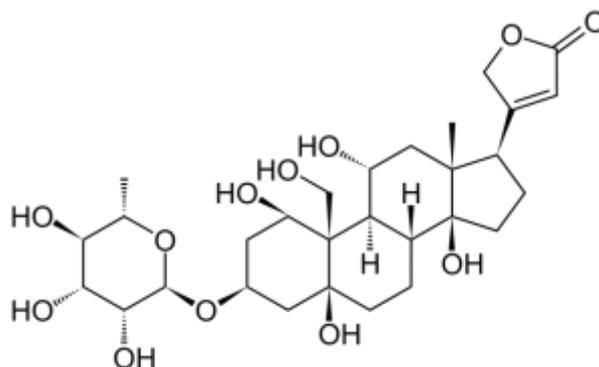
O tratamento com a ouabaína também é capaz de modular o processo inflamatório pulmonar alérgico, reduzindo a migração de eosinófilos, produção de IL-4 e o título de IgE OVA-específica, mediadores característicos da inflamação alérgica (GALVÃO et al., 2017).

Pesquisas revelam que a ouabaína é capaz de induzir a morte por apoptose em células como linfócitos ativados (OLEJ et al., 1998; ESTEVES et al., 2005), células Jurkat (ORLOV et al., 1999) e em linfócitos do sangue periférico (ANNER et al., 1994). Sabe-se que esse glicosídeo induz a expressão de CD69, molécula presente na maturação de linfócitos T, em timócitos murinos, mediante o influxo de cálcio do meio extracelular (RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2003). Nessas células, a ouabaína é capaz de inibir a proliferação desencadeada pelo mitógeno concavalina A (SZAMEL et al., 1981), sendo este efeito possivelmente relacionado a sua capacidade de diminuir a atividade da p38 MAPK e os níveis de NFATc1, o que culmina com a redução na expressão do receptor de IL-2, uma citocina importante para a proliferação linfocitária (RODRIGUES- MASCARENHAS et al., 2008).

A ouabaína reduz a migração de células inflamatórias, interfere na produção de citocinas e inibe a via de mediadores inflamatórios (TAKADA et al., 2009; DE VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2012; LEITE, 2012). Macrófagos tratados com ouabaína tiveram seus padrões de secreção de diversas citocinas alterados, a exemplo do aumento da produção de IL-1 β (DORNAND et al., 1984), IL-1 α (MATSUMORI et al., 2000) e TNF- α (FOEY, CRAWFORD; HALL, 1997; MATSUMORI et al., 2000). Em outros modelos, a ouabaína foi capaz de diminuir *in vitro* e *in vivo* a produção de citocinas pró-inflamatórias como: TNF- α e IL-6 (MATSUMORI et al., 2000; LEITE et al., 2015).

Os efeitos da ouabaína em processos inflamatórios que interferem no desenvolvimento de tumores ainda não foram devidamente explorados. Por isso, o objetivo do trabalho é investigar se a Ouabaína interfere nos parâmetros inflamatórios durante o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich.

Figura 2. Estrutura química da ouabaína



Fonte: LEITE et al., 2012.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos do pré-tratamento com a ouabaína na fisiopatologia de camundongos com tumor ascítico de Ehrlich, levando em consideração os parâmetros inflamatórios.

3.2. Objetivos Específicos

- Entender o desenvolvimento *in vivo* do tumor ascítico de Ehrlich pela construção de uma curva de desenvolvimento do tumor.
- Estudar o efeito do pré-tratamento com a Ouabaína na migração de células inflamatórias para a região peritoneal de camundongos com Ehrlich experimental.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com a Ouabaína no modelo experimental do tumor ascítico de Ehrlich, analisando o peso dos animais, peso do tumor, volume do tumor, circunferência abdominal e quantidade de células totais e diferenciais.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas com idade entre seis e oito semanas, pesando entre 25 e 30 g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração durante todo o período de experimentação. Os camundongos foram fornecidos pelo biotério Professor Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba/UFPB. Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos/UFPB e foram aprovados com o número 093/2016. Após a utilização, os animais foram encaminhados ao biotério Prof. Dr. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, para o destino adequado.

4.2. Eutanásia

Foi preparada uma solução de ketamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, que 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).

4.3. Manutenção das células *in vivo*

As células de Ehrlich utilizadas nesse trabalho foram gentilmente cedidas pela equipe da Professora Dra. Vivian Rumjanek, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. Inicialmente foi inoculada nos camundongos a concentração de 1×10^6 células por animal em um volume de 300 μl via intraperitoneal, provenientes de descongelamento de células com o intuito de manutenção das células, sendo esse processo denominado de passagem zero. Decorridos cinco dias da passagem zero foi realizado a primeira passagem. Esse processo consiste em um repique. Após a eutanásia dos animais foi feita a coleta do conteúdo líquido e

celular da cavidade peritoneal e essas células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas para a concentração de 1×10^6 por animal, que foi administrada como descrito anteriormente para indução do tumor em novos animais. Os animais de experimento foram inoculados após dois repiques. Esse tipo de célula suporta um ciclo de 10 repiques, sendo realizado um repique a cada cinco dias. Ao fim do ciclo de repiques é necessário um novo descongelamento de células.

4.4. Indução do tumor ascítico de Ehrlich para experimentação *in vivo*

Para todos os experimentos foram inoculadas nos camundongos a concentração de 1×10^5 células do tumor de Ehrlich em um volume de 300 μ l via intraperitoneal, provenientes da manutenção dessas células *in vivo*.

4.5. Coleta do lavado peritoneal

Para a obtenção do lavado peritoneal os animais foram eutanasiados. Em seguida foi feita a assepsia do animal com álcool 70 GL e realizada uma incisão longitudinal, utilizando pinça e tesoura. Utilizando uma seringa de 5,0mL foi introduzido 3,0mL de PBS gelado no peritônio, em seguida foi aspirado o maior volume possível do líquido ascítico.

O lavado peritoneal coletado foi armazenado em tubo falcon e mantido em gelo para manter a viabilidade celular. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 RPM, 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células formado foi utilizado para a contagem de células totais e diferenciais.

4.6. Análise dos parâmetros inflamatórios

4.6.1. Contagem total e diferencial de células

A contagem do número de células totais foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando uma alíquota da amostra do pellet obtido do lavado peritoneal diluída em solução

de azul de tripan (0,4%) na proporção 1:10 respectivamente. A leitura foi feita no microscópio óptico na objetiva de 40x.

Para a produção das lâminas para contagem diferencial, foi utilizada a centrífuga citospin, 1500 rpm por 10 min. Foram utilizados dois volumes de amostra por lâmina, 25µl e 50µl de células. Posteriormente, as células foram coradas utilizando o Kit Panótico, composto por 3 substâncias diferentes: fixador (etanol), corante basófilo (eosina) e corante acidófilo (azul de metileno). As lâminas secaram por 24 horas, e cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células em microscópio óptico, com objetiva de 100x, utilizando o óleo de imersão. As células foram diferenciadas em macrófago, linfócito e neutrófilo, baseado na morfologia celular.

4.6.2. Análise do desenvolvimento tumoral

Para a o cálculo do peso dos animais, os camundongos foram pesados em balança não analítica diariamente durante todos os dias de todos os protocolos de experimento. O volume do tumor foi calculado como sendo o volume retirado do lavado peritoneal de cada animal. O peso do tumor corresponde ao peso do animal após a retirada do lavado peritoneal subtraído do peso do animal antes da eutanásia. A circunferência do animal foi medida com uma fita métrica após a eutanásia do animal.

4.7. Curva de crescimento *in vivo*

Para realizar a curva de crescimento *in vivo* foram utilizados 18 animais. Os camundongos foram divididos em 9 grupos, com dois animais por grupo. Foi inoculada nos camundongos a concentração de 1×10^5 células do tumor de Ehrlich em um volume de 300 µl via intraperitoneal, provenientes da manutenção dessas células *in vivo*. Os dias escolhidos para os pontos de análise da curva de crescimento foram 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 dias após a indução do tumor. Em cada um dos dias selecionados, os dois animais do grupo correspondente foram eutanasiados e posteriormente foi feita a coleta do lavado peritoneal. Essas células recuperadas do líquido ascítico foram contadas em câmara de Neubauer para contagem de células totais. Além disso, após a eutanásia foi realizado a medida da

circunferência abdominal dos animais, cálculo do volume e peso do tumor. Os animais foram pesados diariamente.

4.8. Pré-tratamento com ouabaína

Os animais foram divididos em quatro grupos: saudável (n = 6), tumor (n = 6), Cisplatina (n = 5) e Ouabaína (n = 14). O grupo saudável foi pré-tratado com 200 µl de salina via intraperitoneal por três dias consecutivos, e no terceiro dia, 1 hora após o último pré-tratamento, não houve injeção das células do tumor de Ehrlich. O grupo tumor foi pré-tratado com 200 µl de salina via intraperitoneal por três dias consecutivos, e no terceiro dia, 1 hora após o último pré-tratamento, foram injetadas as células do tumor de Ehrlich, numa concentração de 1×10^5 . A cisplatina foi utilizada como droga padrão, e os animais do grupo cisplatina foram pré-tratados com a dose de 5 mg/kg via intraperitoneal, e no terceiro dia, 1 hora após o último tratamento, foram injetadas as células do tumor de Ehrlich, numa concentração de 1×10^5 . O grupo ouabaína foi pré-tratamento com 200 µl de ouabaína numa dose de 0,56 mg/kg por via intraperitoneal durante três dias consecutivos (LEITE et al., 2015; RODRIGUES-MASCARENHAS et al. 2006; JACOB et al., 2012) e no terceiro dia, 1 hora após o último tratamento, foram injetadas as células do tumor de Ehrlich, numa concentração de 1×10^5 (Figura 3).

Os animais foram pesados e observados diariamente, antes e durante o pré-tratamento, e após a inoculação das células de Ehrlich. Após um período de 72 horas da injeção das células de Ehrlich, todos os animais foram eutanasiados. Foi então realizado a coleta do lavado peritoneal dos animais para contagem de células totais e produção de lâminas para diferenciação de células.

Figura 3. Esquema do protocolo de pré-tratamento com a ouabaína.



4.9. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo método de análise de variância (ANOVA) não paramétrico com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. 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.).

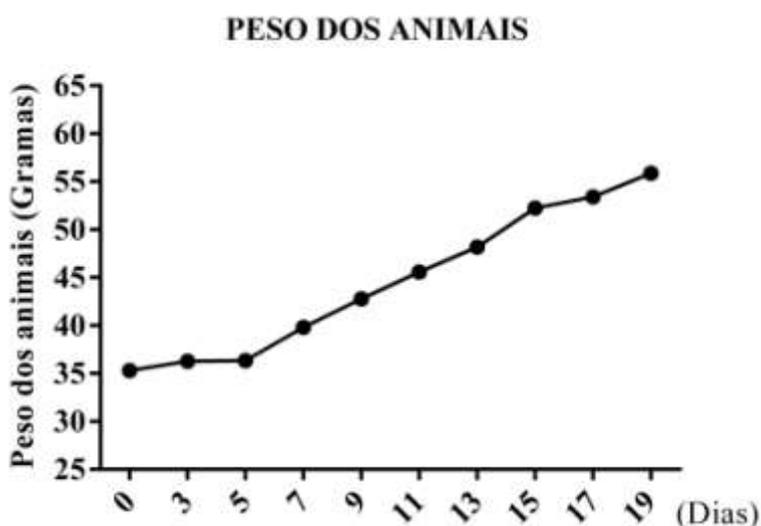
5. RESULTADOS

5.1. Curva de crescimento *in vivo*

5.1.1. Peso dos animais

Os animais foram pesados no dia 0, antes de receberem as células do tumor de Ehrlich via intraperitoneal, e após receberem as células foram pesados no dia 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 antes de serem eutanasiados. É possível observar que o peso dos animais se manteve constante até o quinto dia após o início do crescimento tumoral (Figura 4). O aumento do peso dos animais só foi evidente após o nono dia que houve a inoculação das células. Os animais saudáveis tiveram um ganho de peso de aproximadamente 7,5 gramas em dezenove dias (dados não mostrados) de experimento. Os animais com tumor atingiram o maior peso no décimo nono dia, chegando a pesar aproximadamente 55 gramas, ou seja, um aumento de peso de aproximadamente 20 gramas.

Figura 4. Peso dos animais durante a curva de crescimento.

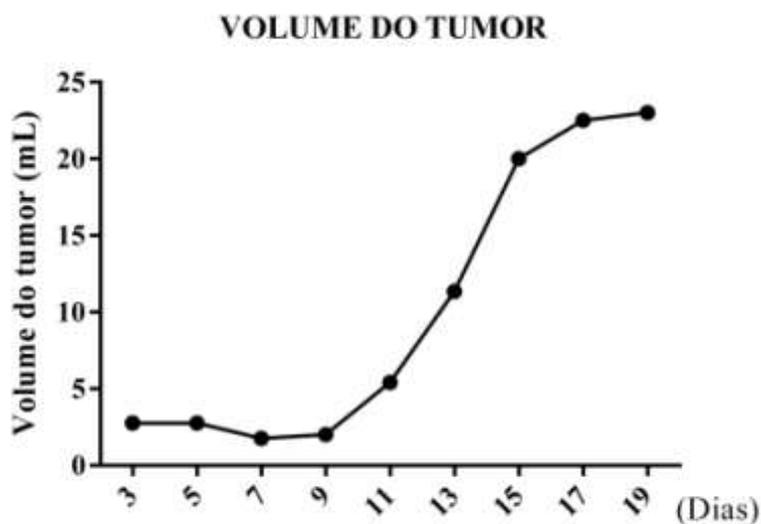


Os 18 animais foram pesados diariamente durante os 19 dias analisados. Os animais atingiram o maior peso corpóreo no décimo nono dia. Foi utilizado o $n = 2$ para cada ponto da curva de crescimento.

5.1.2. Volume do tumor

A partir do nono dia, o volume do tumor teve um aumento e no décimo primeiro dia, o volume do tumor, aproximadamente dobrou em relação ao terceiro dia (Figura 5). O valor máximo observado do volume do tumor foi obtido no décimo nono dia, com aproximadamente 22 mL (Figura 6).

Figura 5. Volume do tumor analisado durante cada ponto da curva de crescimento.



O volume do tumor foi obtido a partir do terceiro dia de desenvolvimento tumoral, e foi analisado até o décimo nono dia, onde atingiu o maior valor. Foi utilizado o $n = 2$ para cada ponto da curva de crescimento.

Figura 6. Comparação do peritônio de um animal saudável e um animal com 19 dias de desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich.



A: Animal saudável eutanasiado e com o peritônio exposto B e C: Animal eutanasiado no décimo nono dia da curva de crescimento do desenvolvimento in vivo do tumor ascítico de Ehrlich com o peritônio exposto.

5.1.3. Peso do tumor

O peso do tumor está relacionado com o volume do líquido ascítico retirado do peritônio do animal e com o peso do animal. Só foi possível calcular o peso do tumor a partir do sétimo dia, pois é quando não se torna mais necessário a injeção de PBS para obter o lavado peritoneal, uma vez que ao injetar o PBS, o volume retirado do peritônio do animal não pode ser levado em consideração, pois não é o valor real que existia de líquido ascítico.

Dessa forma, é possível observar que no sétimo dia o peso do tumor é quase zero, mas a partir do nono dia, houve um aumento do peso do tumor. Esse dado já era esperado,

uma vez que o peso do animal aumentou, assim como o volume do tumor também. O maior peso do tumor obtido foi no décimo nono dia, chegando a aproximadamente 25 g (Figura 7).

Figura 7. Peso do tumor durante a curva de crescimento.



O peso do tumor foi analisado a partir do sétimo dia, até o décimo nono dia, quando atingiu o maior peso tumoral. Foi utilizado o $n = 2$ para cada ponto da curva de crescimento.

5.1.4. Circunferência

A circunferência do animal está diretamente relacionada com a dilatação do peritônio do animal, que está relacionada, por sua vez, ao aumento da produção de líquido ascítico, e com o desenvolvimento tumoral. Como a circunferência é um dado obtido apenas após a eutanásia do animal, foi possível obter os dados de circunferência apenas a partir do terceiro dia após a injeção das células do tumor ascítico de Ehrlich.

Foi possível observar que nos dias 3 e 5 a circunferência se manteve constante em 9 cm (Figura 8). Mas no sétimo dia, a circunferência aumentou para quase 11 cm, e mostra um aumento constante até o décimo sétimo dia, onde apresenta uma pequena redução do valor da circunferência, no entanto, no décimo nono dia, volta a aumentar, atingindo o mesmo valor obtido no décimo quinto dia (Figura 9), de aproximadamente 14 cm.

Figura 8. Circunferência peritoneal dos animais durante a curva de crescimento.



A circunferência dos animais se estável durante os dois primeiros pontos analisados na curva de crescimento, e depois foi observado um aumento da circunferência peritoneal dos animais, tendo seus maiores valores obtidos no dia 15 e 19. Foi utilizado o $n = 2$ para cada ponto da curva de crescimento.

Figura 9. Animal do décimo quinto dia da curva de crescimento antes da eutanásia.

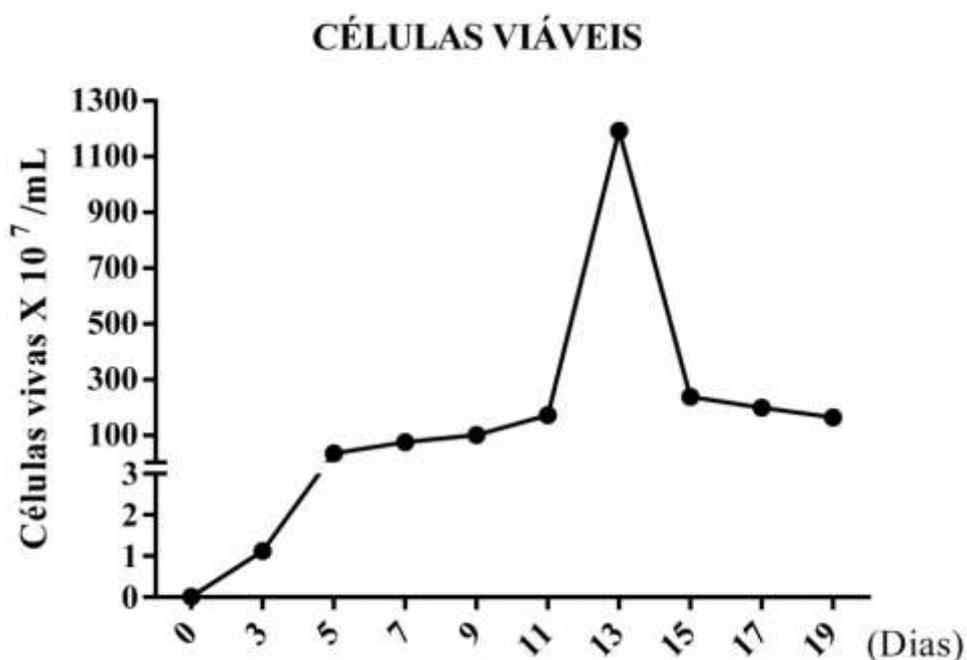


É possível observar o peritônio do animal bastante dilatado, mesmo o com a visão do dorso do animal.

5.1.5. Contagem de células totais

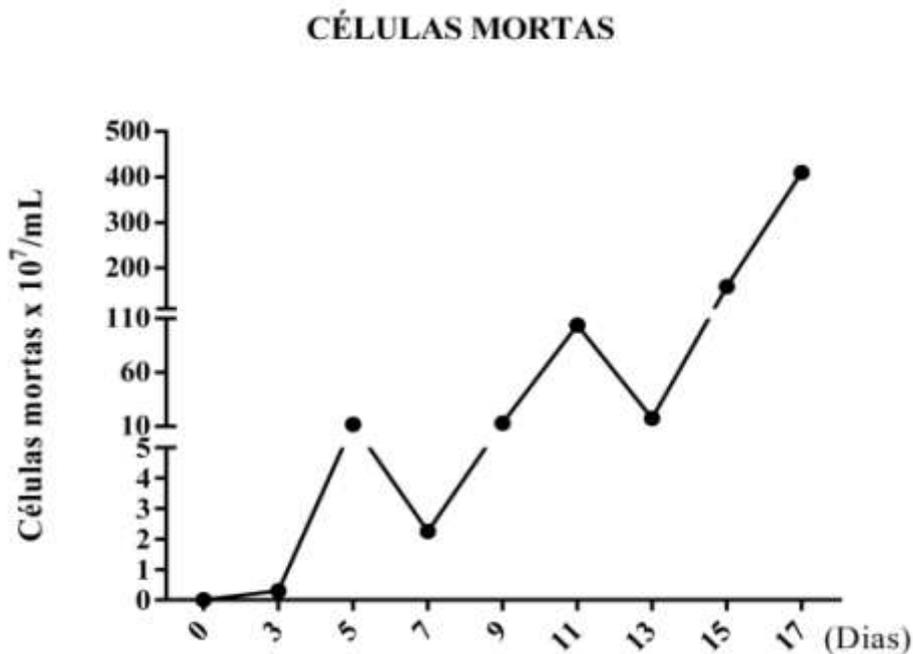
No dia 0 foi inoculado 1×10^5 células do tumor de Ehrlich nos animais via intraperitoneal com viabilidade acima de 95%. No terceiro dia após a inoculação das células tumorais o número de células vivas já havia aumentado para $1,125 \times 10^7$, o que comprova a agressividade do tumor de Ehrlich. No décimo terceiro dia o número de células vivas atingiu o maior valor encontrado $1193,5 \times 10^7$ e depois houve uma queda no número de células viáveis após o pico observado no décimo terceiro dia (Figura 10).

Figura 10. Contagem de células vivas em cada ponto analisado da curva de crescimento.



O aumento de células no peritônio dos animais acontece de forma rápida, e atingiu o maior número de células vivas no décimo terceiro dia de desenvolvimento tumoral. Foi utilizado o $n = 2$ para cada ponto da curva de crescimento.

Figura 11. Contagem de células mortas em cada ponto analisado da curva de crescimento.



Existe um aumento de células mortas apenas após o décimo primeiro dia, e o maior número de células mortas é obtido no décimo nono dia. Foi utilizado o $n = 2$ para cada ponto da curva de crescimento.

O contagem de células mortas nos permite avaliar a viabilidade das células conforme o desenvolvimento do tumor. O número de células mortas se manteve estável até o décimo primeiro dia. No décimo terceiro dia, que coincide com o maior número de células viáveis, foi possível observar um aumento de células mortas, que regride no décimo quinto dia. No entanto, após essa diminuição, há novamente aumento de células mortas (Figura 11).

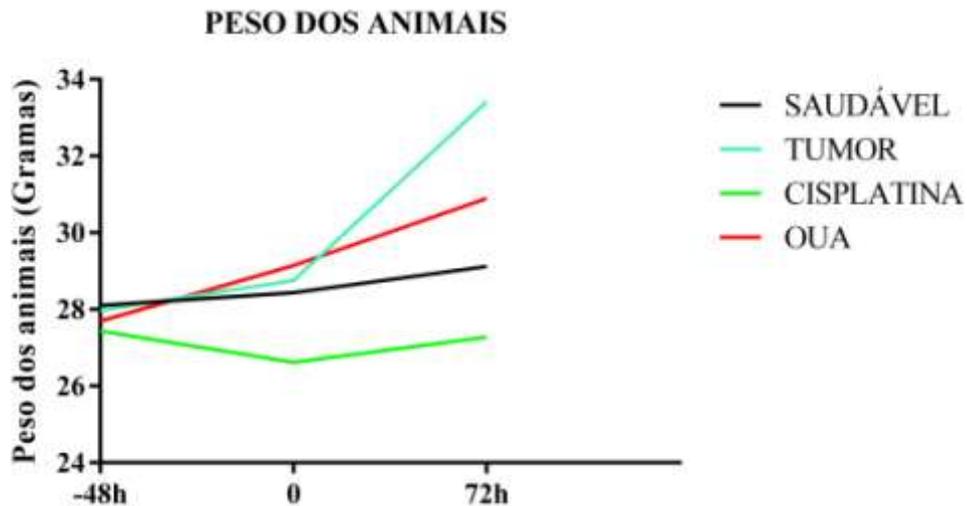
5.2. Pré-tratamento com ouabaína

5.2.1. Peso dos animais

Foi possível observar que o grupo tumor apresenta um aumento no peso, quando comparado com o grupo saudável de 14,47% após 3 dias de desenvolvimento do tumor. A

cisplatina, utilizada como droga padrão, reduziu o peso dos animais de forma significativa em relação ao grupo tumor em 11,27%. O grupo tratado com OUA também apresenta uma redução de peso de 8,1% em relação ao grupo tumor, sem apresentar diferença de peso em relação ao grupo saudável (Figura 12).

Figura 12. Análise do peso dos animais no pré-tratamento com ouabaína.

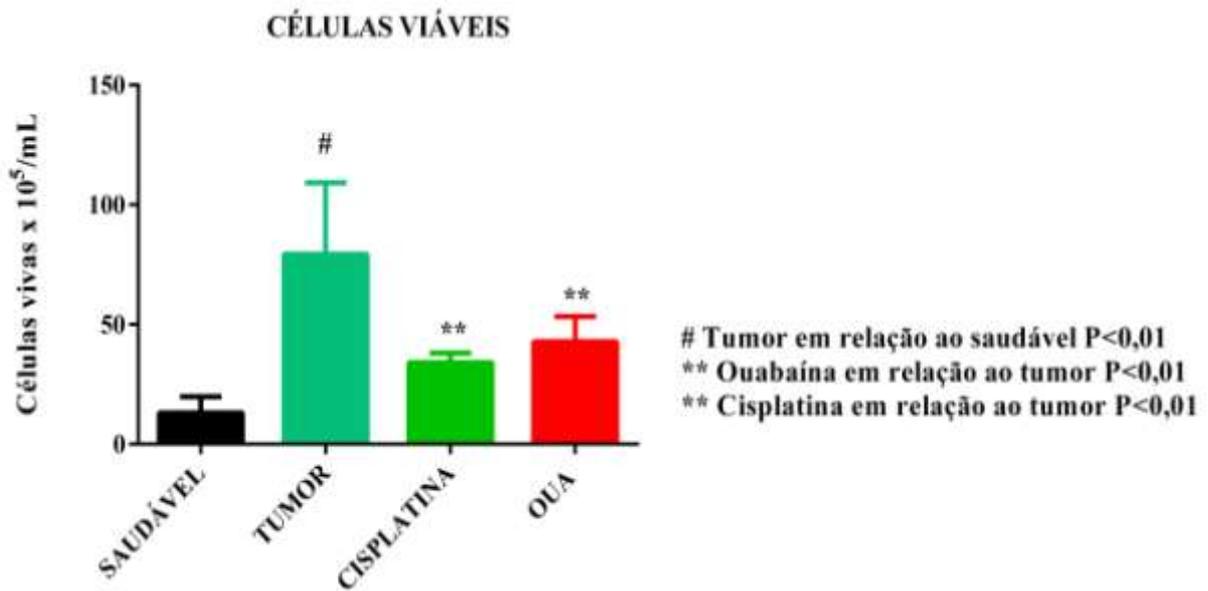


O grupo tumor teve um aumento de 14,47% no peso corpóreo em relação ao grupo saudável depois de 72 horas de desenvolvimento do tumor. A cisplatina reduziu o peso dos animais em 11,27% em relação ao grupo tumor. A ouabaína foi capaz de reduzir o peso dos animais em 8,1% em comparação ao grupo tumor.

5.2.2. Contagem de células viáveis

Verificou-se que após a inoculação de 1×10^5 células do tumor de Ehrlich, o número de células peritoneais aumentou cerca de quatro vezes como consequência do crescimento tumoral após 3 dias de desenvolvimento tumoral. Como esperado, o pré-tratamento com cisplatina por três dias consecutivos reduziu o número de células em 57,1% após 72h de desenvolvimento do tumor. O pré-tratamento com ouabaína também reduziu o número de células viáveis na cavidade peritoneal em 46%, quando comparado ao grupo tumoral após 72h de desenvolvimento do tumor (Figura 13).

Figura 13. Contagem de células vivas no pré-tratamento com ouabaína.



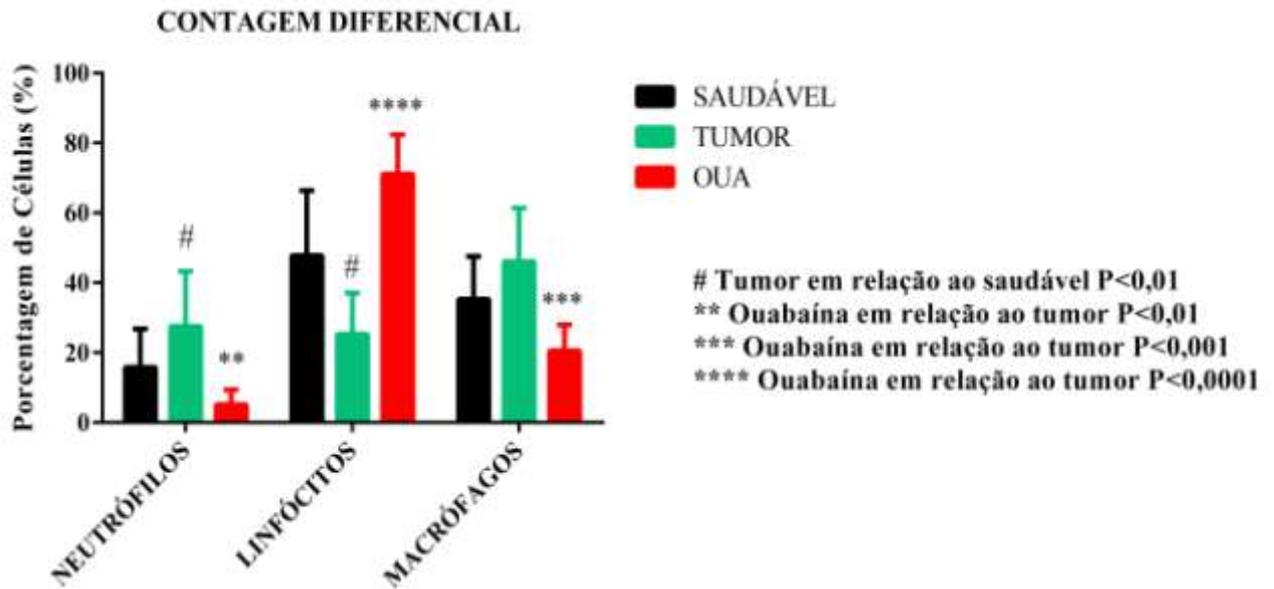
O grupo tumor apresentou um aumento no número de células viáveis em relação ao saudável (#) em 83,6% após 72 de desenvolvimento tumoral. A cisplatina reduziu o número de células vivas em 57,1% em relação ao grupo tumoral (**). A ouabaína foi capaz de reduzir o número de células viáveis em 46% (**).

5.2.3. Contagem diferencial de células

O grupo tumor apresentou um aumento de 42,72% no número de neutrófilos, uma redução de 40,9% de número de linfócitos e aumento em 23,3% do número de macrófagos quando comparado com o grupo saudável.

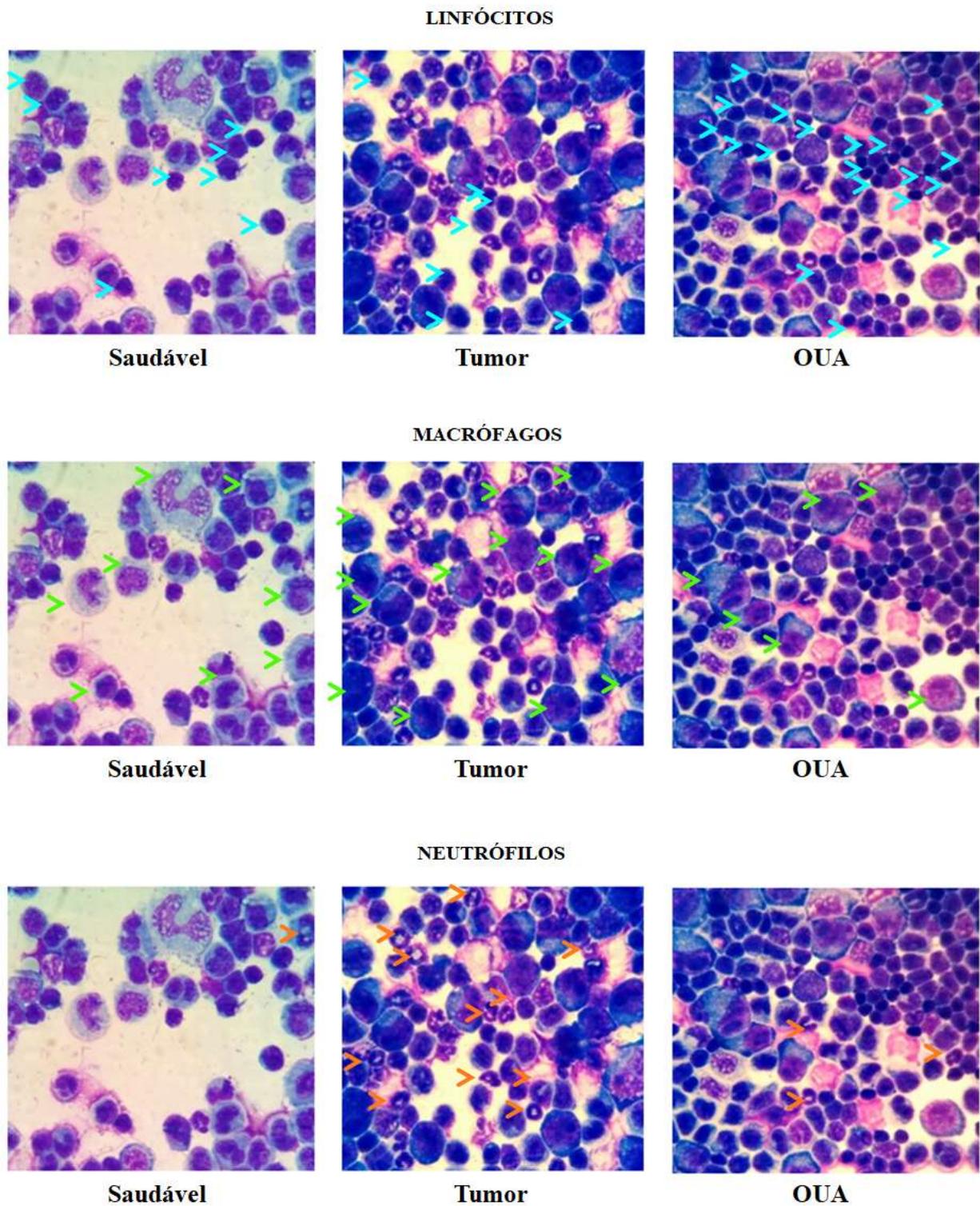
Observou-se que o pré-tratamento com a OUA foi capaz de reverter as modificações na migração celular induzidas pelo tumor. Houve redução do número de neutrófilos em 81% quando comparado com o grupo tumor. A OUA também foi capaz de reduzir o número de macrófagos em 55% em relação ao grupo tumoral. Por outro lado, a OUA aumentou a quantidade de linfócitos em 182,17% também em relação ao grupo tumor (Figura 14).

Figura 14. Contagem diferencial das células no pré-tratamento com ouabaína.



O grupo tumor apresentou um aumento no número de neutrófilos e macrófagos em relação ao grupo saudável e ao grupo pré-tratado com ouabaína. O grupo tumoral também mostrou uma diminuição no número de linfócitos em 40,9% (#) após três dias de desenvolvimento tumoral em relação ao grupo saudável. A OUA foi capaz de reduzir os números de macrófagos em 55% (***) e o número de neutrófilos em 81% (**) em relação ao grupo tumor. O pré-tratamento com ouabaína aumentou o número de linfócitos em 182,17% (**) em relação ao grupo tumoral e 66,3% em relação ao grupo saudável.

Figura 15. Micrografia das células coradas com o kit panótico para contagem diferencial de células com a objetiva de 100X.



6. DISCUSSÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado e multiplicação de células mutadas que tem a capacidade de invadir vários tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea, de origem epitelial maligna, que ocorre espontaneamente em camundongos e é espécie-específica. É bastante estudado por ser uma neoplasia experimental transplantável, se desenvolve na forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculado no subcutâneo ou coxim-plantar, as maiores vantagens na utilização desse tumor é a facilidade de manipulação e conhecimento prévio da concentração a ser inoculada (EHRlich, 1906; STEWART ET AL., 1959).

O desenvolvimento de tumores tem um forte efeito no sistema imunológico. A proliferação das células tumorais causa a produção de fatores inflamatórios que desorganiza as células de defesa. Células como linfócitos e Natural Killer Cell (NK) sofrem inibição, e tem sua função de debelar o tumor reduzida, o que favorece o crescimento do tumor. O desenvolvimento do tumor induz inflamação, que em muitos casos, ao invés de promover a inibição do crescimento tumoral, tem efeito contrário, e estimula a proliferação de células tumorais (WALLACE, 2002; BAXEVANIS et al., 1993; MARX, 2004).

Embora o papel fisiológico da OUA não tenha sido totalmente elucidado, foi demonstrado que pode afetar vários aspectos da resposta inflamatória (RODRIGUES MASCARENHAS et al., 2003; DE VASCONCELOS et al., 2011; JACOB et al., 2013; LEITE et al., 2015; GALVÃO, 2016). No entanto, revendo a literatura, não encontramos referências ao estudo dos efeitos da ouabaína no tumor ascítico de Ehrlich, justificando a oportunidade da investigação proposta em nosso trabalho, e tornando esses dados inéditos.

A curva de crescimento foi realizada com o intuito de entender como ocorre o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich no peritônio de camundongos *Swiss* fêmeas. É importante entender a cinética de crescimento do tumor e como os parâmetros inflamatórios são afetados durante esse desenvolvimento, uma vez que o tumor de Ehrlich tem comportamento agressivo e com poucos dias de inoculação é capaz de produzir grande quantidade de células viáveis e aumento do líquido ascítico, o que altera o comportamento do animal (SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006). A curva de crescimento nos permitiu observar que existe um ganho de peso de quase 20 g após 19 dias da inoculação das células tumorais. O ganho de peso se intensifica a partir do sétimo dia, dados que corroboram com o estudo feito por Santos et al (2016), onde também foi possível observar que animais inoculados com

células do tumor de Ehrlich via intraperitoneal tiveram um aumento de aproximadamente 12 gramas em 15 dias de experimento.

A circunferência abdominal é um parâmetro que está relacionado com a produção de líquido ascítico e dilatação do abdômen do animal (MANGUEIRA et al, 2017). Até o quinto dia também não é possível observar aumento da circunferência abdominal, no entanto, a partir do sétimo dia, existe um aumento bastante pronunciado da circunferência, que atinge quase 14 cm no décimo quinto e décimo nono dia de inoculação. Esse aumento da circunferência abdominal dos animais é um parâmetro observado em diferentes trabalhos, pois o aumento do líquido ascítico causa a dilatação do peritônio dos animais (MANGUEIRA et al, 2017; SANTOS et al, 2016; FECCHIO et al, 1990).

Uma vez que o tumor de Ehrlich quando injetado pela via intraperitoneal tem crescimento ascítico, o volume do tumor, que é referente ao volume retirado do peritônio do animal, tem uma ligação direta com o aumento de células conforme o tumor se desenvolve (MANGUEIRA, 2017). Levando em consideração que até o quinto dia após a inoculação das células era necessário injetar PBS, já era esperado que não houvesse um volume do tumor significativo, uma vez que era possível recuperar apenas os 3 mL que foram injetados. No sétimo dia, o volume retirado foi um pouco menor, uma vez que já existia um aumento na produção de líquido ascítico, permitindo que a retirada das células fosse feita sem injeção de PBS, mas ainda não foi muito pronunciado.

Até o nono dia após a inoculação das células não foi visto uma grande produção de líquido ascítico, mas a partir do décimo primeiro dia o volume aumentou, atingindo aproximadamente 23 mL no décimo nono dia. O peso do tumor, calculado a partir do sétimo dia, apresentou aumento significativo após o décimo terceiro dia, e atinge o maior valor no décimo nono dia com 25,8 g. O aumento na produção de líquido ascítico e consequentemente o aumento no volume e peso do tumor são parâmetro utilizados para avaliar o desenvolvimento tumoral, Manguiera et al (2017), também observaram um aumento significativo no peso e volume do tumor após 9 dias de crescimento tumoral nos animais que não foram tratados.

A quantidade de células totais nos permite avaliar o crescimento tumoral quantificando as células presentes no líquido ascítico dos animais, e é possível observar um crescimento no número de células vivas, o que nos mostra que a fase aguda do tumor acontece rapidamente, nos primeiros dias após a inoculação entre o terceiro e quinto dia, a partir do sétimo dia após a inoculação, já é possível quantificar um número de células elevado comparado com os dias anteriores.

No nono e décimo primeiro dia ainda existe um crescimento tumoral intenso das células, no entanto, visualmente, pelo aumento da produção de líquido ascítico e circunferência abdominal, o animal já se encontra bastante debilitado, com dificuldades para se alimentar e beber água, além de ter um menor deslocamento pela gaiola.

No décimo terceiro dia o animal atinge a maior quantidade de células observada, e a partir disso, existe uma queda na quantidade de células vivas e aumento de células mortas, o que indica que as células começam a perder a viabilidade e o animal já se encontra no estágio terminal, apresentando a partir do décimo quinto dia um número muito reduzido de células vivas.

Fecchio et al, (1990), injetaram 1×10^3 células de Ehrlich via intraperitonal em camundongos *Swiss* machos e observaram um pequeno aumento no número de células totais até o sexto dia, mas depois desse período houve um aumento exponencial atingindo aproximadamente 39×10^6 , o que confirma os nossos dados de que as células de Ehrlich tem uma característica de crescimento agressivo.

As informações obtidas na curva de crescimento foram importantes para a definição de protocolo utilizado no pré-tratamento com ouabaína. Como a ouabaína é um hormônio produzido em situações de estresse, para poder analisar seu papel na fase aguda do tumor, ou seja, na instalação e adaptação das células tumorais, que é onde existe alta produção de citocinas pró-inflamatórias e migração de células pró-inflamatórias (AGGARWAL et al., 2006), foi definido que o tempo de crescimento tumoral que melhor define a fase aguda do tumor foi três dias após a inoculação, e o protocolo de pré-tratamento com ouabaína por três dias consecutivos em uma dose de 0,56 mg/kg. Esse dose foi escolhida pois corresponde aos níveis encontrados fisiologicamente no organismo, uma vez que o objetivo desse trabalho foi estudar o efeito fisiopatológico da ouabaína no modelo do tumor ascítico de Ehrlich e não buscar um novo tratamento antineoplásico (DE VASCONCELOS et al., 2011; LEITE, 2012; LEITE et al., 2015).

Os animais do grupo tumor tiveram um aumento do peso corpóreo quando comparados com os animais do grupo saudável, o que indica que o aumento de peso está relacionado com o desenvolvimento do tumor. Os animais pré-tratados com cisplatina tiveram uma redução de 11,27% do peso corpóreo em relação ao grupo tumor, o que já era esperado devido sua ação antineoplásica, efeito esse, que foi demonstrado também por Osman et al, (2015) no tratamento de câncer de mama em humanos.

Os animais pré-tratados com ouabaína apresentaram uma redução do peso corporal em 8,1% em relação ao grupo tumor, assim como, animais que foram tratados com extrato de

Euphorbia tirucalli também apresentaram uma redução no peso corpóreo quando comparados com o grupo controle (SANTOS et al, 2016).

Ao analisarmos a contagem de células totais, foi possível observar que os animais do grupo tumor tinham 83,6% de células viáveis a mais que os animais do grupo saudável e esse aumento de células foi decorrente do desenvolvimento tumoral. A ouabaína reduziu o número de células vivas em comparação com o grupo tumor, assim com a cisplatina. O que pode indicar que ouabaína pode estar interferindo no desenvolvimento tumoral, principalmente na fase aguda.

Para entender melhor a migração celular decorrente do processo inflamatório induzido pelo tumor, foi realizada a contagem diferencial celular, onde as células foram coradas com o kit panótico e diferenciadas pela sua morfologia. Analisando as células presentes no líquido ascítico dos animais do grupo tumor foi possível observar um aumento no número de neutrófilos em 42,72% e de macrófagos em 23,3%, e uma diminuição em 40,9% no número de linfócitos em relação ao grupo saudável, o que demonstra que o tumor ascítico de Ehrlich afeta a resposta inflamatória dos animais, e altera a migração de células para o microambiente inflamado.

A ouabaína foi capaz de diminuir em 81% o número de neutrófilos e 55% o número de macrófagos, além de aumentar em 182,17% o número de linfócitos. Já foi demonstrado em outros trabalhos do nosso grupo que a ouabaína foi capaz modular a resposta imunológica e exercer um papel anti-inflamatório em microambientes inflamados, e um dos mecanismos pelo qual a ouabaína atua é na migração celular, reduzindo a migração de neutrófilos para a região inflamada (DE VASCONCELOS et al., 2011; LEITE et al, 2015).

O papel da ouabaína no desenvolvimento de tumores ainda é pouco explorado, mas levando em consideração a descoberta desse hormônio esteroide biologicamente, imunologicamente e estruturalmente idêntico ao composto extraído de plantas acredita-se que essa substância possa exercer uma atividade moduladora na manutenção da homeostase dos organismos (HAMLYN, 1991; DE VASCONCELOS et al., 2011). Sendo assim, a partir dos dados obtidos, é possível observar que a ouabaína pode exercer um papel fisiológico no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, reduzindo a migração de células como neutrófilos e macrófagos, e aumentar o número de linfócitos, sugerindo um novo mecanismo de ação dessa substância, além de reduzir o peso corporal dos animais em relação ao grupo tumoral que está relacionado com a diminuição de leucócitos totais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A curva de crescimento do tumor ascítico de Ehrlich confirmou a agressividade de crescimento do tumor, assim como seu efeito na resposta inflamatória. Verificou-se que após a inoculação de 10^5 células de Ehrlich, o número de leucócitos peritoneais aumentou como consequência do crescimento tumoral. A ouabaína promoveu redução do peso corpóreo dos animais e foi capaz de reduzir o número total de leucócitos na cavidade peritoneal quando comparado ao grupo tumoral. O pré-tratamento com ouabaína reduziu o número de neutrófilos, como já foi demonstrado pelo nosso grupo, e também de macrófagos. Por outro lado, a ouabaína aumentou a quantidade de linfócitos, sugerindo um novo modo de ação desta substância. Dessa forma, é possível concluir que a ouabaína é capaz de modular negativamente o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, provavelmente por alterar o perfil de células inflamatórias no microambiente tumoral. O significado biológico desses resultados na evolução do tumor está em investigação e traz novas idéias sobre o papel fisiopatológico da ouabaína.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier, 6 edição, 2008.
- AGGARWAL, B. B., SHISHODIA, S., SANDUR, S. K. Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochem Pharmacol*, pp. 1605-1621, 2006.
- ALAPATI, V.; NOOLVI, M.N.; MANJULA, S.N.; PALLAVI, K.J.; PATEL, H.M.; TIPPEWAMY, B.S.; SATYANARAYANA, S.V. In vivo anti-tumour activity of novel Quinazoline derivatives. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, pp.1753–1764, 2012.
- ANDZINSKI, L., et al. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int. J. Cancer*, pp. 1982-93, 2016.
- ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, C.; BRUSINT, B.; VICH, P.; DÍAZ-GARCÍA, N.; CUADRADO-ROUCO, C.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Update of breast cancer in primary care (IV/V). *Semergen*, v. 41, n. 1, p. 34-47, 2015.
- ANNER, B.M.; LACOTTE, D.; ANNER, R.M.; MOOSMAYER, M. Interaction of hypothalamic Na,K-ATPase inhibitor with isolated human peripheral blood mononuclear cells. *Biosci. Rep.*, 1994.
- BAUER, J.H.; POON, P.C.; GLATT-DEELEY, H.; ABRAMS, J.M.; HELFAND, S.L. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Curr. Biol.*, pp. 2063-2068, 2005.
- BAUER, N.; MÜLLER-EHMSSEN, J.; KRÄMER, U.; HAMBARCHIAN, N.; ZOBEL, C.; SCHWINGER, R.H.G.; NEU, H.; KIRCH, U.; GRÜNBAUM, E.G; SCHONER, W. Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs - Effects of β -Blockade and Angiotensin Converting Enzyme Inhibition. *Hypertension*, pp. 1024-1028, 2005.
- BAXEVANIS, C.N.; RECLOS, G.J.; GRITZAPIS, A.D.; DEDOUSIS, G.V.; MISSITZIS, I.; PAPAMICHAIL, M. Elevated Prostaglandin E2 production by monocytes is responsible for the depressed level of natural killer and lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer. *Cancer*, v. 72, pp. 491-50, 1993.

BHATTACHARYYA, A.; CHOUDHURI, T.; PAL, S.; CHATTOPADHYAY, S.; DATTA, G.K. Apoptogenic effects of black tea on Ehrlich's ascites carcinoma cell. **Carcinogenesis**, pp.75–80, 2003.

BLAUSTEIN, M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intra-celular Ca² stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**, pp. 1367-1387, 1993.

BROZOVIC, G.; ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, F.; HORVAT-KNEZEVIC, A.; BENKOVIC, V.; SAKIC, K.; HRGOVIC, Z.; BENDELJA, K.; FASSBENDER, W.J. Genotoxicity and cytotoxicity of cisplatin treatment combined with anaesthetics on EAT cells in vivo. **Onkologie**, pp. 337–343, 2009.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; LIMA, E. A.; CARVALHO, D. C. M.; SALES-NETO, J. M.; ALVES, A. K. A.; GALVÃO, J. G. F. M.; SILVA, J. S. F.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. **Front. Physiol.**, 2017.

COFFELT, S.B., et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. **Nature**, pp. 345-248, 2015.

DE VASCONCELOS, D.I.; LEITE, J.A.; CARNEIRO, L.T.; PIUVEZAM, M. R.; DE LIMA, M.R.; DE MORAIS, L.C.; RUMJANEK, V.M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, pp. 912-925, 2011.

DE PAIVA, L.S. Modulation of mature B cells in mice following treatment with ouabain. **Immunobiology**, 2011.

DE WARDENER, H.E. The hypothalamus and hypertension. **Physiological Reviews**, pp. 1599-1658, 2001.

DORNAND, J.; FAVERO, J.; BONNAFOUS, J.C.; MANI, J.C. Paradoxical production of mouse thymocyte activating factor by ouabain-treated human mononuclear cells. **Cell Immunol.**, 1984.

DRIESSCHE K.; PERSSON A.; MARAIS B.; FINK P.; URDAH K. Immune Vulnerability of Infants to Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013 p. 4-6, 2013.

DYKEWICZ M.S.; FINEMAN S.; SKONER D.P. Joint task force summary statements on diagnosis and management of rhinitis. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, 474–477, 1998.

ECHEVARRIA-LIMA, J; RUMJANEK, V.M. Effect of Ouabain in the immune system. **Current Hypertension Reviews**, 2006.

EHRlich, P. Experimentelle carcinoma studien an Mäusen. **Arb. Inst. Exp. Ther**, v. 1, pp. 78-80, 1906.

ERUSLANOV, E.B., et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. **J. Clin. Invest.**, pp. 5466-5480, 2014.

ESTEVEs, M.B.; MARQUES-SANTOS, L.F.; AFFONSO-MITIDIERI, O .R.; RUMJANEK, V.M. Ouabain exacerbates activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 2005.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, Vol. 14, No. 1, 1990.

FERLAY,J.; SHIN, H.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 2893-2917, 2010.

FERRANDI, P.; MANUNTA, S.; BALZAN, J.M.; HAMLYN, G.; BIANCHI, P. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays. **Hypertension**, pp. 886-896, 1997.

FOEY, A.D.; CRAWFORD, A.; HALL, N.D. Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na, K-ATPase activity. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1997.

FONTES, A.P.S.; ALMEIDA, S.G. e NADER, L.A. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 398-406, 1997.

FRIDLENDER, Z.G; SUN, J.; KIM, S.; KAPOOR, V.; CHENG, G.; LING, L.; WORTHEN, G. S.; ALBELDA, S. M. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, 2009.

GABRILOVICH, D. I., OSTRAND-ROSENBERG, S, BRONTE, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. **Nat. Rev. Immunol.**, pp. 253-268, 2012

GALDIERO, M.R., et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. **J. Cell Physiol.**, pp. 1404-1412, 2013.

GALVÃO, J. G. F. M.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CARVALHO, D. C. M.; FERREIRA, L. K. D. P.; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; FERREIRA, L. A. M. P.; GADELHA, F. A. A. F.; PIUVEZAM, M. R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation, *Inflammation Research*, 2017.

GOTO, A.; YAMADA, K. Purification of endogenous digitalis-like factors from normal human urine. **Clin. Exp. Hypertens.**, pp. 551-556, 1998.

GOTO, A.; YAMADA, K.; NAGOSHI, H.; TERANO, Y.; OMATA, M. Stress-induced elevation of ouabain like compound in rat plasma and adrenal. **Hypertension**, pp. 1173-1176, 1995.

GOTO, A.; YAMADA, K.; YAGI, N.; YOSHIOKA, M.; SUGIMOTO, T. Physiology and pharmacology of Endogenous Digitalis-like Factors. **Pharmacology Reviews**, pp. 377-399, 1992.

HAMBLEY, T.W. The influence of structure on the activity of platinum anti-cancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 166, p. 181-223, 1997.

HAMID, H. Effect of ouabain on sodium pump alpha-isoform expression in an animal model of mania. **Physiological Reviews**, pp. 1103-1106, 2009.

HAMLIN, J.M.; BLAUSTEIN, M.P.; BOVA S.; DUCHARME, D.W.; HARRIS, D.W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W.R.; LUDENS, J.H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, pp. 6259-6263, 1991.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, pp. 646-674, 2011.

HUANG, L.; LI, H.; XIE, Z. Ouabain-induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expression of several late response genes. **J. Mol. Cell Cardiol.**, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Incidência de Câncer no Brasil. **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA)**, Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso: 24/04/2017.

ISAEV, N.K.; STELMASHOOK, E.V.; HALLE, A.; HARMS, C.; LAUTENSCHLAGER, M.; WEIH, M.; DIRNAGL, U.; VICTOROV, I.V.; ZOROV, D.B. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. **Neurosci. Letter**, 2000.

JACOB, P.L.; LEITE, J.A.; ALVES, A.K.A.; RODRIGUES, Y.K.S.; AMORIM, F.M.; NÉRIS, P.L.N.; OLIVEIRA, M.R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania amazonensis*-infected Swiss mice. **Parasitology Research**, pp. 1313-1321, 2012.

JACONODINO, C.; AMESTOY, S.; THOFEHRN, M. Alternative therapies for patients undergoing chemotherapy. **Cogitare Enferm**, v.13, n.1, p.61-66, 2008.

JAMIESON, E.R. & LIPPARD, S.J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA Adducts. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

KARIN, M.; LAWRENCE, T.; NIZET, V. Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. **Cell**, v. 124, p. 823-835, 2006.

KOMETIANI, P.; LI, J.; GNUDI, L.; KAHN, B.B.; ASKARI, A.; XIE, Z. Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes: The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. **J. Biol. Chem.**, 1998.

KHALEK, M. A.; KHATUN, Z.; HABIB, M. R.; KARIM, M.R. Antitumor activity of *Manilkara zapota* (*L.*) fruits against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Biologija**, Vol. 61. No. 3-4, pp. 145-152, 2015.

LAREDO, B.P.; HAMILTON, J.M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, pp. 794-797, 1994.

LAREDO, B.P.; HAMILTON, J.M. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, pp 487 – 493, 1995.

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. Ouabain Immunomodulatory Activity In The Acute Inflammatory Process. **Universidade Federal da Paraíba - Dissertação (Mestrado)**, 2012.

LEITE, J.A.; ALVES, K.A.; GALVÃO, J.G.M.; TEIXEIRA, M.P.; CAVALCANTE-SILVA, L.H.A.; SCAVONE, C.; MARROT, A.; RUMJANEK, V.M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. **Hindawi Publishing Corporation**, pp. 1-12, 2015.

LI, G.Y.; LIU, J.Z.; CHEN, S.G.; WANG, C.B.; BIN, Z.; WANG, L.X. Effect of a seashell protein Haishengsu on the immunological function of mice with Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 2009.

MADERA, L.; GREENSHIELDS, A.; COOMBS, M.; HOSKIN, D. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses. **PLoS One**, v.10, 2015.

MANGUEIRA, V.M.; BATISTA, T.M.; BRITO, M.T.; DE SOUSA, T.K.G.; DA CRUZ, R.M.D.; DE ABRANTES, R.A.; VERAS, R.C.; DE MEDEIROS, I.A.; MEDEIROS, K.K.P.; PEREIRA, A.L.G.; SERAFIM, V.L.; DE MOURA, R.O.; SOBRAL, M.V. A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, pp. 253–261, 2017.

MARX, J. Cancer research: Inflammation and cancer: the link grows stronger. **Science**, v. 306, pp. 5698-966, 2004.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; GORMIAK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. Effect of *pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life Sciences**, pp. 573-579, 2003.

MATSUMORI, A.; ONO, K.; NISHIO, R.; NOSE, Y.; SASAYAMA, S. Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain. **Cytokine**, 2000.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário -parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.5, p.552-580, 2010.

NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL (ONU-BR). Câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo. **Nações Unidas no Brasil** < <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/> > , Acesso: 18/05/2018, 2017.

OLEJ, B.; DOS SANTOS, N.F.; LEAL, L.; RUMJANEK, V.M. Ouabain induces apoptosis in PHA – activated lymphocytes. **Biosci. Rep.**, 1998.

OSMAN, A. M. et al. Dimethylsulfoxide exacerbates cisplatin-induced cytotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma cells. **Cancer cell international**, 2015.

PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; MOCARELLI, P. Surface antigen on Ehrlich ascites tumor cells. **Biomedicine**, pp. 105–109, 1980.

RAWJI K.; YONG V. The Benefits and Detriments of Macrophages/Microglia in Models of Multiple Sclerosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p. 2-3, 2013.

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. Modulation Of The Immune System By Ouabain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, pp. 153-163, 2009.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; BLOISE, F. F.; MOSCAT, J.; RUMJANEK, V. M. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell Biology International**, pp. 1323-1328, 2008.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DOS SANTOS N. F.; RUMJANEK, V. M. Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy. **Biosci. Rep.**, 2006.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERNANDES DOS SANTOS, N.; RUMJANEK, V. M. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life Sciences**, pp. 1037-1051, 2003.

SANTOS, O. J.; SAUAIA, F.; EULER, N.; NASCIMENTO, F.R.F.; JÚNIOR, F.C.S.; FIALHO, M.S.; SANTOS, H.P.; SANTOS, R.A.P.; SERRA, I.C.P.B. Use of raw Euphorbia tirucalli extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, pp. 18-21, 2016.

SAKAI, M.; FONSECA, E.S.; DAGLI, M.L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Sciences**, pp. 1777-1783, 2006.

SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MARQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Letter**, 1997.

SCHONFELD, W.; WEILAND, J.; LINDIG, C.; MASNYK, M.; KABAT, M.M.; KUREK, A.; WICHA, J.; REPKE, K.R. The lead structure in cardiac glycosides is 5 beta, 14 beta-androstane-3 beta 14-diol. Naunyn-Schmiedeberg's. **Archives of Pharmacology**, pp. 414-26, 1985.

SHAH, S.M. Alignment of the B" subunit of RNA polymerase III transcription factor IIIB in its promoter complex. **J. Biol. Chem.**, 1999.

SILVA, A.E; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D. Cell proliferation markers for evaluating the growth of solid and ascitic forms of Ehrlich tumor. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, pp. 658-661, 2006.

SILVA, J. M. C. Modulação dos linfócitos b de camundongos balb/c pelo esteróide ouabaína, **Universidade Federal Fluminense** (Trabalho de conclusão de curso), 2013.

SPIVAK, J. L. et al. Suppression and potentiation of mouse hematopoietic progenitor cell proliferation by ouabain. **Blood**, v.56, p.315-317, 1980.

STEWART, H. L. Transplantable and transmissible tumors of animals. **Armed Force Institute of Pathology**, 1959.

SZAMEL, M.; SCHNEIDER, S.; RESCH, K. Functional interrelationship between (Na⁺/K⁺)-ATPase and lysolecithinacyltransferase in plasma membranes of mitogen-stimulated rabbit thymocytes. **The Journal of biological chemistry**, 1981.

TAKADA, Y.; MATSUO, K.; OGURA, H.; BAI, L.; TOKI, A.; WANG, L.; ANDO, M.; KATAOKA, T. Odoroside A and ouabain inhibit Na⁺/k⁺-ATPase and prevent NF-KappaB-inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport. **Biochemical Pharmacology**, pp. 1157-1166, 2009.

VISSER K.; EICHTEN A.; COUSSENS L. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature**, v. 6, p. 24-26, 2006.

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

WARDENER, H.E.; MILLS, I.H.; CLAPHAM, E.F. Studies on the efferent mechanism of the sodium dieresis with follows administration of intravenous saline in dog. **Clinical Science**, pp. 249-258, 1961.

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

ANEXO A – CERTIDÃO 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 |

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

ANEXO B – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO EM SIMPÓSIO



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "EVALUATION OF THE EFFECTS OF OUABAIN ON EHRlich'S ASCITES CARCINOMA-TREATED MICE" de autoria de AYRES-SALMERON, A. C.; CALADO, M. B.; RODRIGUES DA SILVA, G.; PIUVEZAM, M. R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. foi apresentado na sessão de pôster, durante o XI Simposio de Oncobiologia, realizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de 27 a 29 de setembro de 2017.

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2017.

Robson de Queiroz Monteiro
Coordenador do XI Simposio de Oncobiologia