

**SIMONE MARTINS DE OLIVEIRA**

**TRIAGEM DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS QUE  
ATIVAM MACRÓFAGOS COM DETECÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE IFN- $\gamma$ , IL-4 E NO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi  
Co-orientador: Prof. Dr Waldemiro Gremski

**CURITIBA  
2005**

**SIMONE MARTINS DE OLIVEIRA**

**TRIAGEM DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS QUE  
ATIVAM MACRÓFAGOS COM DETECÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE IFN- $\gamma$ , IL-4 E NO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi  
Co-orientador: Prof. Dr Waldemiro Gremski

**CURITIBA  
2005**

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

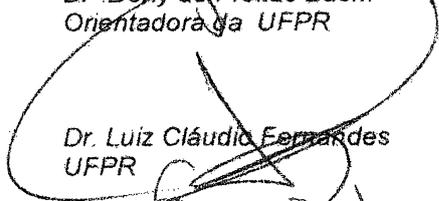
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

---

## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
Dr.<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi  
Orientadora da UFPR

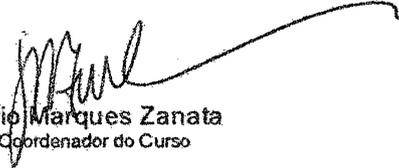
  
Dr. Luiz Cláudio Fernandes  
UFPR

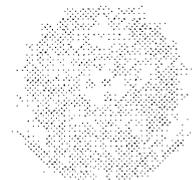
  
Dr. Flavio Dantas de Oliveira  
Escola Paulista de Medicina-SP

após arguir o(a) mestrando(a) **Simone Martins de Oliveira** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "**Avaliação de medicamentos homeopáticos em macrófagos peritoneais de camundongos**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

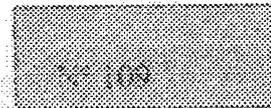
A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 07 de outubro de 2005

  
Silvio Marques Zanata  
Coordenador do Curso



## CERTIFICADO



A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

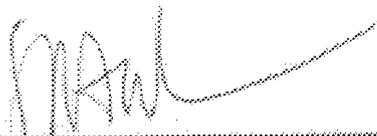
Processo nº: 51499/04-98 Data de Aprovação: 22/11/04 16º RO

Projeto Pesquisa Título: "AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS EM MACROFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS".

Autores: Dorly de Freitas Buchi - responsável  
Simone Martins de Oliveira - acadêmica  
Waldemiro Gremski e Carolina Camargo de Oliveira - colaboradores

Departamento : Biologia Celular

Curitiba, 22 de novembro de 2004.

  
Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA  
Secretário

  
Prof. Dra. ANETE CURTE FERRAZ  
Presidente

À minha família abençoada, que me

ensina viver, a cada dia

À Deus, por me dar a vida,  
cheia de pessoas que eu  
amo.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar uma vida cheia de encantos e aprendizados, principalmente os do caminho da ciência, me fazendo valorizar, cada vez mais, a cada passo, toda a vida. E por sempre colocar no meu caminho pessoas como essas aqui de baixo, que, de uma forma ou de outra, me ajudam a crescer:

À minha família linda e essencial, que mesmo de longe, é sempre tão presente na minha vida, me fazendo sentir o que é o verdadeiro amor.

À minha mãe Joana, por ser a minha “mãezinha” , que me encoraja, me anima, me afaga, me faz rir das situações difíceis e que, a cada palavra, me mostra que a vida é para aqueles que têm coragem.

Ao meu meu paizão João, pelo seu amor incondicional e por seus esforços imensos para que eu sempre conquiste os meus sonhos.

Ao meu irmãozinho Sandro e ao meu irmão Sidney, os quais eu amo com todo coração, que me apoiam e me incentivam sempre a seguir em frente.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dorly de Freitas Buchi, por me ensinar os passos da ciência, por seus ensinamentos de vida, pelas grandes e únicas oportunidades que me proporcionou e pelas suas compreensões.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Waldemiro Gremski pela sua orientação inicial.

À minha irmã postiça, amiga, conselheira do laboratório e de todos os momentos, Caro, que sempre ouve as minhas histórias com toda paciência. Obrigada pela ajuda nos experimentos, no “paper” , na dissertação, pelo seu companheirismo via msn nas noites no laboratório, por todo apoio e pela sua participação na minha vida.

À todos do laboratório que sempre me ajudaram no trabalho diário, que tanto me fizeram rir nos momentos de desespero, quanto me agüentaram nos momentos de alegria: Luciana, Ana Paula, Felipe, Mônica, Elenice, Raffaello, Bia e Fernandinho. Em especial a minhas enfermeiras particulares Bia, Ana, Lu e Caro que me agüentaram doente e cuidaram de mim no congresso em Àguas de Lindóia.

E ao Raffa, pelo companheirismo na noite virada, nos momentos finais da redação da dissertação.

À minha amiga de faculdade Lysângela, que sempre se preocupou comigo, como uma amiga de infância e participou, mesmo distante, de todos os momentos de alegrias, tristezas e indignações.

À minhas primas, Lu, Josi e Re por toda cumplicidade nesses anos de convívio.

Ao Narciso da L. Neto pelo fornecimento dos medicamentos manipulados e por toda sua boa vontade em tirar as minhas dúvidas em relação à homeopatia.

Aos médicos homeopatas Patrícia Silveira e Luis Antônio Costa por ter nos orientado na escolha dos medicamentos, pelas dúvidas sanadas e pelos livros de homeopatia emprestados que foram de altíssima utilidade, contribuindo não só para o meu entendimento de homeopatia, como para me ajudar a ver a vida de uma forma diferente.

Ao professor Juarez e ao Chico, pelas ajudas nas análises estatísticas

À Mariana, por ter me fornecido suas fotos e sugestões.

Às secretárias Gerizalda J. Bernardo, do Departamento de Biologia Celular e Marlene B. de Camargo, do curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo apoio constante nos trabalhos administrativos.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), Beatriz Cesar e Franco, pelos frascos e filtros doados.

Ao pessoal do biotério Cândido J. T. Pereira, Iselen de A. Ivanosque, Júlio C. Lucindo e demais funcionários, por toda a ajuda no trato com os animais.

Ao Francisco Canova e Samuel Hahnemann, por terem tido a coragem de enfrentar tantas rejeições e dificuldades, sem desistir, mesmo sem terem noção do quanto suas “teimosias” contribuiriam ao mundo.

Ao Canova do Brasil Ltda. pela oportunidade de estudar o medicamento e pelo apoio financeiro.

Ao Paraná Tecnologia pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

<b><u>LISTA DE QUADROS.....</u></b>	<b><u>viii</u></b>
<b><u>LISTA DE FIGURAS.....</u></b>	<b><u>xi</u></b>
<b><u>LISTA DE GRÁFICOS.....</u></b>	<b><u>x</u></b>
<b><u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</u></b>	<b><u>xii</u></b>
<b><u>RESUMO .....</u></b>	<b><u>xiii</u></b>
<b><u>ABSTRACT.....</u></b>	<b><u>xiv</u></b>
<b><u>1 INTRODUÇÃO .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</u></b>	<b><u>19</u></b>
<b>2.1 HOMEOPATIA .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 DEFINIÇÃO .....	19
2.1.2 DESENVOLVIMENTO DA HOMEOPATIA .....	22
2.1.3 PESQUISA LABORATORIAL .....	38
2.1.4 IMUNOLOGIA E A HOMEOPATIA.....	41
2.1.5 HOMEOPATIA NO BRASIL.....	43
<b>2.2 MEDICAMENTO CANOVA.....</b>	<b>45</b>
<b>2.3 SISTEMA IMUNITÁRIO.....</b>	<b>48</b>
2.3.1 CITOCINAS .....	51
2.3.2 MACRÓFAGOS .....	56
<b><u>3 JUSTIFICATIVA DOS OBJETIVOS.....</u></b>	<b><u>61</u></b>
<b><u>4 OBJETIVOS .....</u></b>	<b><u>62</u></b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	62
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	62
<b><u>5 ESTRATÉGIA GERAL DE TRABALHO .....</u></b>	<b><u>63</u></b>

<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>64</b>
6.1	ANIMAIS	64
6.2	CÉLULAS	64
6.3	MATERIAIS E REAGENTES	64
6.3.1	CULTIVO CELULAR	64
6.3.2	MEDICAMENTOS	65
6.3.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA	65
6.3.4	IMUNOCITOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	65
6.3.5	MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	65
6.4	MÉTODOS GERAIS	66
6.4.1	PROCEDIMENTO DE ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAL DE VIDRO E ACESSÓRIOS	66
6.4.2	PROCEDIMENTOS DE ESTERILIZAÇÃO DOS MEDICAMENTOS	66
6.4.3	SOLUÇÕES E MEIO DE CULTURA UTILIZADOS NOS PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR	66
6.4.4	SOLUÇÕES UTILIZADAS NA MENSURAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO	67
6.5	MÉTODOS DE ESTUDOS	68
6.5.1	OBTENÇÃO E CULTIVO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO	68
6.5.2	TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DOS MACRÓFAGOS	69
6.5.3	DIVISÃO DAS CÉLULAS EM GRUPOS DE ESTUDO DE ACORDO COM OS MEDICAMENTOS	69
6.5.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA	70
6.5.5	ANÁLISE DE CITOCINAS	71
6.5.6	TRIAGEM DOS MEDICAMENTOS	73
6.5.7	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	73
6.5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
7.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA	75
7.2	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	84
7.2.1	FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	85
7.2.2	INTERFERON- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	86
7.2.3	INTERLEUCINA-5 (IL-5)	93
7.2.4	INTERLEUCINA-4 (IL-4)	95
7.2.5	INTERLEUCINA-2 (IL-2)	100
7.3	TRIAGEM DOS MEDICAMENTOS	102
7.4	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS <i>IN VITRO</i> COM OS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS	104
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>116</b>

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - RESUMO DA PATOGENESIA DE CADA MEDICAMENTO.....	21
QUADRO 2 - PUBLICAÇÕES RECENTES COM O MEDICAMENTO CANOVA EM REVISTAS INTERNACIONAIS.....	32
QUADRO 32 - RESULTADOS DA MORFOLOGIA E DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	88

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SAMUEL HAHNEMANN.....	01
FIGURA 2 - <i>Aconitum napellus</i> .....	13
FIGURA 3 - ARSENOPIRITE.....	14
FIGURA 4 - SAIS ARSENICAIS.....	14
FIGURA 5 - <i>Belladonna</i> .....	15
FIGURA 6 - <i>Bryonia alba</i> .....	6
FIGURA 7 - <i>Lachesis muta</i> .....	18
FIGURA 8 - CINÁBRIO.....	19
FIGURA 9 - <i>Mercurius solubilis</i> .....	19
FIGURA 10 - <i>Thuja occidentalis</i> .....	20
FIGURA 11 - FORMAÇÃO DO “COMPLEXO SANDUÍCHE”.....	57
FIGURA 12 - MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS RESIDENTES DO GRUPO CONTROLE SEM TRATAMENTO E DOS MACRÓFAGOS ATIVADOS DO GRUPO CONTROLE POSITIVO COM O MEDICAMENTO CANOVA.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH6 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....64
- GRÁFICO 2 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH12 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....65
- GRÁFICO 3 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH30 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....66
- GRÁFICO 4 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH200 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....67
- GRÁFICO 5 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NAS POTÊNCIAS DECIMAIS SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....68
- GRÁFICO 6 - MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS QUE MOSTRARAM ATIVAR A LIBERAÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  NOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.. .....73
- GRÁFICO 7 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 6, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....74
- GRÁFICO 8 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 12, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....75
- GRÁFICO 9 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 30, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....76
- GRÁFICO 10 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 200, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....77

GRÁFICO 11 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, EM POTÊNCIAS DECIMAIS, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-5 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....	79
GRÁFICO 12 - MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS QUE MOSTRARAM ATIVAR A PRODUÇÃO DE IL-4 PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO QUANDO TRATADOS <i>IN VITRO</i> .....	81
GRÁFICO 13 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 30, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-4 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....	82
GRÁFICO 14 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 200, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-4 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....	83
GRÁFICO 15 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, EM POTÊNCIA DECIMAL, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-4 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....	84
GRÁFICO 16 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 30, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-2 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....	86
GRÁFICO 17 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS RESULTANTES DA TRIAGEM SOBRE A PRODUÇÃO DE NO REALIZADA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.....	90

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DH	- escala decimal Hahnemanniana
CH	- escala centesimal Hahnemanniana
Th1	- linfócito T helper 1
Th2	- linfócito T helper 2
TNF- $\alpha$	- fator de necrose tumoral- $\alpha$
IFN- $\gamma$	- interferon- $\gamma$
IL	- interleucina
LPS	- lipopolissacarídeo
MO	- macrófago
iNOS	- óxido nítrico sintase induzível
DMEM	- <i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
MHC	- major histocompatibility complex class
NO	- óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- ânion superóxido
OH <sup>•</sup>	- radical hidroxil
OONO <sup>-</sup>	- peroxinitrito
RNS	- intermediários reativos do nitrogênio
ROS	- intermediários reativos do oxigênio
SFB	- soro fetal bovino
PBS	- Phosphate Buffer Solution
MC	- Medicamento Canova
Ar	- <i>Arsenicum album</i>
Ac	- <i>Aconitum napellus</i>
Br	- <i>Bryonia alba</i>
Th	- <i>Thuya occidentalis</i>
La	- <i>Lachesis muta</i>
Me	- <i>Mercurius solubilis</i>
Be	- <i>Belladonna</i>

## RESUMO

Homeopatia é um sistema terapêutico usado por milhões de pessoas há 200 anos. Macrófagos estão envolvidos em muitos diferentes processos, cujas principais funções são fornecer uma linha de defesa contra microrganismos invasores e células tumorais. Uma vez que medicamentos homeopáticos visam a ativação das próprias defesas do organismo para eliminar a doença, estudos baseados em cultivos obtidos de macrófagos podem ser úteis para esclarecer algumas questões. Com esse objetivo, nós estudamos os efeitos do tratamento *in vitro* de sete medicamentos homeopáticos, amplamente usados, em diversas diluições sobre os macrófagos obtidos de camundongos. Macrófagos foram obtidos de camundongos suíços e as culturas foram tratadas com 20% de cada solução sucussionada. *Aconitum napellus* (Acon), *Arsenicum album* (Ars), *Belladonna* (Bell), *Bryonia alba* (Bry), *Lachesis muta* (Lach), *Mercurius solubilis* (Merc sol) and *Thuya occidentalis* (Thuj) foram testados em diversas diluições (CH e DH) com três grupos controles: tratadas com o medicamento Canova, com etanol a 1% e sem tratamento algum. As células foram fixadas, coradas e observadas em microscopia de luz. Citocinas Th1/Th2 foram mensuradas no sobrenadante da cultura através do citômetro de fluxo. A produção de NO foi detectada no sobrenadante da cultura através de reação com o reagente de Griess. 50ng/ml LPS and 26U/ml IFN- $\gamma$  foram usados como controle positivo. Após essas duas análises nós fizemos uma sobreposição dos dados e foi possível distinguir dois grupos de medicamentos baseados em respostas imunes Th1 e Th2. O primeiro grupo, Th 30CH; La 12, 200; CH, Ar 6CH; Me 6, 12CH; Be 6, 30 e 200CH, mostrou aumento na liberação de IFN- $\gamma$ . E o segundo grupo, Ac 30CH; Me 200CH, aumentou a liberação de IL-4. As outras citocinas testadas, TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-5, não foram alteradas com a metodologia estudada. Todos os medicamentos acima testados induziram a produção de NO. IFN- $\gamma$  possui um importante papel na promoção de respostas Th1 participando na defesa do hospedeiro contra infecções virais e agentes patológicos juntamente com NO. IL-4 leva a imunidade humoral via resposta Th2 e está envolvida na proliferação e diferenciação de células B, além de ter um importante papel na inflamação e hematopoiese. Nosso estudo mostrou que vários medicamentos preparados homeopaticamente, mesmo aqueles que ultrapassam o número de Avogadro, atuam sobre macrófagos peritoneais de camundongos, quando tratados *in vitro*, ativando-os morfológicamente, estimulando a produção de citocinas Th1/Th2 e de óxido nítrico.

## ABSTRACT

Homeopathy is a 200-year-old therapeutic system, which has been used by millions of people. In spite of the fact that homeopathic practitioners often paint a convincing picture of homeopathy clinical effectiveness, research evidences explaining how it actually works are lacking. Macrophages are involved in many different processes but their main function is to provide a defense line against microbial invasion and tumor cells. Once homeopathic medications are aimed at activation of the body's own defense mechanisms to fight an existing disease, assays based in macrophages culture may be useful to enlighten some questions. We now carry on an investigation to evaluate the effects of *in vitro* administration of seven widely used homeopathic compounds in several dilutions on mice macrophages. Well-structured methodological studies may be useful to understand how homeopathy treatment works. Macrophages were obtained from Swiss mice and the cultures were treated *in vitro* with 20% of succussioned solutions of *Aconitum napellus* (Acon), *Arsenicum album* (Ars), *Belladonna* (Bell), *Bryonia alba* (Bry), *Lachesis muta* (Lach), *Mercurius solubilis* (Merc sol) and *Thuja occidentalis* (Thuj) were tested in several CH dilutions with three control groups: treated with Canova medication, with 1% ethanol and without treatment. The cells were fixed, stained and observed under light microscopy. Mouse Th1/Th2 cytokine CBA kit for flow cytometry was used to determine cytokines in the culture supernatant. NO generation was estimated in cell-free supernatant, which was mixed with an equal volume of Griess reagent. 50ng/ml LPS and 26U/ml IFN- $\gamma$  were used as positive control. It was possible to distinguish two groups of medication based Th1 and Th2-type response: the first group, Thuj 30CH; Lach 12, 200; CH, Ars 6CH; Merc sol 6, 12CH, Bell 6, 30 and 200CH, presented an increase in IFN- $\gamma$  production and the second one, Acon 30CH; Merc sol 200CH, increased IL-4 production. The others supernatant cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-2 and IL-5, were not altered when this methodology was applied. All tested medication induced NO production. IFN- $\gamma$  plays a role in promotion Th1 cell responses. It is an important cytokine in the host defense against infection by viral and microbial pathogens together with NO. IL-4 leads to Th2-type humoral immunity and it is involved in the proliferation and differentiation of B cells and IL-4 has an important role in inflammation and hematopoiesis. All together these data indicate that even the most diluted medication used, CH200, show a biological response, as observed on macrophages metabolism, activated morphologically, cytokine and oxide nitric production.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde 1997, o nosso grupo de estudo vêm encontrando diversos resultados importantes em trabalhos realizados no laboratório de Estudos de Células Neoplásicas e Inflamatórias da Universidade Federal do Paraná, tendo como foco de estudo o medicamento Canova. Este medicamento desenvolvido na Argentina no século XX por Francisco Canova, tem como base de manipulação e técnica terapêutica o sistema homeopático, o qual usa substâncias especialmente preparadas e altamente diluídas para colocar em ação os mecanismos de cura do próprio corpo (JONAS; JACOBS, 1986).

A pesquisa laboratorial com medicamentos homeopáticos é muito escassa; a maioria dos estudos realizada é de natureza clínica, com metodologias variadas, resultados polêmicos e duvidosos com relação a sua real eficiência de cura. Mesmo assim o número de pessoas que utiliza esse sistema terapêutico é grande, quando comparados aos demais métodos de tratamento. Há registros do uso de medicamentos homeopáticos pela população mundial. Na Europa, homeopatia é a mais frequente terapia médica complementar e alternativa usada em 5 dos 14 países e entre as três mais frequentemente usadas em 11 dos 14 países. Entre 20 e 25% de todos os cidadãos da União Européia usam a medicina homeopática. Além do mais, algumas companhias de seguro e planos de saúde reembolsam tratamentos homeopáticos dos pacientes (VIKSVEEN, 2003).

Desconhece-se dados gerais de uso da homeopatia pela população brasileira. Entre a comunidade de professores de medicina no Brasil, apesar de 60% dos docentes admitirem baixo conhecimento sobre a terapêutica, 80% admitiram razoável ou grande utilidade da homeopatia e 54% admitiram ser a mesma efetiva e resolutiva para alguns dos problemas de saúde (OLIVEIRA, 1996). Desta forma, há grande necessidade de se entender os seus mecanismos de ação no organismo.

Pesquisas com medicamentos homeopáticos são questionados, principalmente, em relação a metodologia aplicada. Como o medicamento Canova é formado por 5 substâncias diferentes, é considerado um complexo, não sendo bem aceita pelos homeopatas brasileiros, de tradição unicistas. As solicitações dos homeopatas, sempre repetidas após as palestras, era de que o grupo pesquisasse os componentes do medicamento Canova em separado, já que eram de ampla

utilização. Portanto, atendendo essas solicitações e também com o objetivo de verificar se o cultivo de macrófagos era bom modelo biológico para estudar a ação de outros medicamentos homeopáticos, desenvolveu-se essa pesquisa.

O objetivo da homeopatia é estimular os mecanismos de cura do próprio corpo. O nosso modelo de estudo utiliza uma das células responsáveis por essa tarefa, os macrófagos e, como já tínhamos conhecimento de alguns resultados de sua ativação quando tratados com o medicamento Canova, essa pesquisa com os diversos medicamentos homeopáticos, utiliza o Canova como controle positivo, tornando possível uma comparação dos resultados finais desse trabalho com os anteriores.

Como não tínhamos conhecimento da ação dos diversos medicamentos que compõe a farmacopéia homeopática e que poderiam estar atuando em macrófagos, nos reunimos com dois médicos homeopatas, Patrícia Eduardo Silveira CRM-PR 7322 (mail:pebsilveira@hotmail.com) e Luís Antônio Batista da Costa – CRM-PR 8920 (mail:labcosta@terra.com.br), para que nos auxiliassem na escolha dos medicamentos. Assim chegamos a *Aconitum napellus*, *Bryonia alba*, *Thuja occidentalis*, *Arsenicum álbum* e *Lachesis muta* (componentes do Canova), e mais *Belladonna* e *Mercurius solubilis*.

A escolha das potências desses medicamentos usados no estudo também foram decididas nessa reunião. Quanto aos componentes do medicamento Canova, também seriam usadas potências na escalas decimais, para verificar a toxicidade de cada medicamento. Para isto foram escolhidas as potências decimais finais do medicamento, após a sua manipulação como complexo, assim como as potências mais comuns prescritas na clínica médica, estipuladas como CH6, CH12, CH30 e CH200. E estas mesmas ficariam também para a *Belladonna* e o *Mercurius solubilis*.

Feita essa eleição dos medicamentos com suas respectivas potências, iniciaram-se os estudos de possível ação desses medicamentos homeopáticos via macrófagos. Para essa avaliação foram escolhidos os seguintes parâmetros: análise morfológica, produção de algumas citocinas e posteriormente a produção de óxido nítrico.

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 HOMEOPATIA

#### 1.1.1 Definição

FIGURA 1- SAMUEL HAHNEMANN



A palavra homeopatia vem do grego e significa semelhante à doença (TOLEDO, 1910). Tem por base tratar as enfermidades usando uma série de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, todas em quantidades ínfimas, usando um processo de preparação especial, com o objetivo de colocar em ação os mecanismos de cura do próprio corpo (JONAS; JACOBS, 1996). Esse sistema terapêutico foi criado no século XVIII pelo médico

alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843) (figura 1), fundamentado no princípio da similitude "*similia similibus curantur*" que significa o "semelhante cura o semelhante" (BAROLLO, 1995).

Há três princípios básicos que distinguem a homeopatia dos outros sistemas terapêuticos. Esses princípios são 1- individualização, incluindo a seleção de medicamentos usando o princípio dos semelhantes; 2- promoção da autocura, usando a dose mínima de um medicamento; 3- uso da totalidade dos sintomas para avaliar os padrões de cura (JONAS; JACOBS, 1996).

1-

1a- Individualização e o princípio dos semelhantes

O princípio da lei dos semelhantes afirma: se uma substância pode fazer mal a uma pessoa saudável em grandes doses, possui, em doses minúsculas, igual potencial para curar o mesmo problema, estimulando a energia natural do organismo e permitindo-lhe curar-se a si próprio (HAYFIELD, 1999).

Hipócrates, médico grego do século V a. C., conhecido como “pai da medicina”, foi a primeira pessoa que compreendeu o princípio que trata organismo com um remédio que produz sintomas similares a doença sofrida (SHEALY, 1999). A lei dos semelhantes aparece mais claramente na primeira sistematização da Medicina ocidental, com Hipócrates, que na terapêutica fez uso da Higiene Geral, empregou meios que de alguma forma pudessem levar o organismo a imitar os meios naturais de cura através de eliminações. Empregou substâncias capazes de causar os mesmos sintomas que se deveria curar nos pacientes (JONAS; JACOBS, 1996).

No entanto, é já no início da Idade Média que a lei dos semelhantes vai aparecer de forma mais universal e numa linguagem científica. Primeiro com Paracelso que fala no seu Prólogo Terceiro (sobre os modos e as maneiras de curar): “Medicina dos Espíritos: Seus espíritos cuidam e curam as enfermidades mediante filtros e infusões que coagulam o espírito de determinadas ervas e raízes, cuja própria substância foi anteriormente responsável pela doença (*similia similibus curantur*). Paracelso indicava seus medicamentos procurando encontrar semelhanças dessas características para com aquelas dos pacientes. É a lei dos semelhantes em sua interpretação (NOGUEIRA et al., 1986)”.

#### 1b - Individualização e unicidade

Através de Hipócrates chegou até nossos dias o maior monumento escrito da Medicina de todos os tempos, o *Corpus Hippocraticum*. Nestes escritos evidencia-se muito claramente a intenção de descobrir os mistérios da natureza, por uma observação imparcial e um conhecimento racional dos fenômenos. Essa postura, os hipocráticos a herdaram dos primeiros filósofos jônicos, indo além e formulando o conceito de natureza humana, que teriam como corolário imediato a individualização do ser humano, traço marcante da conduta hipocrática, considerando sempre o doente e não a doença, e tomando-o invariavelmente como um todo. Nada é mais marcante na Medicina Hipocrática (NOGUEIRA et al., 1986). Acreditava também que os sintomas específicos de uma pessoa, suas reações particulares a uma doença e as forças sanadoras próprias de cada pessoa eram importantes para o diagnóstico e a eleição da terapia. Sobre esta base construiu sua própria botica medicinal de remédios (SHEALY, 1999).

O homeopata pode usar certos sintomas para orientar a seleção do medicamento, mas parte-se do princípio de que os efeitos mais demorados e abrangentes virão de um medicamento que produza os sintomas mais semelhantes aos sintomas únicos da pessoa. Esse remédio induzirá a reação de cura daquela pessoa da melhor maneira.

## 2- Indução da autocura: a dose mínima

A meta da terapia homeopática é promover e orientar a reação de autocura inata do corpo. Os remédios não são dados para eliminar a causa de uma doença ou para vencer um determinado agente patológico, não são administrados em doses grandes ou freqüentes. Não é o medicamento em si que cura a doença, mas a reação dos mecanismos de cura do corpo ao medicamento que leva à melhora. Após o medicamento ter sido dado, o paciente é observado cuidadosamente para ver a mudança da sua reação de autocura em vários níveis. Se a pessoa for sensível ao medicamento, essa reação pode ser induzida mesmo com doses muito pequenas e sem a necessidade de serem repetidamente administradas.

## 3- Holismo: a totalidade dos sintomas e os padrões de cura

Uma segunda diferença entre a homeopatia e a medicina moderna posterior era que Hahnemann usava uma abordagem holística, sem excluir qualquer tipo de sintoma da avaliação. Na verdade, ele fazia uma tentativa proposital de incluir todos os sintomas experimentados pela pessoa que pareciam ser uma reação ao remédio. Em vez de dar importância variável a partes de uma doença, Hahnemann incluía todas, na crença de que expressavam alguma “força invisível”, unificada e inteligente que organizava toda a saúde e a doença humana.

Era a idéia pré-moderna conhecida como vitalismo, e essa “força” era considerada idêntica ao “espírito” e a fonte da vida. O conceito vitalista foi caindo em desagrado nos tempos modernos, à medida que a ciência e a tecnologia foram mais capazes de objetivar, predizer e manipular o mundo físico. Contudo, sua contribuição à homeopatia foi manter seu caráter holístico na medicina, ao tratar da doença humana como os pacientes a experimentavam, em vez de adotar a perspectiva da doença ou classificações patológicas (JONAS; JACOBS, 1996).

O tratamento compreende a supressão ou a eliminação dos sintomas com drogas. Mas muitos sintomas que se costuma apresentar como sinais da doença são, na verdade, sinais positivos de resposta imune sadia. A febre e a inflamação

são as estratégias que o corpo usa para lidar com os agentes estranhos ao organismo. Como resposta a infecções agudas nosso corpo pode liberar toxinas, assim como querer um descanso de uma vida agitada e estressante. Sintomas brandos são sinais de que o corpo está trabalhando eficazmente para eliminar a doença (SHEALY, 1999).

Nos orientais a relação dos semelhantes e a totalidade do homem, numa relação universal, aparecem no Princípio Único, que também mostra a causa única da moléstia, conforme reaparece em Paracelso, em Hahenmann e em Maffei (NOGUEIRA et al., 1986).

Hahnemann chegou assim à explicação de que sob o visível, o chamativo, que é a enfermidade anátomo-clínica evidente, há um fundo, uma desarmonia de todo o indivíduo, que é a verdadeira enfermidade, a fonte e a base de todas as enfermidades, desde um resfriado até um câncer, uma desarmonia que possibilita o desenvolvimento das enfermidades. A isso, que Hahnemann também chamou “mal primitivo” é o que se deve curar, porque essa é a enfermidade (BRONFMAN, 199?).

Esses dois aspectos da “ciência” homeopática, individualização e holismo, eram ao mesmo tempo o ponto forte e o ponto fraco da homeopatia. A ciência médica moderna tomaria uma direção diferente, agrupando os pacientes em categorias de diagnósticos e dividindo-os em vários sistemas orgânicos para o tratamento por diferentes especialidades.

Lei da cura: A homeopatia tem um padrão estabelecido de sintomas guias clínicos, que servem como referência para julgar como o paciente deve reagir após tomar um medicamento homeopático correto. Compiladas primeiramente no século XIX pelo médico Constantino Hering, essas diretrizes são muitas vezes citadas como as leis de “Hering”. O governo da Baviera encarregou Constantino Hering de estudar a homeopatia para poder proibi-la com fundamento. Hering cumpriu ao meio: estudou a homeopatia e se fez homeopata. De inquisidor passou a convertido. Logo emigrou aos Estados Unidos e desenvolveu toda sua tarefa científica na Filadélfia, onde escreveu uma obra fundamental em 9 tomos (JONAS; JACOBS, 1996).

### **1.1.2 Desenvolvimento da homeopatia**

Hahnemann desenvolveu esta abordagem no decorrer de um período de cinquenta anos. Já que os princípios que desenvolveu são basicamente os mesmos

usados atualmente na homeopatia, é útil entender um pouco acerca de suas origens.

Hahnemann viveu durante o nascimento do mundo moderno. Foi o período das guerras napoleônicas na Europa, das Revoluções Francesa e Americana e do desenvolvimento das formas modernas de governo democrático. Também foi o período na história ocidental chamado Iluminismo, quando se desenvolvia a idéia de que a razão poderia ser a principal fonte de conhecimentos e métodos de investigação científica. Era uma época de muitos pensamentos independentes e criatividade, o período de Newton, Goethe, Jenner e outros grandes pensadores nas artes e ciências. Como era época de transição, muitos conceitos desenvolvidos durante o Iluminismo continham elementos tanto da era medieval, mágica e religiosa, quanto da era moderna, científica e humanista.

A alquimia, por exemplo, era a química da Idade Média. Consistia em vários conceitos metafísicos e simbólicos aplicados ao mundo físico, em uma tentativa de explicar e controlar o mundo de forma indireta. Contudo, a química era uma disciplina incipiente que usava conceitos físicos para explicar e controlar o mundo de forma direta. Durante a vida de Hahnemann, várias substâncias químicas foram descobertas. O próprio Hahnemann era um excelente químico e desenvolveu vários métodos de extração de substâncias químicas, usados pelas farmácias durante anos.

Hahnemann era um pensador progressista, um crítico mordaz da medicina da sua época. Ele lia muito sobre terapias de vários países e defendia muitos tratamentos progressistas e humanos, a maioria da escola da higiene (JONAS; JACOBS, 1996). Como Hipócrates, Hahnemann foi um dos primeiros médicos a anunciar a importância da melhora da escassa higiene das casas e lugares públicos, e insistiu na importância de uma boa dieta, ar fresco e puro, alimento e água limpos e um melhor nível de vida para todos (SHEALY, 1999); além de defender um tratamento mais humano para doentes mentais em uma época em que o tratamento normal para tais pacientes era trancá-los e privá-los do contato humano. Censurava a inexistência de um método científico para selecionar e administrar terapias e dedicou sua vida à descoberta de uma forma de orientar racionalmente as terapias (JONAS; JACOBS, 1996).

Tudo começou com um desencanto. Hahnemann se sentiu decepcionado pela medicina de sua época, porque advertia que os médicos eram incapazes de curar as enfermidades. E não só isso, mas algo pior: que com suas medidas terapêuticas as agravavam. Então decidiu abandonar a medicina, mas como tinha uma família numerosa, esposa e muitos filhos, decidiu trabalhar com traduções de obras de medicina (BRONFMAN, 199?).

Foi durante a tradução de um texto médico em 1790 que Hahnemann descreveu o que seria a base do método homeopático. Estava traduzindo um livro sobre ervas de um famoso autor britânico, chamado William Cullen. Cullen declarou que a razão da eficácia de uma droga de nome quinina contra malária era seu amargor e adstringência. Hahnemann percebeu imediatamente a irracionalidade dessa explicação e relacionou vários outros remédios que eram ainda mais amargos e adstringentes que a quinina, mas que não tinham qualquer efeito em casos de malária. Em seguida, descreveu um experimento que realizou, usando a si próprio como cobaia que, segundo ele, demonstrava a razão pela qual a quinina atuava de forma eficaz contra a malária. Hahnemann então sugeriu, basicamente, que uma droga atua de forma terapêutica quando produz em uma pessoa saudável, sintomas semelhantes aos de uma pessoa doente (*similia similibus curantur*). Portanto, nasceu um sistema para o desenvolvimento científico da escola da semelhança, que orientaria a descoberta de outros medicamentos usados na homeopatia. Hahnemann e seus alunos continuaram testando dezenas dos medicamentos mais usados de forma semelhante. Deram-lhes a pessoas saudáveis (inclusive eles mesmos, suas famílias e amigos) e observaram e documentaram cuidadosamente os sintomas produzidos.

Embora o uso da matemática na ciência estivesse evoluindo rapidamente, na época de Hahnemann, sua aplicação à doença humana só se deu em grande escala após o trabalho de John Snow e o desenvolvimento da epidemiologia na década de 1840. Em vez de estudar grande número de pessoas de forma genérica, Hahnemann estudou um número pequeno de pessoas, mas cada uma de forma muito detalhada.

É importante ressaltar que Hahnemann baseou a seleção dos medicamentos eficazes nos rudimentos de um método experimental e, portanto, científico, que poderia ser testado. Era uma idéia nova para a medicina, mas era coerente com a

ciência, conforme entendida na época. Pelo menos, permitia a verificação empírica ou rejeição de um determinado fundamento lógico para a terapia. Isso, na verdade, não havia sido oferecido antes. Levou cerca de 150 anos para que as idéias decorrentes desses testes começassem a ser pesquisadas na forma reconhecida atualmente. Mas, na época da sua descoberta, a homeopatia tinha uma “ciência” mais avançada do que outras formas de medicina.

Conseqüentemente, vemos que a homeopatia teve suas origens em uma época da história em que se cruzaram os mundos medieval e moderno. Misturou idéias da alquimia e da química e as aplicou em uma forma individual e holística à doença. A homeopatia usou a indução (teste experimental) mais do que a dedução (teste teórico) como a base do seu sistema. Foi um produto do Iluminismo, uma mistura curiosa dos mundos antigo e moderno (JONAS; JACOBS, 1996).

Dessa maneira, na história da Homeopatia se confundem, na fase inicial de seus fundamentos doutrinários, a história da lei dos semelhantes, da visão do Homem Total e do Vitalismo, com a história de Hahnemann na sua consolidação e sistematização. Essas três postulações, bases da Homeopatia, confundem-se na sua história à própria história do Homem.

#### **1.1.2.1 Dinamização: o preparo de diluições altas**

A medicina moderna está atualmente começando a entender a importância do holismo e da imparidade individual no tratamento. Mas foi uma outra descoberta de Hahnemann que se mostrou a mais intrigante de todas.

##### **A diluição e a sucussão**

Após testar um remédio detalhadamente em várias pessoas, Hahnemann começou a testar a precisão desses perfis medicamentosos, usando-o nos enfermos. A princípio, deu-lhes a dose normal, mas teve o mesmo problema que abominava na prática convencional. Muitos dos medicamentos eram tóxicos e causavam efeitos colaterais nocivos. Começou então a diluir os medicamentos, administrando-os em doses cada vez menores. Ao contrário do que ele supôs – que, se reduzisse a dosagem dos medicamentos, eles se tornariam menos eficazes – descobriu que se fossem dados de acordo com o padrão de sintomas encontrados nas experimentações, eram mais eficazes e seu efeito mais duradouro (JONAS; JACOBS, 1996). Essas observações de Hahnemann evidenciaram que as doses

curativas eram sempre muito mais pequenas que as doses que haviam produzido sintomas semelhantes durante seus ensaios em um homem são (TOLEDO, 1910).

Hahnemann começou a usar a “sucussão”, ou seja, a agitar as diluições enquanto eram feitas. Por mais estranho que pareça atualmente, na época era uma prática comum – os alquimistas freqüentemente sacudiam, mexiam e realizavam várias outras manipulações nas soluções a fim de ativar a “força vital” ou “espiritual” que acreditavam ser inerente a todas as substâncias.

Embora sua intenção original tenha sido reduzir os efeitos tóxicos dos medicamentos, Hahnemann afirmou que o processo de sucussão entre cada diluição tornava os remédios mais ativos e específicos aos indivíduos sensíveis a eles. Quando preparados dessa maneira, que Hahnemann chamava de “dinamização”, a eficácia do medicamento dependia ainda mais da adequação detalhada do quadro sintomático do teste ao quadro sintomático único do paciente. Quando esses quadros eram criteriosamente combinados, de acordo com Hahnemann, essas “dinamizações” estimulavam a reação e autocura e os pacientes se “curavam” da doença (JONAS; JACOBS, 1996).

O processo de dinamização, isto é, a liberação da energia dinâmica nos medicamentos por intermédio de vibração molecular (sucussão ou trituração) é do fim do século XVII, antes do aparecimento da primeira edição do “Organon”, em 1810. Um cientista no início do século XX, Albert Robin, em 1905, escreveu: “O medicamento não age pela sua massa e sim pelo seu dinamismo”.

Potência diz-se do resultado final de cada etapa do processo de dinamização e diluição (NOGUEIRA et al., 1986).

O poder curativo se manifestaria com a menor dose possível do medicamento dinamizado, de modo que a dose contivesse, quase que exclusivamente, só a força medicamentosa pura, livremente desenvolvida, do tipo não material, produzindo apenas dinamicamente efeitos tão poderosos que nunca seriam obtidos com a substância medicamentosa pura, mesmo que ingerida em grandes quantidades (RUIZ, 1999).

Hahnemann, a princípio, mandava dar 2 sucussões e depois foi elevando o número até 200, fixando-se em 100, na 6ª Ed. do Organon. Não há hoje uma uniformidade no que se refere ao número de sucussões. Os laboratórios e as

farmácias executam o processo da dinamização por via líquida, de acordo com a tradição do seu proprietário ou de acordo com algumas farmacopéias.

Na Farmacopéia Brasileira, aprovada em 1977, o número aconselhado era de 10 para as decimais e 20 para as centesimais; posteriormente a Comissão de Estudos da Farmacopéia Homeopática Brasileira, entre outras soluções, resolveu modificá-la no que se refere ao número de sucussões necessárias ao preparo dos medicamentos homeopáticos e em lugar de 10 sucussões, como era estabelecido anteriormente, passou a exigir 100 como número mínimo de agitações. Ficou assim resolvido um problema técnico, que há muito vinha preocupando os homeopatas brasileiros (NOGUEIRA et al., 1986).

### **1.1.2.2 Nomenclatura dos Medicamentos Homeopáticos**

A grafia dos medicamentos homeopáticos obedece aos ensinamentos de Hahnemann, que adotou a língua latina e as regras da nomenclatura botânica. A grafia é a aprovada pela Liga Homeopática Internacional. Os medicamentos são representados pelos nomes seguidos de um ou mais algarismos, formando um número e antepostos do símbolo da escala que se deseja; ex.: *Bryonia alba* CH 12, onde o medicamento foi preparado pela escala centesimal até a 12ª potência. Simbolizamos a escala centesimal, mais usada, pela letra C ou CH (maiúsculas), a escala decimal por D, DH ou X (maiúsculas) e a escala cinqüenta milésimal por /50.000, precedida pela potência que se deseja em algarismos romanos, ex.: VIII/50.000 (oitava potência da escala cinqüenta milésimal) (NOGUEIRA et al., 1986).

### **1.1.2.3 A divisão molecular**

A idéia das dinamizações e diluições altas se tornaria uma das principais áreas de controvérsia no sistema homeopático. Hahnemann e outros cientistas precursores entendiam que deveria haver um limite físico para a diluição de uma substância original, a partir do qual não haveria mais qualquer resíduo da substância original. Contudo, na época da origem da homeopatia, ninguém sabia qual era esse limite real de diluição e os homeopatas relatavam efeitos notáveis com diluições altíssimas.

Mais tarde, um cientista chamado Amadeo Avogadro descobriu que se a substância fosse diluída doze vezes a uma proporção de um para cem, a

probabilidade de ter qualquer resíduo da molécula original no preparado era praticamente zero. Contudo, diluições superiores a essa tinham sido usadas com sucesso durante décadas antes dessa descoberta. A questão acerca da diluição e da dinamização não só se tornaria um dos principais pontos de controvérsia entre a homeopatia e a medicina convencional moderna, como ainda é uma das principais áreas de conflito dentro da comunidade homeopática propriamente dita (JONAS; JACOBS, 1996).

#### **1.1.2.4 Eleição dos medicamentos**

##### **1.1.2.4.1 O quadro sintomático**

Na sua tentativa de curar as doenças, a força vital faz com que o corpo produza sintomas. Ao conjunto desses sintomas os homeopatas chamam quadro sintomático. Estes sintomas não só refletem o que se passa no interior, como também indicam qual a ajuda externa ou energia adicional é necessária (HAYFIELD, 1999).

O homeopata primeiro obtém um relato detalhado de todos os sintomas, sinais e outras características únicas, tanto físicas quanto mentais, da pessoa enferma. Em seguida, examina as descrições dos perfis dos remédios detalhados nos livros de homeopatia, chamados de *Materia Medica*, em latim (JONAS; JACOBS, 1996).

A totalidade dos sintomas é usada para escolher qual o melhor medicamento e a dinamização desse medicamento ou sua potência.

Para entender os efeitos que produz a homeopatia, compara-se a ação das doses infinitesimais com um efeito que todos conhecem, da transformação da água do estado líquido em vapor. Supomos uma única gota de água. Uma única gota de água não é nada. Mas fechemos esta gota de água dentro de uma esfera de grossas paredes de metal. Agora, colocamos esta esfera no fogo, de forma que se consiga transformar a gota de água em vapor. Continuemos com essa esfera no fogo, de modo que o vapor formado pela gota de água, se divida em partículas de vapor cada vez menores. Seguiria dessa forma até que, pela ação prolongada do fogo, essa esfera estouraria em vários pedaços. A força que adquire a gota de água transformada em vapor é semelhante à dinamização e se equipara a homeopatia

pela forma de preparação de todos os seus remédios. A força de todos os remédios homeopáticos internos está sempre em razão direta de sua maior divisão ou dinamização (TOLEDO, 1910).

#### 1.1.2.4.2 Matéria médica

Uma vez testados, os remédios podem ser usados para sempre, não entrando ou saindo de moda. Quase todos os cem remédios originais de Hahnemann são hoje constantemente usados. A descrição pormenorizada dos remédios consta de grandes volumes chamados de Matéria Médica. Os remédios podem vir enumerados noutro livro pormenorizado chamado Repertório Homeopático, que na verdade é um índice remissivo da Matéria Médica (HAYFIELD, 1999).

Conhecendo a Matéria Médica, o homeopata está preparado para comparar os sintomas da pessoa com o quadro sintomático do remédio. A isto se chama encontrar o *similimum*, ou semelhante (TOLEDO, 1910).

Alguns remédios homeopáticos como *Aconitum napellus*, *Arsenicum album*, *Belladonna*, *Bryonia alba*, *Mercurius solubilis*, *Tuya occidentalis*, *Lachesis muta* são remédios tão conhecidos que são indicados para uso no estojo de primeiros-socorros (HAYFIELD, 1999).

##### 1.1.2.4.2.1 *Aconitum napellus* (aconitum, acônito, napelo)

FIGURA 2 – *Aconitum napellus*



Esta planta conhecida como acônito ou napelo é utilizada por seu veneno durante séculos. Os caçadores emergiam as pontas de suas flechas em seu suco para caçar os lobos, de onde vem um de seus nomes populares “wolfsbane”, veneno de lobo. Cresce em montanhas européias (MARKS, 1997; SHEALY, 1999). O remédio é produzido a partir da tintura-mãe extraída das flores extremamente venenosas, sendo, portanto, tóxica ao homem (SHEALY, 1999).

Os princípios ativos mais importantes são os alcalóides terpenóides que têm relação com aminas vaso ativas, cuja ação fisiológica atua em inflamações, na contração cardíaca e no tônus gastrointestinal, entre outras.

Usos gerais:

Nas potências homeopáticas o *Aconitum napellus* é curativo nos transtornos decorrentes do medo, angústia, ansiedade e é também um dos principais remédios homeopáticos para dor. É muito usado pelos homeopatas profissionais contra sintomas e estados exagerados que ocorrem subitamente e com muita intensidade (SHEALY, 1999), em geral provocados por medo ou exposição a ventos frios. O remédio ajuda no início de resfriados; corrimento nasal claro, quente, logo após arrepios de frio; estado febril com calores, arrepios de frio, inquietude e inquietação; febre alta que se iniciam repentinamente, caracterizando inflamação, com temperatura maior de 38 graus e com pele ardente; suor e sede; cabeça quente; dor de ouvido com dor de garganta, durante a primeira hora pode-se administrá-lo alternando com *Belladonna* (MARKS, 1997; TOLEDO, 1910).

#### 1.1.2.4.2 *Arsenicum álbum* (trióxido de arsênico)

FIGURA 3 – ARSENOPIRITA



FIGURA 4 – SAIS ARSENICAIIS



O arsênico está presente na arsenopirita (FIGURA 3), mineral encontrado na Inglaterra, Alemanha, Canadá, etc. Fornece sais arsenicais muito úteis em anemias, parasitoses intestinais e aumento de peso corporal. Tragado em doses grandes, origina um transtorno estomacal grave, vômitos, convulsões, diarreia e se não tratado, leva a morte (SHEALY, 1999). Essa substância venenosa foi experimentada por Hahnemann pessoalmente (MARKS, 1997).

Usos gerais:

As dinamizações desse mineral são feitas a partir da sua trituração. A indicação típica desse metal está na esfera emocional do paciente, principalmente em quadros de ansiedade, inquietude, desespero e prostração.

É usado pelos homeopatas em muitas condições mentais e emocionais sérias e corresponde ao repertório de sintomas caracterizados por ansiedade, desassossego, dores ardentes que são como calores e fraqueza desproporcional à doença. Febre do feno: espirros contínuos; sensação de nariz muito pequeno e irritado por dentro (MARKS, 1997).

#### 1.1.2.4.2.3 Belladonna (Beladona)

FIGURA 5 – *Belladonna*



Esta planta venenosa cresce por toda a Europa (HAYFIELD, 1999; SHEALY, 1999). Acredita-se que na Idade Média, a mortal belladonna era utilizada em bruxaria. Em italiano significa “bela mulher”, e as italianas a utilizam em gotas para os olhos, com o fim de dilatar-se a pupila e tornarem-se mais atraentes. Na medicina convencional, são utilizadas as virtudes dos alcalóides atropina, hiosciamina e escopolamina para tratar os espasmos e náuseas. O remédio homeopático se prepara com as folhas e flores frescas. Hahnemann a provou pela primeira vez em 1799 (SHEALY, 1999).

##### Usos gerais:

Os sintomas são intensos, surgindo com rapidez; ocorre uma febre alta, com a pele ardente; a cabeça está sempre muito quente, irradiando calor, ao passo que os pés e mãos estão frios ao toque; a pessoa parece quente e corada, com a pele seca; os olhos parecem vidrados, com as pupilas dilatadas; pode haver a queixa de cabeça latejando; a respiração pode ser superficial e rápida; seca; a despeito de seu calor, não há suor e, geralmente, nem sede – ou muita sede por água gelada e limonada. Piora com movimentos e fica pior ainda às 3 da tarde e à noite. Muito sensível ao toque. Enxaqueca, com sensibilidade ao barulho, ao toque e à luz. (MARKS, 1997).

Quando se nota irritação nos olhos, calor ardor lacrimações, sensação de quente, se alterna *Belladonna* com *Mercurius solubilis*. Quando tem a respiração quente, calor, olfato muito sensível ou febre, se alterna com *Mercurius solubilis* ou *Aconitum* (TOLEDO, 1910).

#### 1.1.2.4.2.4 *Bryonia alba* (nabo-do-diabo)

FIGURA 6 – *Bryonia alba*



Planta trepadeira que cresce em toda Europa. As raízes são enormes e armazenam muita água (HAYFIELD, 1999).

O grego Hipócrates foi um dos primeiros médicos que utilizou a bryonia, no século V a.C. Os romanos também a utilizaram para tratar paralisia, gota, histeria e epilepsia. A planta tem uma raiz amarga que quando ingerida pode causar a morte em questão de horas (SHEALY, 1999). Foi um dos primeiros medicamentos provados por Hahnemann tendo um valor incalculável na homeopatia pois possui seus sintomas muito definidos. Foi largamente utilizado para muitas doenças durante os últimos 100 anos (MARKS, 1997; CANOVA DO BRASIL, 2001; SHEALY, 1999).

Possui saponinas derivadas da fenentrona cuja fórmula química é a base de hormônios como o estradiol, a androsterona, a progesterona e corticosteróides.

A tintura-mãe desta é a planta é feita a partir de sua raiz fresca (CANOVA DO BRASIL, 2001) a qual é obtida amassando-se a raiz até virar uma massa (SHEALY, 1999)

Usos gerais:

Os principais sintomas do repertório são mal-estares que começam um dia mais ou menos depois de exposição ao frio, ou a ventos frios e secos. O mal-estar começa devagar. Os sintomas tendem a desenvolver-se lentamente e pode se tornar crônico. As doenças costumam começar pela manhã e deixar a vítima cansada, lerda e incapaz de pensar com clareza (MARKS, 1997; HAYFIELD, 1999).

A *Bryonia* é indicada para aqueles a quem parece faltar, “lubrificação” (HAYFIELD, 1999). As regiões do corpo afetadas parecem secas: nariz, garganta, trato respiratório e juntas; pode ficar constipado, com fezes duras e secas que parecem as de carneiro; sente sede; quer beber muita água gelada; lábios secos; gripe que se instala gradualmente; aumentando cada vez mais a irritação; a tosse é seca e dá dor no peito (ou cabeça) de modo que segura o peito quando tosse; caminhar ou entrar num aposento aquecido faz tossir; homeopatas experientes podem usar este remédio para tratar pleuresia e pneumonia caracterizados por dor

aguda ao respirar; forte dor de cabeça, que piora a cada movimento-mesmo dos olhos (MARKS, 1997).

#### 1.1.2.4.2.5 *Lachesis muta* (surucucu)

FIGURA 7 – *Lachesis muta*



Esta serpente nativa das Américas Central e Sul é extremamente venenosa. O seu veneno possui ação hemolítica, tem o efeito de destruir membranas plasmáticas pela união com proteínas da superfície celular, tornando permeáveis as membranas para diferentes substâncias e elementos. Pode de causar morte imediata.

Para fazer o medicamento utiliza-se o veneno desse ofídio, o qual foi provado pela primeira vez pelo Dr. Constantino Hering em 1837, injetando-se o veneno quando ele estava na selva amazônica (SHEALY, 1999).

Sua patogenesia homeopática é muito vasta. As dinamizações deste veneno podem ser indicadas, entre outros, em processos inflamatórios com tendência a tornar-se gangrenosa, inflamação edematosa e secreções muito fétidas.

Usos gerais:

Remédio que constitui o recurso de maior valor em todos os casos de enfermidades graves, quando todas as funções do corpo estão comprometidas.

Remédio especial para o sexo feminino, que intervem com muitíssima eficácia em todos os sintomas que caracterizam os transtornos da menopausa.

Para infecções da garganta ou do esôfago como manifestações de paralisia ou falta de sensibilidade para deglutir os alimentos, de onde se origina o temor de tragar até líquidos por achar que com eles se engasgará.

Para todos os estados de agravações em todas as enfermidades em pessoas de ambos os sexos. Dificuldade dificuldade de respirar, necessidade de permanecer sentado para poder respirar, etc. Para dores na região do fígado com urina forte de odor desagradável com cor de chá ou de vinho seco, sem sedimento.

As dinamizações de *Lachesis* também são indicadas para doenças do sangue, com manifestações externas na pele, como manchas verdes escuras

parecidas com hematomas, doloridos ao tato. Geralmente aparecem na menopausa. Para hemorragias, de cor escura com dificuldade de coagular de marcado mau odor. Em todos os casos em que se nota a língua seca, com manchas escuras.

Entre as partes afetadas estão o lado esquerdo do corpo, a circulação, o sistema nervos e os órgãos reprodutores femininos (SHEALY, 1999).

Dores de garganta, muito pior do lado esquerdo. Dores e tensão menstruais que melhoram quando o fluxo começa (HAYFIELD, 1999).

#### 1.1.2.4.2.6 *Mercúrius solubilis* (mercúrio)

FIGURA 8 – CINÁBRIO



FIGURA 9 - *Mercurius solubilis*

Mercúrio líquido



É extraído do cinábrio (figura 8), mineral presente em fontes termais e vulcões. Este metal líquido se dissolve em ácido nítrico diluído e forma partículas que se secam e pulverizam para usos homeopático. Nos últimos séculos, este elemento tem sido utilizado por várias medicinas (SHEALY, 1999).

Usos gerais:

Usa-se em estados infecciosos agudos em que as glândulas e suas secreções estejam especialmente infectadas.

- Suores profusos e sede aumentada.
- O hálito, o suor e as secreções têm, em geral, mau cheiro.
- A língua está flácida, amarela e saburrosa.
- Febres oscilantes.
- Irritabilidade e inquietude (HAYFIELD, 1999).

Para as enfermidades da pele que sangram facilmente, ulcerações varicosas, eczemas, etc. Para as enfermidades das membranas mucosas, brônquios, corizas

com abundantes mucosidades. Para o fígado, icterícia. Para diarréias líquidas ou diarréias biliosas. Para gonorréias ou blenorragias (TOLEDO, 1910).

#### 1.1.2.4.2.7 *Thuja occidentalis* (Tuya, árvore-da-vida)

FIGURA 10 – *Thuja occidentalis*



Vem da palavra grega que significa sacrifício. Nos sacrifícios pagãos, esta árvore de folhas perenes era queimada quando se executavam as vítimas. Essa espécie cresce no Canadá, de onde os indígenas utilizavam seus ramos e folhas para o reumatismo, gota e malária. A tintura-mãe é preparada a partir de macerados de suas folhas aromáticas e ramos até formar uma polpa que serve para confeccionar o remédio. É nativa da Virgínia (USA), Canadá, Europa e Sibéria (SHEALY, 1999).

Usos gerais:

Ela apresenta uma extensa patogenia, contudo é principalmente indicada em dores de cabeça e nevralgias intensas (SHEALY, 1999).

Para todas as infecções internas com presença de catarro, assim como para as infecções externas, tais como: verrugas, condilomas, pólipos nasais e uterinos. Também para blenorragias agudas, enfermidades urinárias se alterna com *Mercúrius solubilis* (TOLEDO, 1910; SHEALY, 1999).

Alivia articulações inflamadas e inchadas, doenças cutâneas, infecções genitourinária.

QUADRO 1 - RESUMO DA PATOGENESIA DE CADA MEDICAMENTO

<b>Nome do remédio</b>	<b>Sintomas gerais</b>	<b>Modalidades (melhor ou pior)</b>	<b>Humor e temperamento</b>
<i>Aconitum napellus</i>	Agitação, início agudo e repentino, febres inflamatórias, formigamento, frio, dormência de partes	Pior: exposição ao vento frio e seco, aposento quente, tarde e à noite. Melhor: ar livre	Grande medo e ansiedade, medo da morte, agitação.
<i>Arsenicum album</i>	Agitação, inflamações, fraqueza, gastrite, diarreia, dores ardentes, secreções cáusticas	Pior: após a meia-noite, quando fica sozinho, coisas frias Melhor: calor	Nervoso, ansioso, medo de ficar sozinho, da morte
<i>Belladonna</i>	Início repentino, vermelhidão, calor, latejamento, pupilas dilatadas, febre alta, dor ardente, meningite	Pior: toque, movimento, correntes de ar, à noite, quando se deita. Melhor: quando fica de pé, calor	Agitado, delírio –vê caretas, monstros, pesadelos, acessos de raiva, agudeza de todos os sentidos
<i>Bryonia alba</i>	Dores agudas, secra das membranas mucosas, sede intensa, juntas e membranas inflamadas, desenvolvimento lento de doenças agudas, fraqueza, fadiga	Pior: menor movimento, aposento quente, calor, lado direito, ruído, luz, companhia Melhor: repouso, pressão, ar frio, compressas frias, aposento escuro	Extremamente irritável, quer ficar sozinho, ansiedade com agitação.
<i>Lachesis</i>	Tendência a hemorragias, descoloração arroxeadada da pele, hipersensível ao toque, doenças infecciosas	Pior: após o sono, pela manhã, lado esquerdo, banho quente, bebidas quentes, roupas apertadas no pescoço. Melhor: aparecimento de secreções, bebidas frias	Triste pela manhã, falta de vontade de socializar-se ou ir trabalhar, agitado, desconfortável, ciumento, desconfiado, muito falante
<i>Mercurius solubilis</i>	Glândula inchadas e doloridas Suores profusos e sede aumentada. O hálito, o suor e as secreções têm, em geral, mau cheiro. A língua está flácida, amarela e saburrosa.	Pior: a noite	Externamente independente porém sensível à crítica. Insegurança Crianças que externamente são precoces, porém interiormente são bastante tímidas. Intranqüilidade, ansiedade, teme a demência, a morte. Explosiva.
<i>Thuja occidentalis</i>	Transpiração copiosa, tendência a erupções cutâneas, friorento, secreções verdes e mal cheirosas	Pior: à noite, com o calor da cama, às 3 da tarde e às 3 da manhã, ar frio e úmido, café, gordura Melhor: lado esquerdo, fricção.	Idéias fixas, sensibilidade emocional, música causa choro e tremeira, irritável

#### **1.1.2.4.3 Origem e classificação dos medicamentos homeopáticos**

Os medicamentos homeopáticos têm sua origem em:

- Vegetais: ex.: *Bryonia alba*, *Aconitum napellus*, *Belladonna*
- Minerais: ex.: *Ferrum metallicum*, *Phosphorus*, *Mercurius solubilis*.
- Animais: ex.: *Apis mellifera*, *Cantharis*, *Lachesis muta*.
- Produtos sintéticos: ex.: *Formalin*, *Anilinus*.
- Preparados homeopáticos: ex.: *Hepar sulfuris*

Pela importância do valor dos medicamentos os três reinos de origem se equivalem; pela quantidade, porém, pode-se ordená-los: vegetais, minerais e animais. O reino animal é o que fornece menor número de medicamentos, mas o valor deles é tão considerável que não se pode negar que sejam dos mais importantes da matéria médica (NOGUEIRA et al., 1986).

#### **1.1.2.4.4 Preparo dos medicamentos**

O processo de elaborar os remédios é muito preciso. As substâncias solúveis, como os extratos vegetais e animais, se dissolvem em uma solução de álcool e água destilada, de acordo com a substância. Essa mistura se guarda em um recipiente hermético e se agita de vez em quando no decorrer de quatro semanas. No caso de substâncias insolúveis, como ouro, primeiro se mói até chegar a um pó fino e segue-se o mesmo processo. Depois se filtra a mistura. Ao líquido resultante dá-se o nome de tintura mãe. A tintura mãe é usada, então, para produzir as diferentes potências, que constituem os remédios homeopáticos (SHEALY, 1999).

#### **1.1.2.4.5 Remédios combinados**

Os remédios combinados estão ficando cada vez mais populares, principalmente no que tange aos preparados de balcão. Esses remédios compreendem uma combinação de vários remédios diferentes tidos como úteis para um determinado sintoma ou doença. A idéia implícita nos remédios combinados é que, em vez de gastar tempo para determinar o remédio homeopático mais apropriado para uma determinada situação, é mais fácil e mais rápido dar uma combinação dos remédios mais prováveis para aquela doença (JONAS, JACOBS; 1996).

#### **1.1.2.4.6 O mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos**

Tem sido difícil demonstrar a reprodutibilidade independente de experimentos idênticos na homeopatia. Devido ao número reduzido de pesquisadores na área da homeopatia e à falta de financiamento adequado, poucos experimentos têm sido reproduzidos independentemente.

Entender o mecanismo de ação da homeopatia tem sido um obstáculo para esse sistema terapêutico desde seus primórdios. O problema tornou-se ainda mais difícil com o advento da era científica, quando se viu que parte dos efeitos drásticos relatados vinham de preparados tão diluídos que eram quimicamente semelhantes a substâncias inertes. Assim como a descoberta de agentes infecciosos revolucionou nossa capacidade de tratar de muitas doenças na virada do século, a descoberta do que acontece quando um preparado é feito e como influencia o corpo pode revolucionar nosso conhecimento de química, biologia e medicina. Se for apenas uma reação ao placebo, ainda oferecerá informações importantes sobre como nossa mente e nosso corpo operam. De qualquer maneira, a exploração de como a homeopatia funciona beneficiaria a ciência moderna (JONAS, JACOBS; 1996).

#### **1.1.3 Pesquisa laboratorial**

O médico do século XIII, Paracelso, observou que a “dose faz o veneno”, ou seja, a quantidade de uma substância tomada é que determina como afeta os processos vivos (PAGEL, 1982 *apud* JONAS; JACOBS, 1996).

Os pesquisadores da farmacologia no século XIX observaram que doses baixas de medicamentos tinham um efeito paradoxal e oposto em comparação a doses altas (SCHULZ, 1987 *apud* JONAS, JACOBS; 1996).

Alguns dos primeiros experimentos laboratoriais com diluições homeopáticas muito baixas foram realizados por um proeminente patologista britânico William Boyd, que realizou uma série de experimentos laboratoriais na década de 30, demonstrando os efeitos dos preparados homeopáticos do elemento mercúrio nos padrões de crescimento do lêvedo (BOYD 1941, 1946, 1947, 1954 *apud* JONAS; JACOBS, 1996). Esses experimentos foram tão bem realizados que ainda resistem ao escrutínio moderno (BOYD 1941, 1946, 1947, 1954 *apud* JONAS; JACOBS, 1996).

Os estudos que usam toxinas e drogas convencionais também têm sido usados para investigar as diluições altas, com mais de cem relatórios investigativos observando os efeitos protetores de diluições altas contra várias toxinas. Jean Camber mostrou inúmeras vezes que diluições altas de mercúrio podem oferecer aos animais uma proteção de até 40% contra a própria toxicidade (CAMBAR, 1983, 1984, 1985 *apud* JONAS; JACOBS, 1996). Resultados semelhantes têm sido relatados acerca dos efeitos protetores de diluições altas de arsênico contra a intoxicação por arsênico (BOIRON 1963, 1965, 1982, 1987; CAZIN, 1983,1986,1987; CIER, 1963, 1965; LAP, 1955,1958; MOURIQUAND, 1959 *apud* JONA;, JACOBS, 1996), embora um conjunto semelhante de experimentos com chumbo não tenha conseguido mostrar resultados conclusivos (FISHER, 1982, 1987 *apud* JONAS; JACOBS, 1996). Uma análise crítica e sistemática recente desse campo revelou que grande parte da pesquisa relatada nessa área é de má qualidade. Contudo, uma série de experimentos de boa qualidade indicarão que se pode conseguir a proteção de efeitos tóxicos com diluições agitadas em série (LINDE, 1994 *apud* JONAS; JACOBS, 1996).

Algumas das pesquisas mais interessantes e rigorosas sobre diluição alta e preparados homeopáticos têm sido feitas com o medicamento convencional aspirina. A aspirina é um dos medicamentos mais usados na medicina convencional para a redução de febre e inflamação, tratamento da dor e prevenção de coágulos sanguíneos e ataque cardíaco. Como muitos medicamentos, foi descoberto inicialmente extraído de plantas usadas com objetivos semelhantes pelos curativos tradicionais há séculos. A maioria dos usos modernos da aspirina começou antes que entendêssemos os mecanismos do seu funcionamento e novos mecanismos de ação estão sendo descobertos. Por exemplo, um relatório no periódico médico convencional *The Annals of Internal Medicine* mostrou que, quando a aspirina é dada em doses inferiores do que as geralmente prescritas, tem efeitos diferentes nos vasos sanguíneos e no estômago e funciona através de mecanismos diferentes do que as doses mais comuns e altas. Observaram pelo menos quatro tipos diferentes de efeitos dependendo da dose de aspirina administrada. Entretanto, poucas pessoas têm conhecimento de pesquisa sobre diluições ultrabaixas e homeopáticas de aspirina. O professor Christian Douremepuich, da Universidade de Bordeaux, França, tem realizado estudos mostrando, em tubos de ensaio, em

animais e em seres humanos, como diluições ultrabaixas e agitadas em série de aspirina podem aumentar a coagulação sanguínea. É o efeito oposto de doses altas dadas na medicina convencional (DOUTREMEPUICH, 1990, 1991 *apud* JONAS; JACOBS, 1996). Os mecanismos através do qual isso se dá são provavelmente diferentes para doses diferentes. Portanto, pelo menos cinco “níveis de efeito” diferentes têm sido demonstrados, dependendo da dose e do tipo de preparado de aspirina administrado.

#### **1.1.3.1 Avaliação física de preparados altamente diluídos**

Uma área importante da pesquisa científica básica é a avaliação física e eletromagnética de diluições agitadas em série. O trabalho inicial de William Boericke e colaboradores estudou os remédios homeopáticos usando ressonância magnética nuclear logo após esse equipamento ter sido desenvolvido na década de 60. Esse equipamento era rudimentar segundo os padrões atuais, mas os experimentos eram feitos meticulosamente e mostravam diferenças claras entre os preparados agitados em série e diluições semelhantes não agitadas (SMITH, 1966 *apud* JONAS; JACOBS, 1996). Várias diferenças em termos de ressonância magnética nuclear foram relatadas em estudos subseqüentes realizados por outros (YOUNG, 1975; SACKS, 1983, WEINGARTNER, 1989, DEMANGEAT, 1992 *apud* JONAS; JACOBS, 1996).

#### **1.1.3.2 Estabilidade das informações em solução**

Embora ainda não se saiba exatamente como a homeopatia funciona, tem-se alguma idéia sobre onde procurar a resposta e vários livros e artigos têm sido escritos recentemente nessas áreas. Uma série de estudos tem relatado que os efeitos dos preparados homeopáticos podem ser eliminados ou reduzidos ao serem expostos a ondas eletromagnéticas de alta intensidade, aquecimento de soluções, alteração para solvente de alta viscosidade (como óleo em vez de água) e remoção do oxigênio durante o processo de preparação (CAZIN, 1987, 1991; HADJI, 1991 *apud* JONAS; JACOBS, 1996).

Desde a década de 50, James Stephenson apresentou a idéia de “polímeros” na solução água/álcool que afetava o arranjo de moléculas de água, mesmo após o substrato de o remédio original ter desaparecido (BARNARD, 1969 *apud* JONAS,

JACOBS, 1996). Atualmente, sabe-se muito bem que a água e as misturas de água/álcool não são simplesmente dispersões uniformes de moléculas e átomos, mas muitas vezes se organizam em determinados padrões chamados padrões de coerência. Há uma série de formas possíveis através das quais esses padrões podem ser estabilizados e propagados através diluições subseqüentes durante o processo de sucussão ou agitação. Entre esses mecanismos possíveis encontram-se: (1) formação de clatratos (na qual as moléculas de água formam “aglomerados” em padrões específicos que imitam as substâncias químicas que dissolvem) (Anagnostatos, 1994 *apud* JONAS, JACOBS, 1996); (2) efeitos de auto-organização isotópica de isótopos de oxigênio (nas quais as moléculas de água “pesada” canalizam informações específicas pois seus “spins” moleculares são únicos em comparação às moléculas de água regulares) (BEREZIN, 1990, 1994 *apud* JONAS; JACOBS, 1996); (3) campos de polarização eletrodinâmicos (nos quais a energia eletromagnética, com a luz, organiza outras moléculas com as quais entra em contato) (DEL GIUDICE, 1990, 1994 *apud* JONAS, JACOBS, 1996); (4) excitação coerente (na qual as moléculas que vibram em uma frequência “ativam” outras moléculas em uma “oitava” semelhante assim como o dó central do piano faz com que outras notas “dó” vibrem sem contato direto) (RUBIK, 1990 *apud* JONAS, JACOBS, 1996). Essas e outras explicações possíveis não são incompatíveis entre si (todas podem ter um quê de verdade), nem são totalmente satisfatórias (JONAS, JACOBS, 1996) .

#### **1.1.4 Imunologia e a homeopatia**

A doença é um fato da vida a qual, infelizmente, todos estamos sujeitos. Quando a doença aparece, seja ela de caráter grave ou não, queremos basicamente a mesma coisa: um tratamento rápido e suave que nos cure e alivie nosso sofrimento. O alívio mais rápido vem de tratamentos que controlam os sintomas das doenças, como as alergias ou o tumor no câncer. Esses tipos de tratamentos são rápidos, mas também afetam as partes saudáveis do nosso corpo, muitas vezes produzindo “efeitos colaterais” indesejados. Além disso, talvez não tratem as verdadeiras razões da doença.

O sistema imunitário, conjunto de mecanismos de defesa e cura do nosso corpo, é altamente competente e controlado, realizando a sua função sem

comprometer o resto do organismo. No entanto, muitas doenças autoimunes, síndromes de imunodepressão e câncer, podem ser o resultado de desordens no sistema imunitário, onde a ação desse determina de maneira decisiva o prognóstico do paciente e uma resposta imunitária inadequada ou insuficiente podem significar a perda da luta do organismo contra a doença. Nestes casos, porque não reabilitá-lo e estimulá-lo a realizar a sua função, guiado-o para a eliminação da doença ?

Ao contrário das drogas utilizadas pela medicina alopática, que atuam diretamente sobre os processos fisiológicos relacionados com os sintomas da doença, os medicamentos homeopáticos promovem a melhora do estado geral de saúde do indivíduo, estimulando seu sistema imunitário a desencadear respostas adequadas para cada situação. Assim, o tratamento homeopático permite ao indivíduo restabelecer a saúde e prevenir a doença sem, no entanto, produzir os efeitos colaterais experimentados por muitos dos tratamentos convencionais (ULLMAN, 1995).

Quando o corpo reage sozinho, com sucesso, contra agentes infecciosos, ocorre uma intensificação do sistema imunitário, diferente de quando usada a ajuda de antibióticos. Homeopatas dizem que não há riscos de sérios efeitos colaterais no tratamento homeopático devido a ausência de toxicidade na medicina homeopática. (VIKSVEEN, 2003).

#### **1.1.4.1 A força vital e o sistema imunitário**

É fácil ignorar a incrível adaptabilidade e inteligência do sistema imunitário, que parece fazer esforços heróicos para nos manter de pé e em andamento apesar das consideráveis adversidades. Hahnemann chamou de “força vital” a esta inteligência e descreveu-a como “a força de tipo espiritual que reina em suprema soberania”. Também foi descrita como “o condutor invisível”, supervisionando os reveses e equilíbrios do sistema imune que trabalha para nos manter o mais saudável possível.

Tem sido fundamental na homeopatia desde seu início sua utilização na prevenção e no tratamento de problemas do sistema imunitário, como infecções e alergias (GRIMMER, 1948; BOWEN; 1981; TAYLOR-SMITH; 1950; SHEPHERD; 1967 *apud* JONAS; JACOBS, 1996) Existem vários estudos laboratoriais sobre influência das funções imunitárias com o uso de diluições agitadas em série e da

homeopatia. Madeleine Bastide e outros têm relatado que as diluições agitadas em série de uma substância química reguladora do sistema imunitário chamada interferon e os hormônios timulina e bursina podem aumentar a taxa de glóbulos brancos e outras funções imunológicas em animais (DAURAT; 1986; BASTIDE; 1985; 1987 *apud* JONAS; JACOBS, 1996). Existem ainda minerais que influenciam o sistema imunitário, como silício, zinco e cálcio, também apresentam efeitos quando preparados em diluições muito baixas (HARISCH; 1988; 1989 *apud* JONAS; JACOBS, 1996).

### **1.1.5 Homeopatia no Brasil**

A homeopatia foi introduzida no Brasil por um discípulo francês de Hahnemann, Benoit-Jules Mure, que aqui chegou em 1840. Seu primeiro discípulo no Brasil é o médico português João Vicente Martins que propagou a Homeopatia no norte e nordeste brasileiro.

A homeopatia rapidamente se propagou no Brasil e no final do século XIX foi abraçada pelo movimento positivista brasileiro através de seus adeptos do Instituto Militar de Engenharia, no Rio de Janeiro. Disso resulta um grande apoio oficial do governo republicano à Homeopatia, reconhecendo o seu ensino e a sua prática e criando enfermarias no Hospital Central do Exército e no Hospital da Marinha, no começo deste século. Também desse fato apareceram grandes figuras de nossa cultura ligadas à Homeopatia ou que mesmo chegam a praticar, como Rui Barboza, que teria dito “se eu tivesse um diploma de médico seria um homeopata”, ou como Monteiro Lobato, que vem a praticar a Homeopatia na cidade de Tremembé, no interior do Estado de São Paulo. Também por essa adoção, aparece um grande número de homeopatas entre oficiais e engenheiros do Exército, que exercem a Medicina ao deixarem o serviço ativo dessa Força.

A Homeopatia no Brasil mantém sua força e seu crescimento até o final da década de vinte, quando começa lentamente o seu declínio, talvez devido ao advento da era da terapêutica química na Medicina, pois, o aparecimento de armas terapêuticas como as sulfas no início e os antibióticos depois, encontra os homeopatas despreparados filosoficamente para o exercício puro da Homeopatia, positivistas que eram em sua maior parte, e não vitalistas-animistas como o exige o pensamento homeopático e o era o seu criador.

Esse estado de coisas tem tal evolução que nos anos sessenta praticamente já não mais existe Homeopatia no Brasil, que nessa época só sobrevive nas pessoas de alguns poucos abnegados, principalmente nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al, 1986).

No século passado, desejando legalizar definitivamente a situação da Escola Homeopática do Brasil, criada pelo Dr. Bento Mure e instalada sob os auspícios do Instituto Homeopático Brasileiro, o Diretor daquela Escola, Dr. Manoel Duarte Moreira, julgou ser seu dever endereçar uma petição ao Congresso Nacional, assinada pelos professores e alunos da E.H.B., tendo-o feito em 30 de maio de 1848:

“A Homeopatia, encerre ou não encerre princípios opostos à medicina até hoje reconhecida, é sempre uma parte da arte de curar; é sempre sobre a saúde e a vida da população que têm de se fazer sentir os bons ou maus efeitos de sua prática, pois que Medicina não se entende a arte de curar desta ou daquela maneira, com grandes ou pequenas doses, com semelhantes ou contrários, mas sim a arte ou ciências de auxiliar a saúde e a vida do homem, seja por que meios for, cuja escolha compete ora à Ciência ora à experiência.” (O ensino da Medicina no Rio de Janeiro – HOMEOPATIA; Francisco Bruno Lobo, Prof Da URFJ, RJ, 1968; produzido na gráfica da UFRJ.) (COSTA, 2002) (NOGUEIRA et al, 1986).

O Conselho Federal de Medicina, o órgão oficial da Medicina brasileira, reconheceu a Homeopatia como uma especialidade médica pela portaria nº 1000 de 1980 (NOGUEIRA et al, 1986), quando deixou de ser considerada terapia alternativa, para se tornar, como em outros países, uma forma terapêutica oficial. Ainda em 1988 a Associação Médica Homeopática Brasileira ganhou assento no Conselho de Especialidades da AMB, instituindo-se a prova de Título de Especialista em Homeopatia pelo convênio CFM - AMB - AMHB a partir de 1990. As Resoluções do CFM nºs 1.295/89, 1.441/94, 1.634/02, 1.659/03 e 1.666/03 confirmam a Homeopatia como especialidade médica (ASSOCIAÇÃO MÉDICA HOMEOPATICA BRASILEIRA). Em 1996 completou 200 anos de existência e é rigorosamente uma ciência médica, uma revolução na medicina convencional e na arte de curar (DEL VECCHIO, M.; BUCHI, D.F, 200?).

## 1.2 MEDICAMENTO CANOVA

O medicamento Canova é um composto homeopático resultante da combinação de tinturas homeopáticas que figuram na farmacopéia brasileira, derivado de *Aconitum napellus*, *Thuya occidentalis*, *Bryonia alba*, *Lachesis muta* e *Arsenicum album*, diluídos em água destilada e álcool (0,01%). Os componentes são extraídos de forma particular e misturados no momento certo seguindo uma seqüência especial. A combinação e a seqüência de dinamização desses componentes é essencial no processo de ação do medicamento (CANOVA DO BRASIL, 2001).

Foi desenvolvido por Francisco Canova, nascido na Argentina em 1883. Francisco Canova cursava o quarto ano da faculdade de medicina quando foi surpreendido com a gravidade da doença de sua mãe. Ela sofria de câncer que já não respondia a nenhum dos tratamentos convencionais. Foi tratada então pelo médico homeopata Joaquin Alvarez de Toledo, respondendo muito bem ao tratamento homeopático. Com a ajuda desse seu médico o qual também era seu professor, Francisco Canova começou sua incessante busca pela cura da mãe. Realizou diversos experimentos animais, principalmente em bovinos, utilizando os medicamentos da Matéria Médica, sendo estes desenvolvidos na Universidade Nacional De La Plata, na Argentina. Os resultados excediam suas expectativas. Sua mãe teve a saúde restabelecida com o desenvolvimento de um medicamento composto, baseado nas leis da homeopatia, o qual mais tarde viria a ser chamado medicamento Canova (CANOVA DO BRASIL, 2001).

O Laboratório Canova do Brasil é uma empresa totalmente nacional, e paranaense, que detém a patente internacional do medicamento, o que garante os direitos de produção e comercialização ao Canova no Brasil (DEL VECCHIO, M.; BUCHI, D.F, 2002).

Sua preparação e comercialização são regidas pela Lei n° 6360 de 23/09/76, em seu artigo 23, alíneas I e II, parágrafo único e regulamentado pelo decreto n° 79094 de 05/01/77, em seu artigo 28, alíneas I e IV, parágrafo único, que determinam que sejam fornecidos ao Ministério da Saúde, informações e dados elucidativos sobre seus produtos (CANOVA DO BRASIL, 2001).

O Imunomodulador Canova é produzido e comercializado nas formas de gotas, inalante e injetável, apenas por farmácias e laboratório autorizado, sob

rigoroso controle de qualidade da Canova do Brasil. Atualmente o medicamento está autorizado pela legislação nacional da área de saúde a ser vendido apenas como fórmula magistral. Obtendo o registro definitivo do medicamento junto ao Ministério da Saúde, seria possível uma comercialização ampla do medicamento, o que reduziria os custos, tornando-o mais acessível para a população em geral, além de poder ser ofertado pelo sistema público de saúde, para tratamento de câncer e Aids, de forma gratuita. O uso do medicamento deve ser feito por meio de receituário médico.

A maioria das pesquisas e estudos com o medicamento Canova foi realizado em universidades públicas brasileiras, produzindo dissertações de mestrado, com resumos aceitos e apresentados em congressos nacionais e internacionais e trabalhos completos para publicação. Nosso laboratório tomou conhecimento do Método Canova em 1997, através de informações provenientes de médicos e pacientes que o estavam utilizando, com resultados clínicos que sugeriam uma possível atuação em macrófagos. Desde então, vários experimentos serão e vêm sendo desenvolvidos, no intuito de obter esclarecimentos sobre suas propriedades e mecanismos de ação.

Estudos com animais de experimentação mostraram que o Medicamento Canova é totalmente inócuo e não foi encontrada dose letal média (DL50) (metade da dose de um medicamento administrada ao animal que provoca a sua morte), mesmo os animais tendo recebido uma dose injetável 100 vezes maior que a dose habitual, além de não apresentar genotoxicidade, nem mutagenicidade identificável no nível cromossômico (SELIGMAM; 2003). Outros estudos em animais mostraram que este medicamento é eficaz no controle de infecções virais, bacterianas, parasitas (LAGUENS, M. - Médico anátomo-patologista - dados não publicados) e inclusive no controle de tumores experimentais em camundongos (SATO, 2005).

No entanto, estudos *in vitro* realizados em nosso laboratório demonstraram que o medicamento não atua diretamente contra bactérias, fungos, parasitas, células cancerosas mantidas em cultura. Isso indica que o produto atua no organismo com um todo, aumentando as defesas, evitando as infecções de diversos tipos, ação, diminuindo a carga viral e as doenças oportunistas de pacientes HIV/AIDS sugerindo uma possível ação imunomoduladora (SASAKI *et al.*; 2001; GODOY, 2002 ; WAL, 2002; SATO, 2002). Por esse motivo, o MC é indicado em patologias onde o sistema

imunitário do indivíduo encontra-se comprometido, tais como hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e neoplasias, podendo ser utilizado sozinho ou em associação a outros medicamentos terapêuticos. Estudos utilizando macrófagos peritoneais obtidos de camundongos, após as células receberem tratamento *in vivo* e *in vitro* com o Medicamento Canova, resultaram no aumento significativo da relação macrófagos ativados/residentes em comparação ao grupo controle, alteração da expressão e distribuição dos receptores  $\alpha_5$ , diminuição da produção da citocina fator de necrose tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (PIEMONTE; 2000 e 2002) além de estimular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos evidenciando um processo de ativação celular (GODOY; 2002, OLIVEIRA, 2005). O tratamento com o medicamento Canova diminuiu a infecção pela *Leishmania amazonensis* *in vivo* e *in vitro* (PEREIRA, 2005). Também foi comprovado que o índice endocítico é significativamente aumentado para leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* e *Trypasoma cruzi*, epimastigota, em macrófagos tratados com o Canova (LOPES, 2005).

#### QUADRO 2 - PUBLICAÇÕES RECENTES COM O MEDICAMENTO CANOVA EM REVISTAS INTERNACIONAIS

1. Piemonte MR, Buchi DF. Analysis of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production,  $\alpha_5\beta_1$  integrins and actin filaments distribution in intraperitoneal mouse macrophages treated with homeopathic medication. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology* 2002; 3: 255-263
2. Seligmann IC, Lima PDL, Cardoso PCS, Burbano R, Buchi DF et al. The anticancer homeopathic composite "Canova Method" is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. *Genetics and Molecular Research* 2003; 2(2): 223-228.
4. Pereira WKV, Lonardonib MVC, Grespana R, Caparroz-Assefa SM, Cumana RKN, Bersani-Amadoa CAJ. Immunomodulatory effect of *Canova* medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Infection*, (2005) 51, 157–164.
5. Sato DYO, Wal R, Oliveira CC, Cattaneo RII, Malvezzi M, Gabardo J, Buchi DF. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a brazilian homeopathic medication., *Homeopathy* (2005) 94, 26–32.
6. Carolina C. de Oliveira\*; Simone M de Oliveira; Lyris M. F. Godoy; Juarez Gabard and Dorly F. Buchi\*. *Canova*, a brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages *Journal of Infection, in press* (2005) .
7. Lopes, Luciana, Godoy, Lyris, Oliveira, Carolina, Gabardo, Juarez, Schadeck, Ruth, Buchi, Dorly de Freitas. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by *Canova* medication. *Micron, in press* (2005) .

### 1.3 SISTEMA IMUNITÁRIO

Ao longo de sua história evolutiva, os animais multicelulares têm sido infectados por microrganismos. Em resposta, desenvolveram uma série de defesas que são usadas atualmente. Barreiras físicas e químicas, como a pele e superfícies mucosas, confinam os microrganismos às superfícies externas do corpo e, quando os patógenos conseguem romper essas barreiras, são procurados e destruídos pelo sistema imunitário (PARHAM, 2001). Seu objetivo é reconhecer agentes estranhos invasores, com o potencial de causar doença (conhecido como patógeno), impedir sua disseminação e, finalmente, eliminá-los do corpo (PARHAM, 2001). Graças a esse sistema, os animais possuem a capacidade de resistir a quase todos os tipos de microrganismos ou toxinas que tendem a danificar os tecidos e órgãos e ainda, freqüentemente, nos proteger de infecções e de células cancerosas.

Esse sistema é composto de numerosos tipos de células e uma variedade de moléculas as quais estão espalhadas através do nosso corpo (SEADI, 1998).

As células do sistema imunitário estão normalmente presentes como células circulantes no sangue e da linfa, como coleções definidas anatomicamente nos órgãos linfóides e como células dispersas virtualmente em todos os tecidos.

Como todas as células sanguíneas, as células do sistema imunitário também possuem origem na medula óssea, onde muitas também amadurecem. As células tronco hematopoiéticas da medula originam células precursoras ou basicamente 3 grupos de células progenitoras especializadas: progenitor linfóide e progenitor mielóide, que darão origem aos leucócitos ou glóbulos brancos, e o progenitor eritróide, que dará origem aos eritrócitos ou glóbulos vermelhos. O progenitor linfóide se divide e se diferencia para dar origem aos linfócitos (células B, células T e células NK). O progenitor mielóide se divide e se diferencia para produzir pelo menos seis tipos celulares: os granulócitos (neutrófilo, eosinófilo e basófilo); o mastócito, a célula dendrítica e o monócito circulante, que origina os macrófagos residentes nos tecidos. O progenitor eritróide origina os eritrócitos e os megacariócitos (JANEWAY et al., 2002; PARHAM, 2001).

Os linfócitos são as células coordenadoras do sistema imunitário. Ainda, todas as funções dos linfócitos dependem de células não-linfóides, as células acessórias, que não são específicas para antígenos diferentes. Como células acessórias funcionam os fagócitos mononucleares, as células dendríticas e várias

outras populações celulares, como os granulócitos e mastócitos. (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

### Linfócitos

Os linfócitos são as únicas células imunocompetentes capazes do reconhecimento específico de antígeno - e qualquer macromolécula, partícula viral ou célula que contenha uma estrutura reconhecida e ligada por uma imunoglobulina ou receptor de célula T (PARHAM, 2001). São morfologicamente homogêneos, mas consistem de subconjuntos distintos, que desempenham diferentes funções e que podem ser distinguidos fenotipicamente. Os linfócitos chamados B são as células que produzem anticorpos (glicoproteínas que se ligam a antígenos). Alguns linfócitos chamados T que expressam CD4 de superfície funcionam como células auxiliares para estimular a produção de anticorpos e para ativar os macrófagos a destruir os microrganismos fagocitados. Os linfócitos T CD4 ainda podem ser divididos em Th1 e Th2 dependendo das moléculas secretadas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Linfócitos Th1 produzem as interleucinas IL-2, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) as quais promovem a imunidade mediada por células. Linfócitos Th2 produzem as interleucinas IL-3, IL4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, e o fator de crescimento e estimulador de colônia de granulócito e monócito (GM-CSF), os quais promovem a resposta imune mediada por anticorpos (CARTES; DUTTON, 1996). Outros linfócitos T expressam CD 8 e funcionam como células citotóxicas para destruir as células-alvo que estejam expressando antígenos estranhos. Outros linfócitos chamados NK lisam as células infectadas por vírus e certas células tumorais.

### Fagócitos mononucleares

O sistema fagocitário mononuclear representa a segunda maior população celular do sistema imunitário e consiste de células que têm uma linhagem comum cuja principal função é a fagocitose. Após a maturação e subsequente ativação, podem apresentar várias morfologias. O tipo celular indiferenciado que penetra no sangue periférico após deixar a medula é chamado monócito. Uma vez fixados em tecidos amadurecem e tornam-se macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Há vários tipos de resposta imune. De uma maneira mais ampla, os diferentes tipos de respostas imunes enquadram-se em duas categorias: respostas inatas ou

nativa (imunidade natural) e respostas imunes específicas ou adaptativa (imunidade adquirida) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

A imunidade natural é aquela presente ao nascer. É o mecanismo de defesa de que dispomos antes mesmo de nos expormos a qualquer substância estranha (SEADI, 1998). Esta é a principal linha de defesa contra os organismos invasores e a primeira resposta a um ataque microbiano. Seus mecanismos são rápidos, fixos em seu modo de ação e efetivos em interromper a maioria das infecções em um estágio precoce, no entanto, nem sempre têm a capacidade de eliminar a infecção. Suas características são aquelas que ele apresenta por toda vida, não tendo especificidade nem memória. As células e as moléculas da imunidade inata identificam classes comuns de patógenos e as destroem com mecanismos que resistiram ao teste do período evolutivo e são continuamente úteis (PARHAM, 2001).

Os componentes da imunidade inata são barreiras mecânicas, produtos secretados, além de incluir fagócitos mononucleares e células Natural Killer. Nesse também são incluídas proteínas como os componentes do complemento, os quais são dito ser moléculas solúveis porque estão dissolvidas nos fluidos corporais, ao invés de estarem associadas ou estocadas em células (WOOD; AUSTYN, 1993; PEAKMAN; VERGANI, 1997).

A resposta imune inata não só exerce uma função protetora importante, como também serve para iniciar e regular a subsequente resposta imune adquirida (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A imunidade adquirida não está presente ao nascer, mas é adquirida como parte do desenvolvimento (PEAKMAN; VERGANI, 1997). Ela retém muito de seus mecanismos necessários para eliminar invasores, da imunidade natural. Esses mecanismos são amplificados e potencializados, tendo ainda o acréscimo de duas propriedades importantes: a especificidade e a memória. Assim, podem ser rapidamente reativados em um encontro futuro com o mesmo patógeno, fornecendo imunidade duradoura a muitas doenças comuns (PARHAM, 2001).

À medida que a resposta imune amadurece, surgem anticorpos de outros isotipos. Assim, a imunidade adquirida pode ser dividida em duas grandes classes: (1) resposta imune mediada por anticorpos ou humoral, onde o reconhecimento específico do antígeno na fase efetora é mediado pela ligação das moléculas do anticorpo secretado ao antígeno. Recebeu este nome pois os anticorpos foram

descobertos pela primeira vez circulando em líquidos corporais (humores), como o sangue e a linfa, e (2) resposta imune mediada por células, a qual é dirigida para as células que portam antígenos estranhos na sua superfície, ou que estejam nas proximidades destas. A resposta mediada por células é fisiologicamente mais importante para erradicar micróbios ou vírus que vivem intracelularmente (ALBERTS et al., 1997; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O primeiro passo crucial na imunidade adaptativa é a ativação e células T virgens antígeno-específicas pelas células apresentadoras de antígeno especializadas (APCs). Isso ocorre nos tecidos linfóides e órgãos pelos quais passam, constantemente, as células T virgens. A característica mais diferenciada das células APCs é a manifestação de atividades co-estimuladoras, e as moléculas B7.1 e B7.2. Os três tipos de células que podem servir como célula apresentadora de antígeno profissional são os macrófagos, as células dendríticas (também derivadas de monócitos) e as células B, cada uma com funções diferentes na indução da resposta imune.

A ativação das células T por uma célula apresentadora de antígeno especializada leva à sua proliferação e à diferenciação de sua progênie em células T efetoras armadas. A proliferação e a diferenciação das células T dependem da produção de moléculas chamadas citocinas, como o fator de crescimento da célula T (interleucina-2), e de sua ligação a um receptor de alta afinidade na célula T ativada. As células T efetoras podem mediar uma variedade de funções, as mais importantes sendo a citólise das células infectadas pelas células T CD8 citotóxicas e a ativação de macrófagos pelas células Th1, armando, em conjunto, a imunidade mediada por células, e a ativação de células B (JANEWAY et al, 2000).

### **1.3.1 Citocinas**

Citocinas são um importante grupo de proteínas que funcionam como comunicadores intercelulares. Elas geralmente agem localmente por interação com receptores específicos sobre a superfície das próprias células que as produzem (autócrinas) ou sobre outros tipos celulares (parácrinas) No sistema imunitário, um grande número de citocinas tem um importante papel tanto no desenvolvimento de um sistema imunitário funcional quanto na resposta do organismo a infecção (HOLLOWAY; SHANNON, 2001).

Na imunidade inata, as citocinas efetoras são, na sua maior parte, produzidas por fagócitos mononucleares, podendo ser chamadas monocinas. Estas citocinas provocam reações inflamatórias, localmente ricas em neutrófilos, que servem para conter e, quando possível, erradicar as infecções microbianas. Estas citocinas são produzidas pelos fagócitos mononucleares devido ao estímulo dado pela invasão por microrganismos, ou ainda em resposta às células T antígeno-estimuladas, isto é, como parte da imunidade específica. A maioria das citocinas da imunidade específica é produzida por linfócitos T ativados, e estas moléculas são comumente chamadas linfocinas.

Tanto os linfócitos como os fagócitos mononucleares produzem citocinas, como os fatores estimulantes de colônia (CSFs), que estimulam o crescimento e a diferenciação dos leucócitos imaturos na medula óssea, proporcionando uma fonte adicional de leucócitos para substituir as células que são consumidas durante as reações inflamatórias. Como muitas dessas citocinas são produzidas por certas populações de leucócitos provenientes diretamente do sangue, são chamadas interleucinas. Como as novas citocinas são caracterizadas molecularmente, deverão receber um número de designação, por exemplo interleucina-1(IL-1) para assegurar que exista uma nomenclatura não ambígua.

As mesmas citocinas são, com freqüência, elaboradas por muitos tipos celulares, e as citocinas individualmente podem atuar sobre muitos tipos celulares. As ações de diferentes citocinas são, muitas vezes, redundantes, ou seja, muitas funções originalmente atribuídas a uma citocina têm comprovado ter propriedades compartilhadas por várias citocinas diferentes, e ainda exercem influência nas ações de outras citocinas. De modo geral, as citocinas são sintetizadas em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos e atuam localmente, de modo autócrino ou parácrino, ligando-se a receptores de alta afinidade nas células-alvo. Certas citocinas podem ser produzidas em quantidade suficiente para circular e exercer ações endócrinas. As citocinas servem como fatores de crescimento para muitos tipos celulares. A secreção de citocinas é um evento rápido e autolimitado. De modo geral, as citocinas não são acumuladas como moléculas pré-formadas e sua síntese é iniciada por nova transcrição de genes. Esta ativação transcricional é geralmente transitória e os ácidos nucléicos mensageiros (RNAs) que codificam as citocinas são instáveis. Algumas citocinas podem ser adicionalmente controladas por

mecanismos pós-transcricionais, tais como a liberação proteolítica de um produto ativo de um precursor inativo. Uma vez sintetizadas, as citocinas são, em geral, rapidamente secretadas, resultando em uma explosão de liberação de citocinas quando necessárias (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Citocinas são frequentemente agrupadas em famílias de acordo com suas funções similares ou de acordo com a sua estrutura proteica (HOLLOWAY; SHANNON, 2001). São elas as hematopietinas, os interferons (IFN), as quimiocinas, e a família do fator de necrose tumoral (TNF). Membros da família TNF atuam como trímeros, a maioria dos quais ligados à membrana e muito distintos das outras citocinas por suas propriedades. Apesar disso, eles compartilham algumas propriedades importantes com as citocinas solúveis: eles são sintetizados de novo no momento do reconhecimento do antígeno pela célula T, afetando o comportamento da célula-alvo (JANEWAY et al, 2000).

A principal função dos receptores de citocinas é converter um sinal extracelular, como o de uma ligação específica de uma citocina a uma célula-alvo, em um sinal intracelular, como a ativação de uma enzima ou de um fator de transcrição que pode desencadear uma resposta da célula-alvo (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

As citocinas atuam sob receptores que podem ser agrupados em famílias equivalentes, com base em sua estrutura. Essas famílias de citocinas e seus receptores são também caracterizados por suas similaridades funcionais e ligação gênica. Entre as hematopietinas, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e fator de estimulação de colônia de granulócito e monócito (GM-CSF) são estruturalmente relacionadas, seus genes estão próximos no genoma e todas são citocinas produzidas por células  $T_H2$ . Além disso, elas ligam-se a receptores muito relacionados: os receptores IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF compartilham uma cadeia  $\beta$  comum. Um outro subgrupo de receptores de hematopietinas é definido pelo seu uso da cadeias  $\gamma$  do receptor IL-2, que é compartilhado pelos receptores das citocinas: IL-4, IL-7, IL-9 e IL-5 e é chamado de cadeia  $\gamma$  comum ( $\gamma_c$ ). Em geral, o relacionamento genético, estrutural e funcional entre as citocinas e seus receptores sugere que elas divergiram juntas na evolução de suas funções efetoras especializadas (JANEWAY et al, 2000). As citocinas servem para muitas funções que são essenciais para a defesa do hospedeiro contra patógenos e proporciona ligações entre a imunidade específica e

inata. Regulam a magnitude e a natureza das respostas imunes e fornecem importantes mecanismos de amplificação que capacitam um pequeno número de linfócitos específicos para qualquer antígeno ativar uma variedade de mecanismos efetores para eliminar o antígeno (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O TNF- $\alpha$ , por exemplo, é o principal mediador da resposta a bactérias Gram-negativas e pode também exercer um papel nas respostas imunes inatas a outros microrganismos infecciosos. Foi originalmente identificado como um mediador de necrose tumoral que estava presente no soro de animais tratados com lipopolissacarídeos (LPS). O LPS em baixas concentrações estimula as funções dos fagócitos mononucleares e no camundongo age como um ativador policlonal de células B. As ações do TNF- $\alpha$  são melhor entendidas como uma função de quantidade. Quando são produzidas pequenas quantidades, o TNF- $\alpha$  age localmente como um regulador parácrino e autócrino dos leucócitos e células endoteliais (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina pleiotrópica com potente efeito imunomodulatório sobre uma variedade de células imunes *in vitro* e *in vivo*. Esta citocina possui múltiplas atividades biológicas por controlar tanto positivamente quanto negativamente a expressão de muitos genes e proteínas. Embora IFN- $\gamma$  tenha sido originalmente definida como um fator antiviral produzido por linfócitos estimulados, sabe-se que esta citocina pode exibir um amplo efeito sobre diversos aspectos no sistema imunitário. Em particular, IFN- $\gamma$  mostra exercer importantes atividades sobre monocitos/macrófagos e linfócitos, os quais geralmente resultam em ativação de macrófagos e diferenciação de células T no tipo Th-1. Antigamente sabia-se que IFN- $\gamma$  era produzido apenas por células T e NK, hoje se sabe que diversas outras células também produzem, como células da linhagem B, células de linhagem monocítica como macrófagos, e células tumorais (GESSANI; BELARDELLI, 1998).

A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina pleiotrópica que exerce uma grande variedade de efeitos sobre diferentes tipos de células do sistema imunitário. Esta citocina é um fator de crescimento para células T, B e NK e induz a secreção tardia das imunoglobulinas IgG1 e IgE. IL-4 também aumenta a função da apresentação de antígeno por aumentar a expressão de MHC II, CD 40 e CD 23 (HUNT et al., 2002).

Para uma grande variedade de tipos celulares, as citocinas são as chaves moduladoras da taxa de transcrição dos genes do MHC. As citocinas aumentam a expressão do MHC através da estimulação da taxa de transcrição dos genes das moléculas de classe I e II em uma grande variedade de tipos celulares. Isso representa um importante mecanismo de amplificação das respostas mediadas pelas células T, pois a maioria das citocinas que aceleram a expressão do MHC é secretada pelas próprias células T. As moléculas do MHC são componentes dos ligantes que essas células reconhecem e as quais respondem (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Linfócitos T antígeno-específicos não reconhecem antígenos na forma livre ou solúvel, mas ao contrário, reconhecem porções antígenos protéicos (isto é, peptídeos). Para que esse reconhecimento ocorra, é necessário que determinadas células capture o antígeno, o processe e o apresente a célula T antígeno específico, através de uma ligação não covalente dos peptídeos à moléculas denominadas MHC (major histocompatibility complex) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Os três principais tipos de células apresentadora de antígeno especializadas (APCs) são macrófagos, células dendríticas e células B. Cada um desses tipos é especialista em processar e apresentar antígenos de diferentes fontes às células T, além expressarem as moléculas co-estimuladoras especializadas necessárias para a ativação das células T virgens (JANEWAY et al., 2000).

Existem dois tipos de moléculas MHC, chamadas MHC de classe I e MHC de classe II. Tanto as moléculas MHC I e II quanto outras proteínas envolvidas no processamento e na apresentação de antígenos são codificadas em uma região de genes altamente polimórficos denominados complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (PARHAM, 2001). Essas regiões são separadas por uma região central de classe III. A região de classe III também contém genes que codificam para proteínas com função importante relacionada à imunidade como proteínas do sistema complemento, fator de necrose tumoral (TNF), e linfotoxinas  $\alpha$  e  $\beta$  (BROWNING; McMICHAEL, 1996).

Microrganismos e células neoplásicas estão sob intensa seleção para escapar do sistema imunitário. Não é de se surpreender que o MHC esteja sob pressão evolucionária para responder a essa grande variação (BROWNING; McMICHAEL, 1996).

Como parte deste enfoque nos antígenos peptídicos como alvos, os sistemas imunológicos dos seres humanos e de outros mamíferos desenvolveram mecanismos para detectar as numerosas proteínas presentes no seu meio ambiente e clivá-las em peptídeos – seqüência conhecida como processamento de antígeno – tornando esses acessíveis para o reconhecimento pela célula T – apresentação de antígeno. Trata-se de etapas iniciais e indispensáveis, observadas em quase todas as respostas imunológicas adquiridas, que são decisivas para a capacidade do sistema imunitário de detectar e responder a estímulos antigênicos (STITES, TERR, PARSLOW, 2000).

### **1.3.2 Macrófagos**

O macrófago (MO) é uma célula que se encontra presente em todos os tecidos do organismo e apresenta funções importantes no sistema imunitário. A ingestão de partículas estranhas e seu processamento levam à ativação do sistema imunitário através da apresentação de antígenos aos linfócitos, da secreção de substâncias (como citocinas e quimiocinas) capazes de regular o sistema imunitário e da elaboração de substâncias capazes de destruir outras células e organismos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Os macrófagos foram primeiramente descritos por METCHNIKOFF (1905), no início do século XIX. Morfologicamente, caracterizam-se por serem células relativamente grandes, medindo entre 60 a 80  $\mu\text{m}$  de diâmetro com núcleo irregular e excentricamente posicionado, um ou mais nucléolos e cromatina pouco condensada. Sua superfície celular é bastante irregular, sendo dotada de inúmeras projeções citoplasmáticas. Apresentam complexo de Golgi abundante, grande número de lisosomos e mitocôndrias e um citoesqueleto bem desenvolvido, rodeando o núcleo da célula e estendendo-se até a periferia da mesma (AUGER; ROSS, 1992).

É o grupo mais importante de células fagocitárias de longa vida, compreende a linhagem fagocítica mononuclear, que inclui os monócitos sanguíneos, os fagócitos residentes nos tecidos ou fixados à camada endotelial de capilares sanguíneos e os fagócitos perambulantes – pulmonares e peritoneais (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

Ontogeneticamente, os macrófagos são originários de células precursoras do saco vitelínico, migrando para o fígado, baço e medula óssea antes e logo após o nascimento. Nos indivíduos adultos, os macrófagos têm origem em uma célula pluripotente mielóide, presente na medula óssea, a partir da qual são originadas diferentes células progenitoras, entre elas as “unidades formadoras de colônia” de granulócitos e monócitos (CFU-GM). As CFU-GM dão origem aos pró-monócitos que já apresentam capacidade de pinocitose e expressam uma série de receptores característicos de macrófagos. Os pró-monócitos, por sua vez, dão origem aos monócitos, que saem da medula óssea e ganham a circulação sanguínea. Os monócitos permanecem na circulação por cerca de 1-3 dias, de onde migram para os diversos tecidos, onde se diferenciam e formam uma população residente de macrófagos, com tempo de vida variando entre 2 e 4 meses (NELSON et al., 1990; NEVEU, 1996). Após penetrar nos tecidos, começam a aumentar de tamanho, e seu diâmetro pode aumentar até cinco vezes, atingindo de 60 a 80  $\mu\text{m}$ . Verifica-se, também o desenvolvimento de número extremamente grande de lisossomos no seu citoplasma, conferindo-lhe aspecto de saco repleto de grânulos. Nesse estágio, tornam-se extremamente capazes de combater agentes infecciosos nos tecidos.

Macrófagos residentes no tecido foram previamente chamados de macrófagos fixos e, aqueles que se desenvolviam com resultado de um estímulo exógeno e migravam para sítios particulares, foram denominados macrófagos livres. Estes nomes têm sido substituídos por macrófagos residentes e macrófagos ativados, respectivamente (GARTNER; HIATT, 1997).

Macrófagos ativados são um pouco maiores que os não ativados, principalmente devido ao aumento de volume citoplasmático (STITES; TERR, 1992). Têm sua atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica rapidamente aumentada (ERWIG et al., 1998) sendo muito mais eficientes em destruir bactérias e outros patógenos.

A variabilidade de estímulos que pode ativar macrófagos é muito grande: contato direto com microorganismos ou partículas inertes, com lipopolissacarídeos (LPS) bacteriano, produtos do próprio tecido danificado, com componentes protéicos do sistema complemento ou da coagulação sanguínea. A ativação pode também ser induzida por certas citocinas que podem ser secretadas por linfócitos que estejam ao redor (STITES; TERR, 1992). Estes estímulos fazem com que modifique algumas de

suas propriedades tais como: crescimento, diferenciação, ativação, migração, endocitose e secreção (GORDON et al., 1988).

Macrófagos estão envolvidos em diversos processos como remodelamento tecidual durante a embriogênese, reparo de ferimentos, remoção de células senescentes após injúrias ou infecções, hemopoiese e homeostase, além de fornecer uma linha de defesa contra invasores microbiais e reconhecer e destruir células tumorais (HONG et al, 2005).

Os macrófagos estão envolvidos em todas as fases das respostas imunes. Primeiro, eles atuam como um mecanismo protetor rápido capaz de responder antes que ocorra a amplificação mediada pela célula T. Posteriormente, os macrófagos podem tomar parte na iniciação da ativação das células T através do processamento e da apresentação de antígenos. Finalmente, eles são importantes como células inflamatórias, tumorocidas e microbicidas na fase efetora da resposta celular, após a ativação mediada por célula T (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

A idéia de que os macrófagos são importantes na resposta imune foi reforçada nos anos 70 quando se descobriu que macrófagos apresentavam moléculas do MHC classe II, que são necessárias para o reconhecimento de antígenos pela célula T. Mais tarde, descobriu-se que macrófagos podiam produzir moléculas solúveis ou citocinas, chamadas de “fator de ativação de linfócito”, conhecidas agora por interleucina-1 (IL-1), as quais podem levar a proliferação linfocitária, em parte pela estimulação de outra citocina, a IL-2, de ativação de células T (WOOD, AUSTYN, 1993). Entre as células que comumente apresentam antígenos as células T, os macrófagos expressam apenas baixo nível de moléculas da classe II, até que sejam estimuladas a fazê-lo pelo IFN- $\gamma$  ou por outras citocinas (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2000).

Os macrófagos internalizam, processam, digerem e apresentam o antígeno aos linfócitos, os quais irão produzir moléculas as quais irão desencadear respostas em outras células. Por outro lado, os linfócitos também vão produzir mensagens que vão para os macrófagos, ativando-os, ou seja, potencializando sua ação (STITES; TERR, 1992).

Essa ativação pelos linfócitos ativados bem como a resposta a estímulos externos, provenientes de alguns microrganismos, faz com que os macrófagos modifiquem algumas de suas propriedades, tais como: habilidade para aderir e

espalhar-se em substratos, a taxa de endocitose e fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos (VENKATA-REDY; GANGADHARAN, 1992). Em resposta a estes estímulos, estas células sofrem uma ativação que lhes permite, entre outras funções, adquirir uma grande capacidade de matar microrganismos e algumas células tumorais. Isso pode ocorrer através de mecanismos oxigênio ou nitrogênio dependentes, nos quais espécies reativas do oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produzidos (WOOD; AUSTYN, 1993). Estes produtos difusos e de vida curta tem papéis na defesa antimicrobiana tão bem definida como bem sinalizada na célula (HAN et al., 2001). Para a proteção dos macrófagos contra esses produtos tóxicos, os ROS são estocados em vesículas chamadas lisossomos, as quais podem ser colocadas em contato com vesículas contendo o material ingerido, os fagossomos (PLAYFAIR, 1995).

ROS são gerados durante o metabolismo celular normal. Incluem anion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (OH), e outros radicais e não radicais que são agentes oxidantes e/ou facilmente conduzidos a radicais, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A cadeia respiratória da mitocôndria é a maior fonte de radicais do oxigênio. Eles são muito instáveis, devido a possuírem um ou mais elétrons desemparelhados os quais podem formar espécies altamente reativas. ROS podem facilmente reagir com macromoléculas incluindo lipídios, proteínas e DNA e prejudicando-os. ROS causam peroxidação de membranas fosfolipídicas, o que pode alterar a fluidez de membranas biológicas e levar a perda da integridade celular (CADENAS; CADENAS, 2002).

Espécies reativas do nitrogênio (RNS), como Óxido Nítrico (NO) e peróxinitrito ( $ONOO^-$ ), também podem agir como segundo mensageiro modulador das vias de sinalização redox em macrófagos podendo participar de processos sinalizadores (FORMAN; TORRES, 2001).

ROS e NO podem interagir de diferentes maneiras e agir sinergisticamente causando citotoxicidade. Os radicais NO e  $O_2^-$  reagem para formar peróxinitrito ( $ONOO^-$ ), um poderoso oxidante o qual é capaz de nitrar proteína, enfraquecendo, desse modo, a atividade de diferentes enzimas mitocondriais, levando a uma diminuição nos níveis de energia (CADENAS; CADENAS, 2002).

Óxido nítrico tem um grande número de papéis fisiológicos, incluindo: a) relaxamento do músculo liso; b) inibição de agregação e adesão de plaquetas; e c) a morte de patógenos (BROWN, 1995).

Em sistemas biológicos, NO é sintetizado a partir da L-arginina por indução de diferentes isoenzimas óxido nítrico sintase (NOS). Duas destas são constitutivamente expressas em células do endotélio vascular (eNOS ou NOS tipo III) e em neurônios (nNOS ou NOS tipo I), enquanto que a expressão da terceira isoenzima (iNOS ou NOS tipo II) é induzida, em uma variedade de células, por produtos de bactérias Gram-negativas (endotoxinas) e bactérias Gram-positivas. eNOS e nNOS são transitoriamente ativadas em respostas ao aumento intracelular dos níveis de cálcio e estão envolvidas na regulação das funções fisiológicas, enquanto que iNOS é expressa e continuamente ativa durante inflamações, onde está envolvida a defesa do hospedeiro contra patógenos. iNOS tende a produzir altas concentrações de NO na célula, o qual possui um papel anti-inflamatório, por suprimir infecções bacterianas e acentuar recrutamento de leucócitos (CADENAS; CADENAS, 2002).

Resultados de diversos experimentos indicam a possibilidade de que a produção de NO em excesso “dowregulates” a expressão da proteína iNOS para prevenir autotoxicidade celular. Um possível mecanismo para esse “feedback” inibitório da síntese da proteína iNOS pelo NO pode ser atribuído a fosforilação mediada por NO de uma molécula regulatória chave na maquinaria transducional (HAN et al,2001).

## 2 JUSTIFICATIVA DOS OBJETIVOS

Os estudos em nosso laboratório com o medicamento Canova iniciaram-se em 1997. Informações de médicos e pacientes que estavam utilizando este medicamento, sugeriam uma possível atuação em macrófagos. Desde então, vários experimentos foram e vêm sendo desenvolvidos, no intuito de se obter esclarecimentos sobre suas propriedades e mecanismos de ação. Diversos resultados interessantes e importantes foram encontrados. A partir das respostas encontradas nesse modelo biológico, com cultivo de macrófagos, despertou-se a curiosidade de pesquisar se os macrófagos poderiam responder a outros medicamentos homeopáticos. Como a medicina homeopática vem sendo utilizada por mais pessoas a cada dia, é um método de tratamento que, além de não apresentar toxicidade, tem baixo custo e é de fácil acesso, esse estudo poderá contribuir para um maior conhecimento sobre os mecanismos de ação dos medicamentos homeopáticos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ação dos medicamentos *Aconitum napellus*, *Bryonia alba*, *Thuya occidentalis*, *Lachesis muta*, *Arsenicum album*, *Mercurius solubilis* e *Belladonna*.

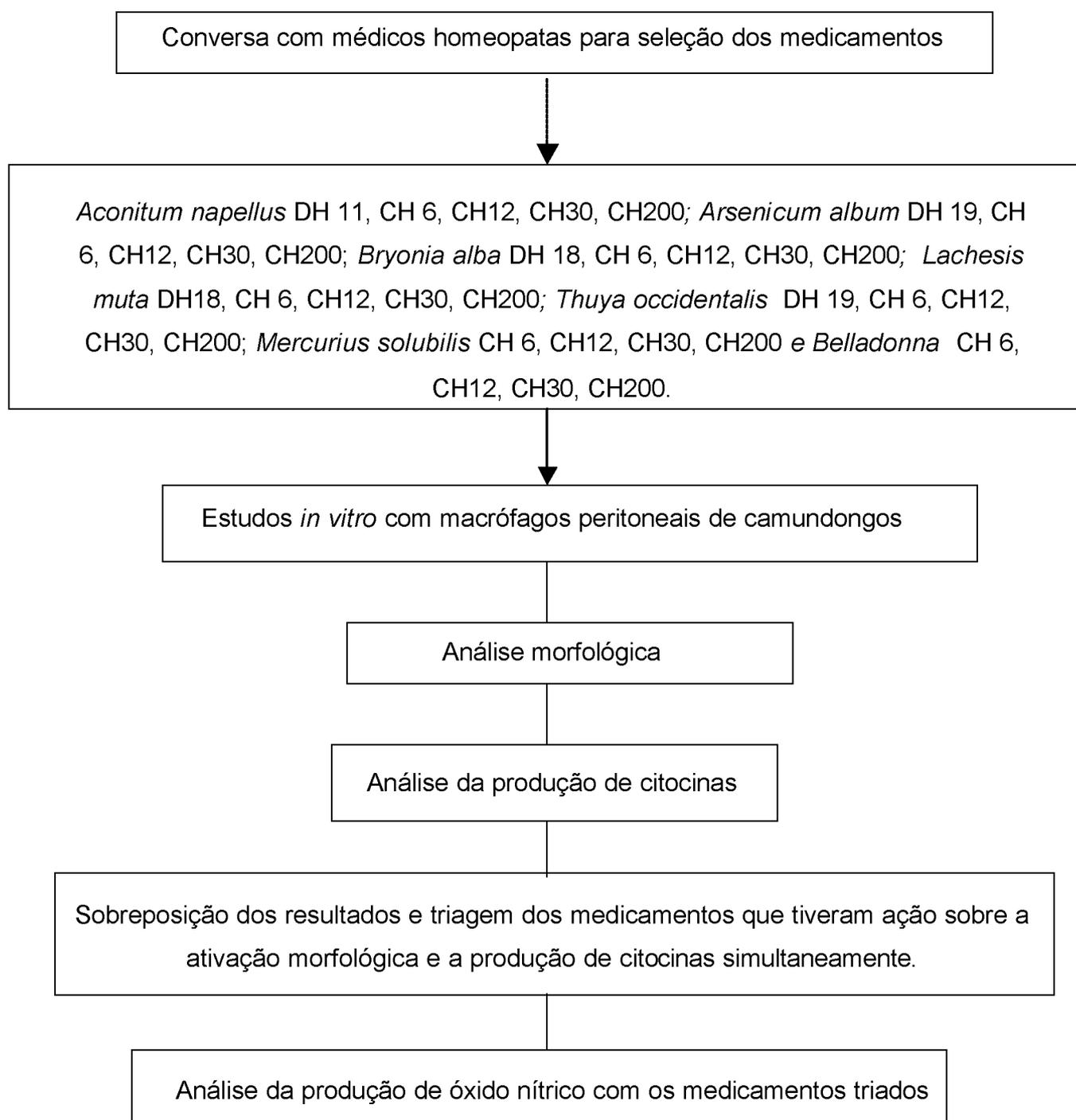
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

⇒ Estudar *in vitro* macrófagos peritoneais de camundongos tratados com os medicamentos preparados homeopaticamente:

- *Aconitum napellus* DH 11, CH 6, CH12, CH30, CH200;
  - *Arsenicum album* DH 19, CH 6, CH12, CH30, CH200;
  - *Bryonia alba* DH 18, CH 6, CH12, CH30, CH200;
  - *Lachesis muta* DH18, CH 6, CH12, CH30, CH200;
  - *Thuya occidentalis* DH 19, CH 6, CH12, CH30, CH200;
  - *Mercurius solubilis* CH 6, CH12, CH30, CH200
  - *Belladonna* CH 6, CH12, CH30, CH200.
- ✓ Analisar alterações morfológicas de macrófagos, após o tratamento *in vitro*;
- ✓ Detectar e quantificar a produção e liberação de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-4, IL-2, no sobrenadante das culturas, através da citometria de fluxo.
- ✓ Analisar prováveis alterações na produção e liberação de óxido Nítrico (NO).

Tendo 3 tipos de controle: grupo sem tratamento, solução hidroalcoólica dos medicamentos e o medicamento Canova (como controle positivo).

#### 4 ESTRATÉGIA GERAL DE TRABALHO



Representação esquemática da estratégia metodológica utilizada para realização dos objetivos desta dissertação.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Para a realização do estudo foram feitos experimentos com o auxílio de camundongos *Mus musculos*, machos, com idade de 6 a 8 semanas, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná. Eles receberam ração (Purine®) e água *ad libitum*, controle ambiental (25°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas. Todas as recomendações para manejo científico de animais da lei nacional (Nº 6.638, 5 de novembro de 1979) “Normas para Prática Didático-Científica da Vivissecação de Animais” foram respeitadas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação em Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade do Paraná e possui número de certificado 109.

### 5.2 CÉLULAS

O estudo teve como foco de análise macrófagos peritoneais obtidos de camundongo, os quais foram coletados através do lavado intraperitoneal dos camundongos.

Os macrófagos foram obtidos e cultivados segundo os protocolos rotineiros de coleta e cultivo, respectivamente, do Laboratório de Estudos de Células Neoplásicas e Inflamatórias do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, como descrito nos itens 6.5.1.

### 5.3 MATERIAIS E REAGENTES

#### 5.3.1 Cultivo celular

- NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> da Electron Microscopy Science (EMS).
- Meio cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB) Penicilina e estreptomicina, amphotericina da Gibco™.
- ácido N-2[-4hidroxietil piperazina N-2-etano sulfônico (HEPES) da Sigma-Aldrich Co.
- Membranas de acetato de celulose de 0,22 µm de poro Millipore®
- Placas de cultivo 24 e 96 poços da Biosystems Comercial Importadora Exportadora de Equipamentos para Laboratórios Ltda.
- Lamínulas da Esco.

### 5.3.2 Medicamentos

- Matrizes dos medicamentos foram adquiridos do Laboratório Schaubmann Ltda – Rua Maria Catur, 208, Carapicuíba, São Paulo (indústria brasileira – CNPJ 62.134.67/0001-00). Tendo como responsável a farmacêutica Tsilia Schraibman –CRF-8 n° 7546. As matrizes foram manipuladas na farmácia Homeoterápica sob a responsabilidade do farmacêutico Narciso da Lozzo Neto CRF-PR 5604. A a manipulação seguiu as normas da Farmacopéias Homeopática Brasileira com metodologia hanemanianna. Todas as sucussões foram feitas manualmente.
- Filtros Millex descartáveis de 0,22 µm de poro resistente a álcool da Millipore®.

### 5.3.3 Análise morfológica:

- Solução fixadora Bouin, corante líquido Giemsa, xilol e Entellan da Electron Microscopy Science (EMS)
- Álcool e acetona da Merck do Brasil.

### 5.3.4 Imunocitoquímica para quantificação de citocinas

- Mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA) kit da BD Biosciences, contendo:
  1. Mouse IL-2 Capture Beads
  2. Mouse IL—4 Capture Beads
  3. Mouse IL-5 Capture Beads
  4. Mouse IFN- $\gamma$  Capture Beads
  5. Mouse TNF- $\alpha$  Capture Beads
  6. Mouse Th1/Th2 PE (phicoeritrina) Detection Reagent
  7. Mouse Th1/Th2 cytokine Standards
  8. Cytometer Setup Beads
  9. PE Positive Control Detector
  10. FITC Positive Control Detector
  11. Wash Buffer
  12. Assay Diluent

### 5.3.5 Mensuração da produção de óxido nítrico

- NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> da Electron Microscopy Science (EMS).

- Meio cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB) Penicilina e estreptomicina da Gibco™.
- Lipopolissacarídeo (LPS), Interferon- $\gamma$ , Naftiletlenodiaminoda e Sulfonamina p-aminobenzeno e ácido N-2[-4hidroxietil piperazina N-2-etano sulfônico (HEPES) da Sigma-Aldrich Co.
- ácido orto-fosfórico (Merck).

## **5.4 MÉTODOS GERAIS**

### **5.4.1 Procedimento de esterilização de material de vidro e acessórios**

Para a realização do cultivo celular, os materiais que necessitaram de esterilização foram levados a autoclave (Fanen) a 120°C, durante 30 minutos, a 1atm (ponteiras plásticas para micropipeta, frascos de vidro para colocar soluções, tubos plásticos para microcentrífuga, tampas, equipamentos para filtragem sob pressão, membrana de celulose para filtragem) ou foram esterilizados no microondas durante 15 minutos na potência máxima (recipientes plásticos, lamínulas).

### **5.4.2 Procedimentos de esterilização dos medicamentos**

Os medicamentos foram filtrados com seringa e filtros Millex (Millipore®) de 0,22 $\mu$ m descartáveis e estocados em vidros previamente esterilizados em autoclave.

### **5.4.3 Soluções e meio de cultura utilizados nos procedimentos de cultivo celular.**

#### **5.4.3.1 Phosphate buffer solution (PBS)**

Esse tampão fosfato foi preparado com:

- 8g de NaCl,
- 0,2g KCl,
- 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
- 0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,
- 1000ml de água destilada

O pH ajustado foi ajustado para 7,4. A solução foi colocada em frascos de vidro, esterilizada em autoclave (120°C, 1 atm, 30 min.) e armazenada a 4°C.

#### 5.4.3.2 Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado com:

- 13,4 g de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM),
- 3,7 gramas de bicarbonato de sódio
- 2,5 gramas de ácido N-2[-4hidroxietil piperazina N-2-etano sulfônico (HEPES) e 900 ml de água destilada. O pH foi acertado para 7,4.

Foram adicionados, então:

- 200 U/ml de Penicilina
- 100 U/ml de estreptomicina
- 2,6µg/ml de amphotericina

Foi posteriormente esterelizado em sistema estéril por filtração sob pressão com membrana de acetato celulose estéril (0,22 µm de poro) em aparelho Sterifil® da Millipore®.

Após a esterelização, foi adicionado

- 100 ml soro fetal bovino (SFB) previamente esterelizado através do mesmo procedimento descrito acima, através de filtragem sob pressão em membrana de celulose.

Após o procedimento final, alíquotas de meio foram deixadas em estufa a 37°C por 48 horas, para um acompanhamento de possíveis contaminações. O meio foi, então estocado em geladeira a 4°C ou congelado.

#### 5.4.4 Soluções utilizadas na mensuração do óxido nítrico

##### 5.4.4.1 Reagente de Griess (GREEN et al., 1982).

Foram preparadas duas soluções mães:

Solução A: Naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido-ortofosfórico 5%(v/v)

Solução B: Sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v).

As duas soluções A e B foram misturadas no momento imediato do uso na proporção de 1:1.

Obs.: As soluções separadas podem ser estocadas na geladeira por 1 mês.

## **5.5 MÉTODOS DE ESTUDOS**

### **5.5.1 Obtenção e cultivo dos macrófagos peritoneais de camundongo**

#### **5.5.1.1 Coleta**

A coleta dos macrófagos ocorreu conforme protocolo rotineiro do nosso laboratório. Para isso, os camundongos foram mortos por deslocamento cervical. Presos em um suporte de isopor e a pele ventral levantada com auxílio de duas pinças dente de rato, puxando-a em direções contrárias para que essa fosse rompida e o peritônio exposto. Com uma seringa de 10 ml e agulha estéreis, foi injetado na cavidade peritoneal tampão PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7,2, gelado (4°C) e estéril, com o cuidado para não romper nenhuma víscera. Após agitar a solução salina no interior do peritônio, dando leves batidas nas laterais do abdômen para que os macrófagos presos na parede do peritônio se soltassem, a solução contendo macrófagos do peritônio (lavado intraperitoneal) foi retirada (aproximadamente 8 ml). O lavado foi transferido para um recipiente estéril o qual foi acondicionado no gelo para que impedisse a aderência das células à parede interna do recipiente.

#### **5.5.1.2 Plaqueamento**

Os macrófagos do lavado peritoneal foram imediatamente plaqueados em ambiente estéril (fluxo laminar).

O lavado peritoneal foi distribuído em placas de cultivo de 24 poços ( $4 \times 10^6$  células/poço) para os experimentos de análise morfológica e placas de 96 poços ( $5 \times 10^5$  célula/poço) para avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico.

As células plaqueadas foram levadas a estufa 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 15 minutos para separar as células aderentes das não aderentes. (PIEMONTE, 2002).

#### **5.5.1.3 Cultivo**

O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se aos macrófagos (células aderentes) meio de cultura "Dubecco's Modified Eagle Medium" (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal, contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l.

As células foram acondicionadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> onde foram cultivadas por 48 horas.

### **5.5.2 Tratamento *in vitro* dos macrófagos**

Após 2 horas de cultivo, cada grupo de macrófagos foi tratado com o seu medicamento correspondente numa proporção de 20% em relação à quantidade total de meio de cultivo. Apenas o grupo controle sem medicamento não recebeu tratamento.

Após 24 horas foi adicionada uma dose reforço de cada medicamento numa proporção de 1% medicamento para o total de meio de cultivo.

Todos os medicamentos, inclusive o medicamento Canova e a solução hidroalcoólica, foram sucussionados 15 vezes, antes de serem adicionados a cultura (PIEMONTE, 2000).

### **5.5.3 Divisão das células em grupos de estudo de acordo com os medicamentos.**

Os experimentos realizados foram cegos. Cada medicamento preparado homeopaticamente, já na farmácia, recebeu uma letra aleatória, a qual foi revelada apenas na etapa final, após a análise de cada experimento. Os medicamentos com suas respectivas potências foram:

1. *Aconitum napellus* DH 11, CH 6, CH12, CH30, CH200;
2. *Arsenicum album* DH 19, CH 6, CH12, CH30, CH200;
3. *Bryonia alba* DH 18, CH 6, CH12, CH30, CH200;
4. *Lachesis muta* DH18, CH 6, CH12, CH30, CH200;
5. *Thuja occidentalis* DH 19, CH 6, CH12, CH30, CH200;
6. *Mercurius solubilis* CH 6, CH12, CH30, CH200 e
7. *Belladonna* CH 6, CH12, CH30, CH200),

Os macrófagos cultivados foram divididos em 36 grupos (33 medicamentos e 3 controles).

Grupos controle:

1- Medicamento Canova utilizado como controle positivo, uma vez que já tínhamos conhecimento prévio de suas ações sobre os macrófagos peritoneais de camundongos para os experimentos que foram realizados.

2 – Solução de água e álcool 1%, a qual serve de meio de diluição para todos os medicamentos estudados.

3 – Sem tratamento, um grupo ao qual não é adicionado nenhum tipo de tratamento; as células são cultivadas apenas no meio de cultura.

Cada grupo de macrófagos, então, recebeu o medicamento de acordo com o seu grupo designado.

#### **5.5.4 Análise morfológica através de Microscopia Óptica**

Após as 48 horas de cultivo em placa de 24 poços e o tratamento dos macrófagos como descritos nos itens 6.5.1.3 e 6.5.2, respectivamente, as células foram processadas para análise morfológica através da microscopia óptica.

O meio das placas foi retirado e as lamínulas com as células aderidas foram lavadas com PBS, temperatura de 36°C e fixadas com fluido Bouin (EMS) por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas 2 vezes com etanol 70%, depois 2 vezes com água destilada e coradas com solução de Giemsa 10% em água destilada, durante duas horas e meia. O excesso de corante foi retirado e as lamínulas lavadas 2 vezes em água destilada, desidratadas em acetona e diafanizadas em soluções acetona:xilol nas seguintes proporções: mistura a: 2 acetona:1 xilol; mistura b: 1 acetona: 1 xilol; mistura c: 1 acetona: 2 xilol. Em seguida as células foram diafanizadas duas vezes em xilol puro e montadas em lâminas de vidro com Entelan. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Nikon eclipse E200.

Os macrófagos fixados tiveram sua morfologia analisada de forma duplo cega, seguindo-se, então, uma contagem discriminatória entre aqueles que apresentavam morfologia de ativados e morfologia de residentes.

Foi feita uma contagem duplo cega de 100 células em campos aleatórios por lamínula, a qual era discriminatória entre os macrófagos com morfologia de ativados e com morfologia de residentes. Como foram realizados três experimentos em triplicata, resultando num total de 252 lamínulas, ao todo foram contadas 25.200 células para a análise estatística.

### 5.5.5 Análise de citocinas

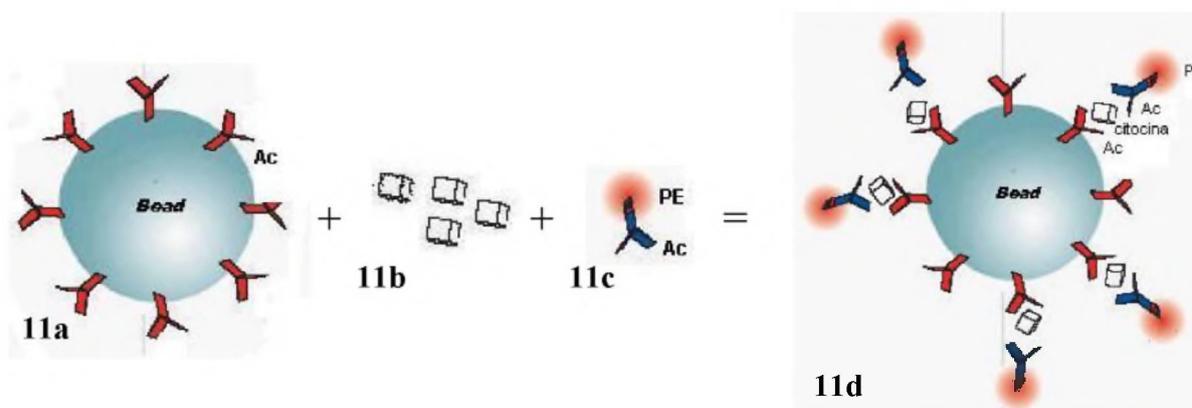
O procedimento para a análise das citocinas interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) produzidas pelos macrófagos e liberadas no sobrenadante da cultura, foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante kit BD Biosciences e posterior análise em citometria de fluxo BD FACSCalibur™, usando o programa BD CBA software.

- Após as 48 horas de cultivo em placa de 96 poços e o tratamento dos macrófagos como descritos nos itens 6.5.1.3 e 6.5.2, respectivamente, o sobrenadante celular foi retirado e centrifugado para que células presentes fossem descartadas. A mensuração das proteínas é feita no sobrenadante do cultivo.
- As soluções contendo os *beads* (mouse capture beads) (figura 11a) foram misturadas e então retirados 2,5 $\mu$ l de cada solução os quais foram misturados em um tubo especial para o citômetro de fluxo. Os *beads* conjugados a cada anticorpo (Ac), apresentam intensidades de fluorescências diferentes; assim, em uma ordem crescente de fluorescência têm-se TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 IL-4, IL-2.
- Após misturar novamente a solução, ela foi distribuída em tubos de citômetro separados e nomeados para cada amostra dos grupos de células (36 tubos);
- Foi adicionado aos tubos uma alíquota de 50  $\mu$ l do sobrenadante do cultivo centrifugado, aos tubos com a solução de *beads*;
- Adicionou-se, então, os anticorpos conjugados com o fluorocromo ficoeritrina (PE) e contra as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 IL-4, IL-2 (*mouse Th1/Th2 PE detection reagent*) (figura 11c) .
- As soluções contendo os *beads* com anticorpos contra as citocinas, os sobrenadantes das culturas e os anticorpos contra as citocinas conjugados com PE foram incubados por 2 horas no escuro;
- Após esse tempo, se houver a citocina específica no sobrenadante os componentes deveriam ter formado um complexo tipo “sanduiche”, onde o anticorpo do *Bead* liga-se a citocina assim como o anticorpo conjugado com PE (figura 11d).
- Adicionou-se a cada tubo do experimento 100 $\mu$ l da solução de lavagem e leitura (*wash buffer*).
- Os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 5 minutos; Com essa centrifugação, os *beads* descem para o fundo do tubo devido ao seu peso e os

anticorpos que possam ter ficados soltos devido a ausência de citocina na amostra ficam no sobrenadante podendo então serem descartados.

- Após o descarte adicionou-se 200µl de *wash buffer*, a solução foi homogeneizada e vortexada e imediatamente analisada em citômetro de fluxo FACSCalibur™.

FIGURA 11 - FORMAÇÃO DO “COMPLEXO SANDUÍCHE”.



A citocina presente no sobrenadante da cultura (figura 11a) liga-se ao Ac específico complexado com o *bead* (figura 11b). Quando o anticorpo específico contra a citocina e complexado com o PE (figura 11c) é adicionado a solução, este se liga a citocina, ficando, conseqüentemente preso ao bead (figura 11d).

Cada população de Ac usados para a detecção das citocinas recobrem cinco populações de *beads*, com intensidades de fluorescências distintas, os quais são lidos no canal FL3 do citômetro de fluxo num comprimento de onda a partir de 670 nm.

A intensidade da fluorescência (vermelho escuro) é distribuída em uma ordem crescente, partindo do TNF- $\alpha$  (tem um brilho menos intenso) e crescendo para o IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4 até IL-2 que possui a maior intensidade de fluorescência.

O PE (cor amarelo/alaranjada) conjugado ao anticorpo específico contra a citocina é lido no canal FL2 entre os comprimentos de onda 564-606 nm.

Dessa forma, a aquisição dos dados é feita usando o citômetro de fluxo, onde os resultados são gerados em gráficos através do software BD CellQuest™ e os

dados são tabulados através do software de análise BD CBA, baseados em uma curva de diluição das citocinas, feita com citocinas reconstituídas e serialmente diluídas (Mouse Th1/Th2 cytokine standards). A concentração é fornecida em pg/ml.

#### **5.5.6 Triagem dos medicamentos**

Após a análise morfológica e a análise da produção de citocinas, foi feita uma sobreposição dos resultados e triagem dos medicamentos que tiveram ação sobre a ativação morfológica e a produção de citocinas. Com os esses medicamentos seguiu-se o estudo de análise de produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

#### **5.5.7 Produção de óxido nítrico.**

Após 24 horas de cultivo em placa de 96 poços e o tratamento dos macrófagos como descritos nos itens 6.5.1.3 e 6.5.2, respectivamente, cada grupo de tratamento e os grupos controles foram subdivididos em dois. Um grupo foi utilizado como controle positivo de produção de óxido nítrico. As células desse grupo controle positivo foram incubadas com 50ng/mL de LPS+26U/mL de IFN- $\gamma$  por 24 horas em estufa a 37°C e em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, 100 $\mu$ l do sobrenadante das células de todos os grupos foi homogeneizado e transferido para uma outra placa de 96 poços. A esse sobrenadante foi adicionado 100 $\mu$ l do reagente de Griess (GREEN et al., 1982), o qual é constituído por uma mistura de duas soluções A e B na proporção de 1:1 imediatamente antes do uso. As soluções são preparadas como descrito no item 6.4.4.1. As células foram incubadas com esse reagente por 10 minutos em temperatura ambiente. Como o NO é altamente reativo, ele difunde-se através da membrana e apresenta um pequeno tempo de meia vida, somente alguns segundos (VAN der VEEN et al, 2000). Em soluções aquosas, o NO é rapidamente transformado em nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Assim, a concentração de nitrato foi determinada utilizando uma curva padrão de NaNO<sub>3</sub>. A absorbância foi medida em leitor de microplacas Bio-RAD modelo Benchmarck com filtro de 550nm.

#### **5.5.8 Análise estatística**

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística, sendo analisadas as repetições e as formas de tratamento. Em todos os experimentos foi realizada a análise de variância (ANOVA: fator único). O valor de F maior que o F crítico foi

considerado como existindo diferença estatisticamente significativa e tendo  $\alpha=0,05$ . Para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Tukey visando encontrar a diferença mínima significativa entre as 2 médias.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (média $\pm$ dp) de no mínimo três experimentos realizados em triplicatas para a análise de ativação morfológica e produção de óxido nítrico de no mínimo três experimentos em quintuplicata. Expressos como média $\pm$ erro padrão (média $\pm$ ep) para a análise da produção de citocinas de no mínimo três experimentos.

Todas as estatísticas foram realizadas como cega, pois os grupos de tratamentos, devidamente codificados de acordo com cada medicamento, só foram revelados após o término das análises.

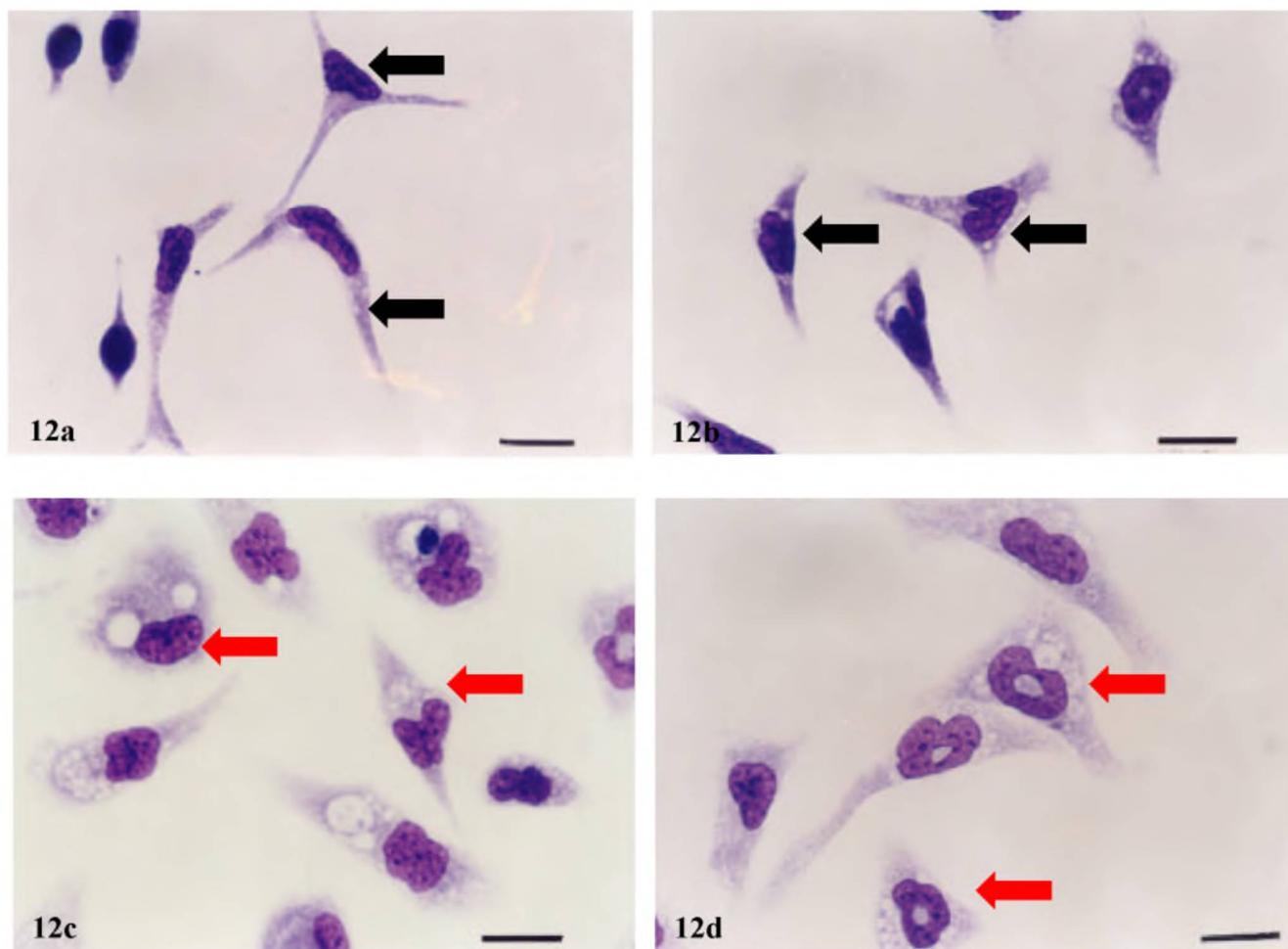
## 6 RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

Os experimentos realizados neste trabalho tiveram como objetivo avaliar a possível ação dos medicamentos homeopáticos, citados anteriormente, via ativação de macrófagos. O termo macrófago ativado foi introduzido na literatura e empregado extensivamente por Mackaness em 1960 para descrever as células que apresentavam um aumento na habilidade de fagocitar microorganismos e da atividade antimicrobial durante o combate a infecção. O macrófago ativado é maior, com citoplasma expandido, é mais espreado, possui muitas projeções filiformes em sua membrana citoplasmática, aumento na capacidade de adesão e de se espalhar sobre o substrato, um aumento no número de fagossomos e vesículas endocíticas e ainda é possível visualizar um núcleo grande e claro, rico em eucromatina (NORTH, 1978).

Nas figuras 12c e 12d é possível verificar a morfologia dos macrófagos ativados e residentes no grupo controle positivo, tratado com medicamento Canova. Diferente da morfologia do grupo controle sem tratamento (figuras 12a e 12b). Pode-se observar que no grupo tratado com Canova a maioria das células são macrófagos ativados (setas vermelhas). Já no grupo controle os macrófagos com morfologia residentes (setas pretas) estão em maior número.

FIGURA 12: MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS RESIDENTES DO GRUPO CONTROLE SEM TRATAMENTO E DOS MACRÓFAGOS ATIVADOS DO GRUPO CONTROLE POSITIVO COM O MEDICAMENTO CANOVA.



Macrófagos aderentes foram cultivados por 48 horas em placas de 24 poços com lamínulas de vidro e processados para microscopia ótica. As micrografias são representativas de macrófagos residentes (setas pretas) do grupo controle sem tratamento (fig. 12a e 12b), onde pode-se observar células com núcleos escuros com muita heterocromatina, citoplasma escasso e poucas projeções citoplasmáticas; e de macrófagos ativados (setas vermelhas), do grupo tratado com o medicamento Canova (fig. 12c e 12d), onde pode-se observar características de ativação presentes, núcleos com eucromatina dominante, citoplasma claro e bastante vacuolizado com várias projeções. Barra: 10 $\mu$ m.

Após a análise duplo-cega das células de todos os grupos foi feita a estatística como descrito no item 6.5.7.

Os gráficos demonstrativos da análise foram agrupados de acordo com as potências dos medicamentos.

O gráfico 1 mostra o gráfico com os medicamentos na potência CH6. Nesta potência os medicamentos *Lachesis muta*, *Arsenicum album*, *Mercurius solubilis*, *Belladonna* e o controle positivo com medicamento Canova, mostraram estar ativando estas células, com um aumento significativo no número de macrófagos ativados em relação ao número de macrófagos residentes, quando comparados ao grupo controle.

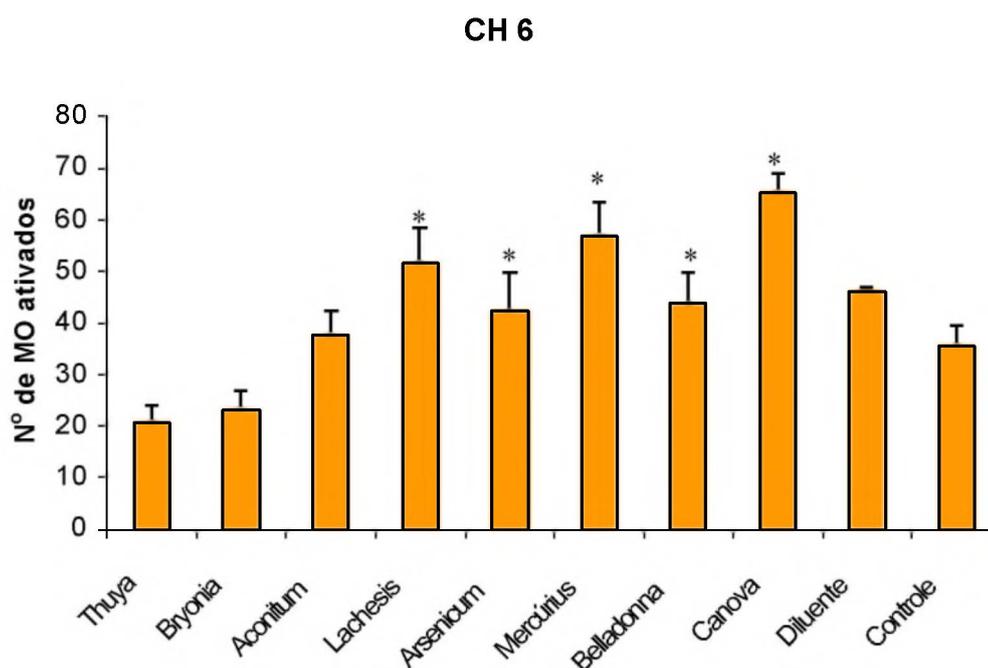
Esse aumento estatisticamente significativo na relação entre o número de macrófagos ativados/residentes foi observado com os medicamentos *Aconitum napellus*, *Lachesis muta*, *Arsenicum album*, *Mercurius solubilis* e o controle positivo Canova na potência CH 12 (gráfico 2), *Thuya occidentalis*, *Aconitum napellus*, *Mercurius solubilis*, *Belladonna* e Canova na potência CH 30 representada no gráfico 3, *Thuya occidentalis*, *Lachesis muta*, *Mercurius solubilis*, *Belladonna*, e o controle positivo Canova na potência CH 200 (gráfico 4) e com a *Thuya occidentalis* e o controle Canova na potência decimal representados gráfico 5.

No cultivo de macrófagos, o controle do experimento, onde estão aquelas células que não recebem nenhum tipo de tratamento, normalmente apresenta-se com aproximadamente 30 a 40% de macrófagos com morfologia de ativados (PIEMONTE, 2002). Os grupos tratados com os medicamentos *Thuya occidentalis* CH 6 e *Bryonia alba* CH 6 apresentaram uma baixa relação entre macrófagos ativados/residentes significativa quando comparados ao grupo controle.

Os medicamentos *Thuya occidentalis* e *Bryonia alba* na potência CH 6 representados no gráfico 1 e o *Arsenicum album* na potência DH 19 representado no gráfico 5 mostraram uma certa toxicidade, pois diminuiu o número de macrófagos ativados. Os medicamentos *Bryonia alba* e *Lachesis muta* na potência DH 18 (gráfico 5) apresentaram toxicidade mais elevada, pois os macrófagos tratados com estes medicamentos aderiram a lamínula, porém não conseguiram se espalhar no substrato (lamínula), ficando com aspecto de “bolinha”, como se fossem pequenos Infócitos.

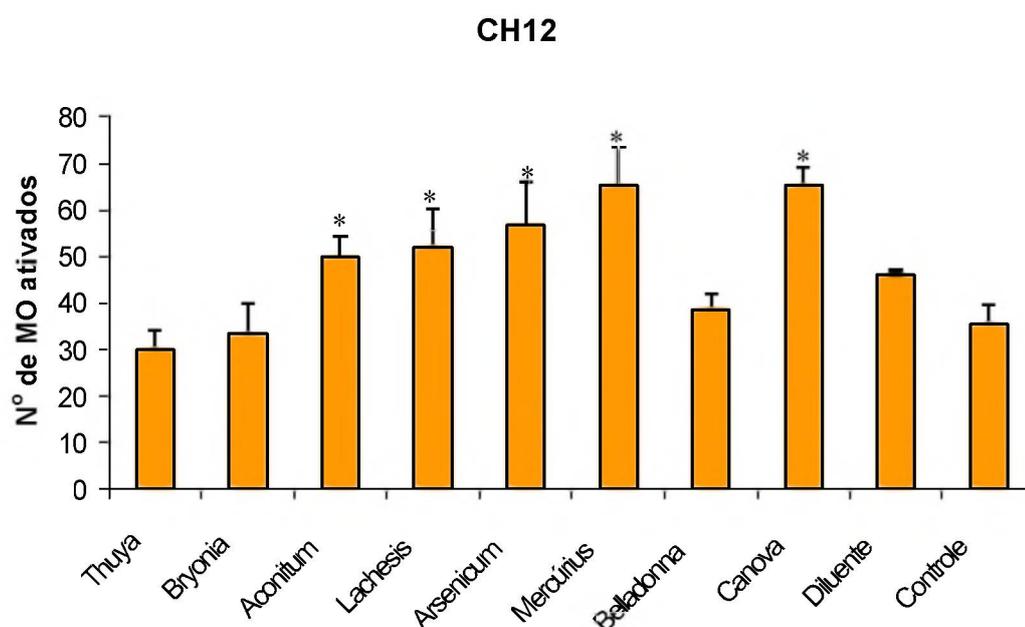
Os medicamentos *Aconitum napellus* DH 11, CH 6, *Bryonia alba*, *Belladonna* e *Thuya occidentalis* CH 12, *Bryonia alba*, *Arsenicum album* e *Lachesis muta* CH 30, *Aconitum napellus*, *Arsenicum album*, *Bryonia alba* CH 200 e o controle diluente não alteraram a morfologia dos macrófagos. A seguir serão mostrados os gráficos dos medicamentos que atuaram sobre os macrófagos.

GRÁFICO 1 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH6 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO .



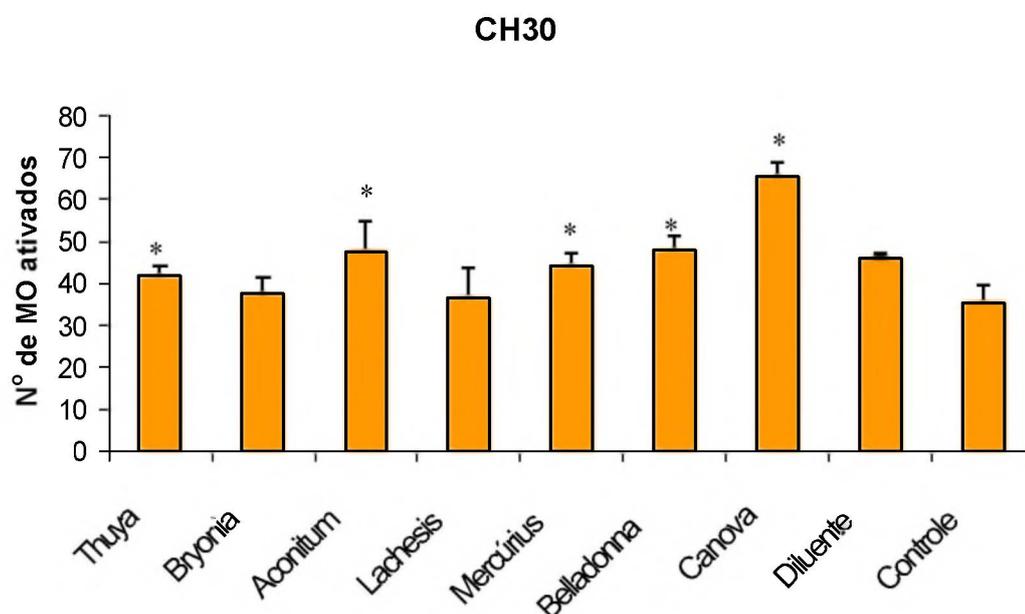
NOTA: \*Indica quais grupos tiveram diferença significativa entre o número de macrófagos ativados/residentes quando comparados aos grupos controles, definidos pelo teste de Tukey;  $p \leq 0,05$ . Para a estatística foram contados 100 macrófagos por lamínula (macrófagos ativados e residentes), de no mínimo três experimentos feitos em triplicata. Os valores representam a média  $\pm$  dp.

GRÁFICO 2 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH12 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO .



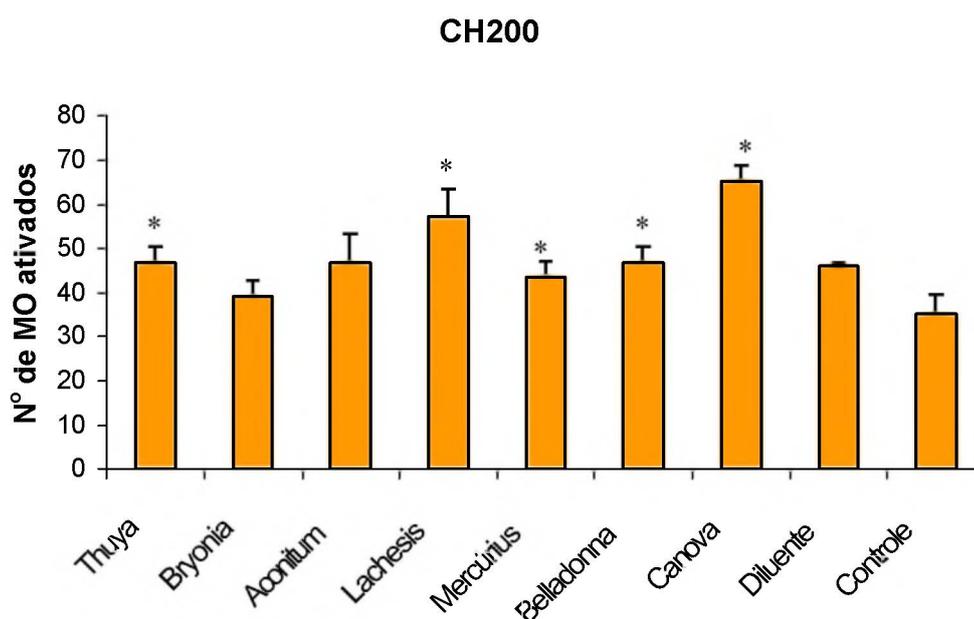
NOTA: \*Indica quais grupos tiveram diferença significativa entre o número de macrófagos ativados/residentes quando comparados aos grupos controles, definidos pelo teste de Tukey;  $p \leq 0,05$ . Para a estatística foram contados 100 macrófagos por lamínula (macrófagos ativados e residentes), de no mínimo três experimentos feitos em triplicata. Os valores representam a média  $\pm$  dp.

GRÁFICO 3 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH30 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO .



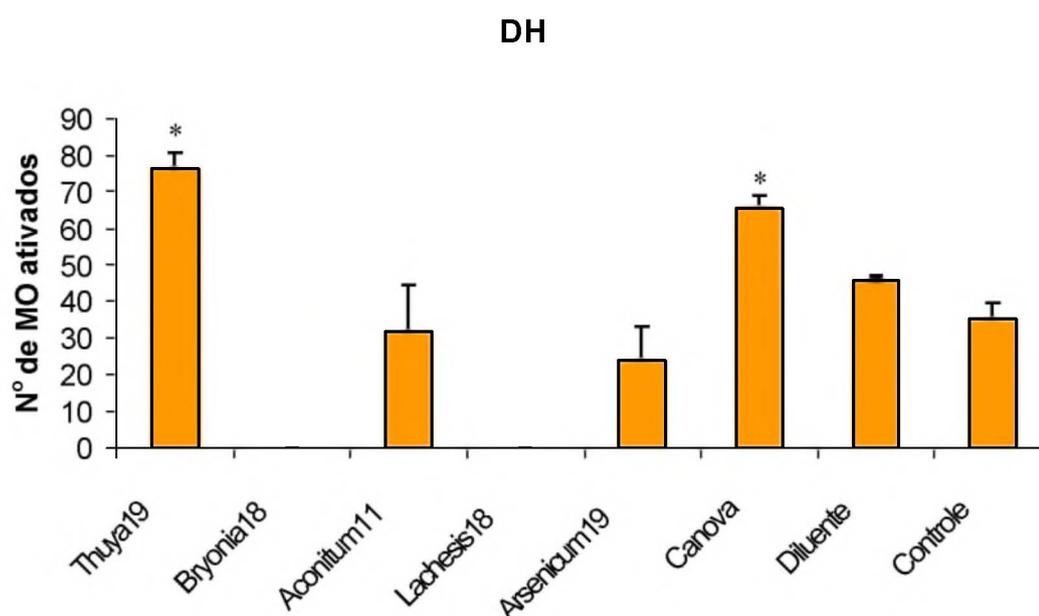
NOTA: \*Indica quais grupos tiveram diferença significativa entre o número de macrófagos ativados/residentes quando comparados aos grupos controles, definidos pelo teste de Tukey;  $p \leq 0,05$ . Para a estatística foram contados 100 macrófagos por lamínula (macrófagos ativados e residentes), de no mínimo três experimentos feitos em triplicata. Os valores representam a média  $\pm$  dp.

GRÁFICO 4 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NA POTÊNCIA CH200 SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO .



NOTA: \*Indica quais grupos tiveram diferença significativa entre o número de macrófagos ativados/residentes quando comparados aos grupos controles, definidos pelo teste de Tukey;  $p \leq 0,05$ . Para a estatística foram contados 100 macrófagos por lamínula (macrófagos ativados e residentes), de no mínimo três experimentos feitos em triplicata. Os valores representam a média  $\pm$  dp.

GRÁFICO 5 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS NAS POTÊNCIAS DECIMAIS SOBRE A MORFOLOGIA DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO .



NOTA: \*Indica quais grupos tiveram diferença significativa entre o número de macrófagos ativados/residentes quando comparados aos grupos controles, definidos pelo teste de Tukey;  $p \leq 0,05$ . Para a estatística foram contados 100 macrófagos por lamínula (macrófagos ativados e residentes), de no mínimo três experimentos feitos em triplicata. Os valores representam a média  $\pm$  dp.

## **6.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS**

A produção de citocinas está entre as mais precoces marcas detectáveis de ativação de macrófagos quando uma resposta imune é ativada (PENNANEN et al, 1995). É conhecido que macrófagos tem um importante papel no mecanismo de defesa contra infecções e destruição de células tumorais, através da secreção de várias citocinas (CHOI; HWANG, 2002). Assim, foi possível usar o sobrenadante da cultura dos macrófagos para detectar possíveis citocinas produzidas e secretadas pelos macrófagos, de acordo com o item 6.5.5.

### 6.2.1 Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

A principal fonte de TNF- $\alpha$  é o fagócito mononuclear ativado pelo LPS, embora as células T estimuladas por antígenos, as células NK e os mastócitos ativados possam também secretar esta proteína. O TNF- $\alpha$  é produto de um gene único localizado dentro do MHC no cromossomo 6 do homem. No fagócito mononuclear, o TNF- $\alpha$  é inicialmente sintetizado como uma proteína transmembrânica não glicosilada de aproximadamente 25 kD (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O TNF- $\alpha$  participa na defesa do hospedeiro contra patógenos, e modula a resposta imune por ativar a produção de outras citocinas regulatórias como IL-1, IL-6, IFNs, fatores de crescimento e fatores estimuladores de colônia de granulócito e monócitos (HONG et al, 2005).

Em nossas análises, nenhum dos medicamentos homeopáticos testados mostraram alterar significativamente a via de produção de TNF- $\alpha$ . Por esse motivo os dados não estão mostrados. Resultados anteriores, obtidos em nosso laboratório, mostraram que quando os animais do biotério não estão saudáveis, isto é, as células controles produzem grande quantidade dessa molécula, o medicamento Canova diminui acentuadamente a produção de TNF- $\alpha$ . Para os experimentos atuais os animais foram tratados anteriormente, de forma que os macrófagos do grupo controle também não estavam liberando essa citocina.

### 6.2.2 Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )

Diversos estudos tem indicado que uma citocina pode regular a expressão de outras citocinas bem como de seus receptores de uma maneira autócrina e parácrina. Esta capacidade é dependente do tipo celular. No macrófago, por exemplo, o IFN- $\gamma$  é capaz de induzir o acúmulo de seu próprio RNAm bem como a secreção da proteína IFN- $\gamma$ . O gene do IFN- $\gamma$  é constitutivamente transcrito em macrófagos peritoneais de camundongos mas seu RNAm passa por uma rápida reciclagem nessas células. Esses dados indicam que macrófagos estão primariamente prontos para produzir IFN- $\gamma$  e que sinais positivos ou negativos podem regular a liberação local desta citocina (GESSANI; BELARDELLI, 1998).

O IFN- $\gamma$  também chamado interferon imune ou do tipo II, é uma glicoproteína homodimérica, contendo duas subunidades de 21 e de 234 kD. A transcrição é diretamente iniciada como uma consequência da invasão do antígeno e é potencializada pela IL-2 e pela IL-12. Esta citocina tem sido reconhecida como o maior conversor de macrófagos do estado residente para ativados. O IFN- $\gamma$  estimula diversas funções antitumorais de macrófagos, atividade antimicrobial, aumento na destruição de patógenos intracelular e processamento e apresentação de antígenos á linfócitos através da indução do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (GESSANI; BELARDELLI, 1998).

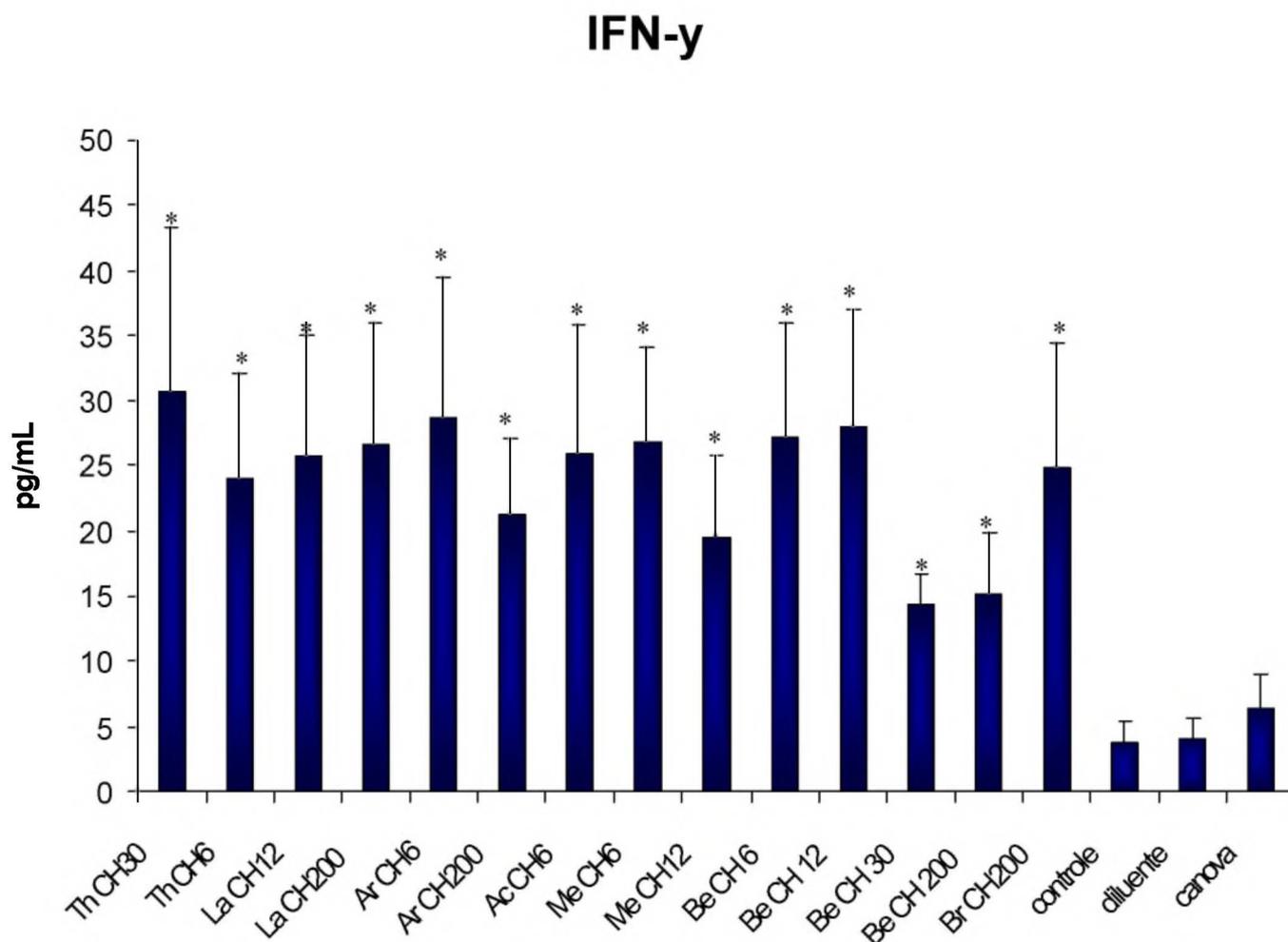
Além de ser requerido como o primeiro sinal de ativação de macrófagos antes de esta célula poder ser subsequentemente ativado por um segundo sinal, como LPS ou TNF- $\alpha$  (HONG et al, 2005).

A análise através do citômetro de fluxo, mostrou que macrófagos que receberam o tratamento com *Thuya occidentalis* CH 6 e CH 30 e, *Lachesis muta* CH 12 e CH 200, *Arsenicum album* CH 6 e CH 200, *Aconitum napellus* CH 6, *Mercurius solubilis* CH 6 e CH 12, *Belladonna* CH 6, CH 12, CH 30 e CH 200 e *Bryonia alba* CH 200, tiveram um aumento na liberação de IFN- $\gamma$  para o meio, significativo quando comparados ao grupo controle sem tratamento (gráfico 6).

Os medicamentos que mostraram estar possivelmente aumentando ativação da via de liberação de INF- $\gamma$  no grupo de macrófagos tratados em relação ao controle na potência CH 6 foram *Arsenicum album*, *Thuya occidentalis*, *Mercurius solubilis*, *Aconitum napellus* e *Belladonna* (gráfico 7), *Lachesis muta* e *Mercurius*

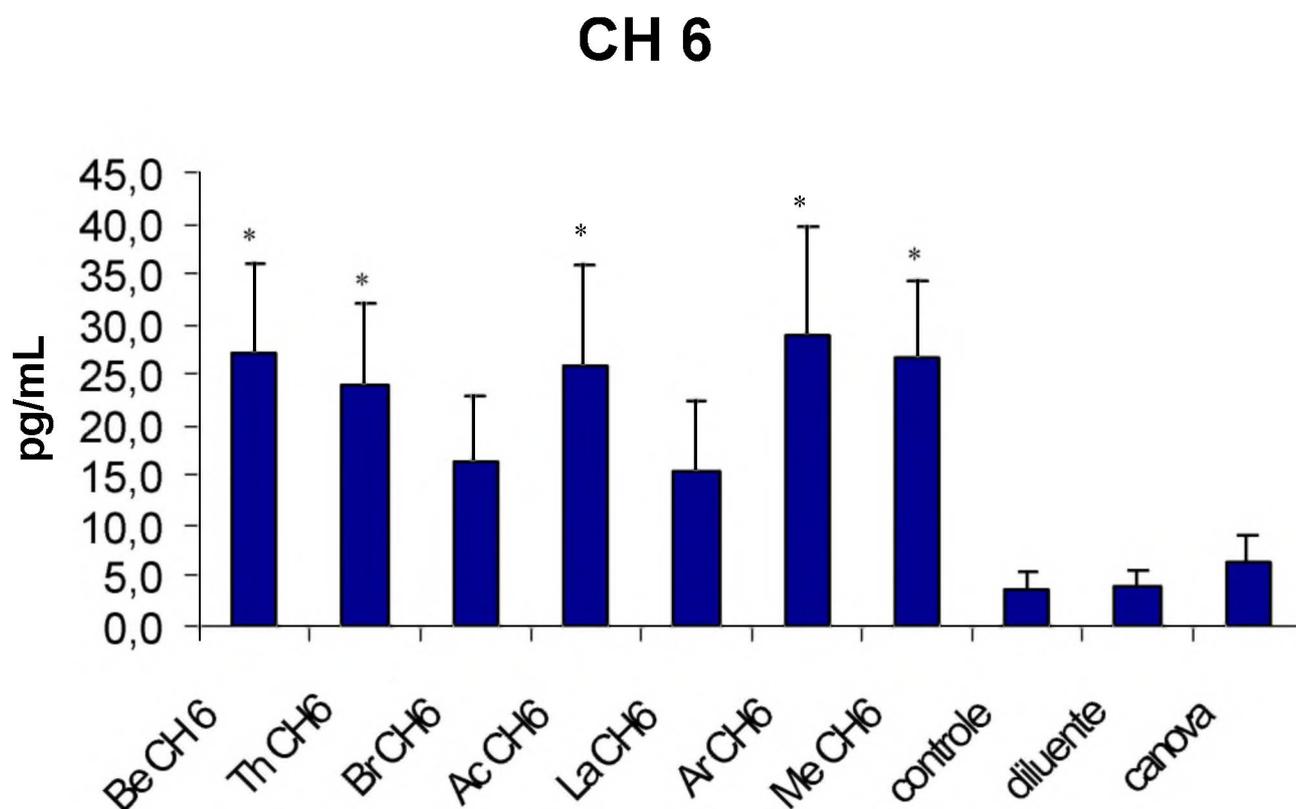
*solubilis* e *Belladonna* na potência CH 12 na (gráfico 8), *Thuya occidentalis* e *Belladonna* na potência CH 30 (gráfico 9), e *Lachesis muta*, *Bryonia alba*, *Arsenicum album* e *Belladonna* na potência CH 200 (gráfico 10). Os medicamentos na potência DH não mostraram atuar sobre a liberação dessa citocina. O gráfico representativo dos medicamentos nas potências decimais foram omitidos.

GRÁFICO 6 - MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS QUE MOSTRARAM ATIVAR A LIBERAÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  NOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO .



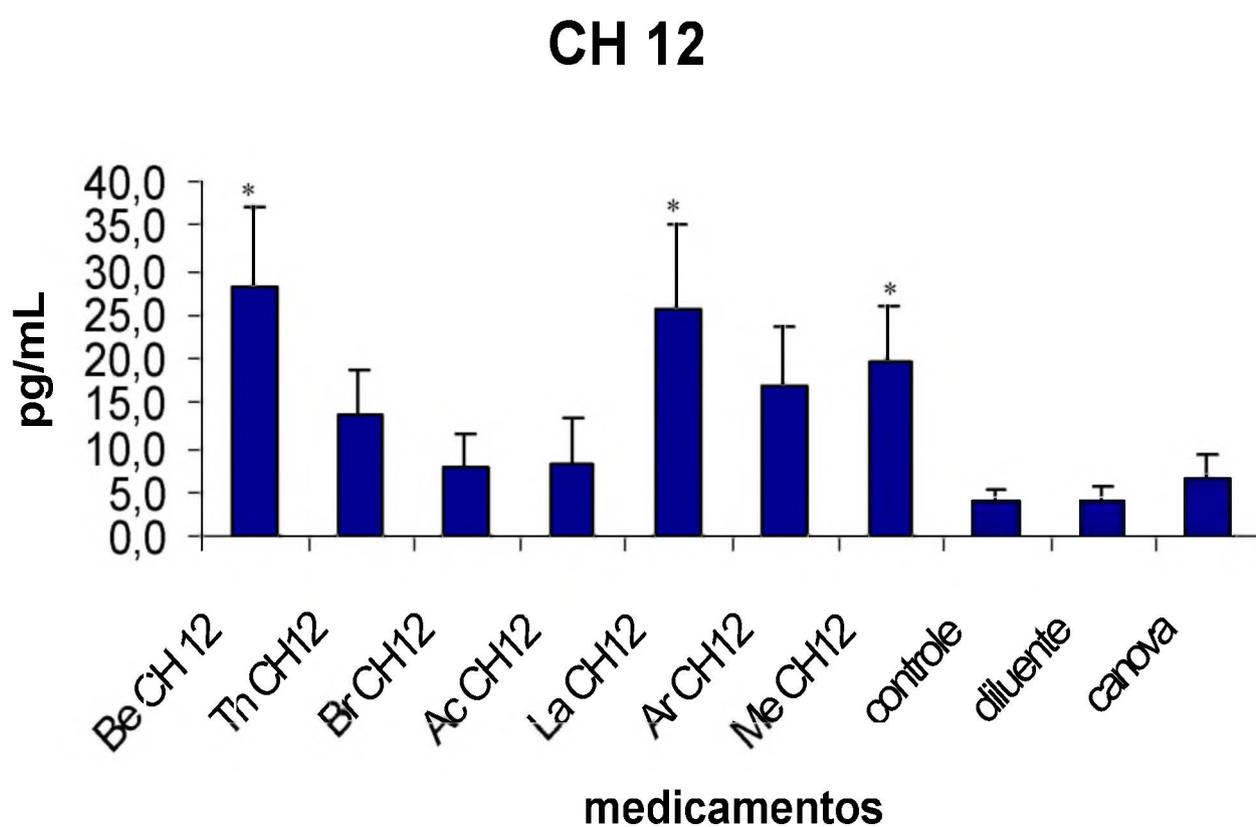
NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

GRÁFICO 7 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 6, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO .



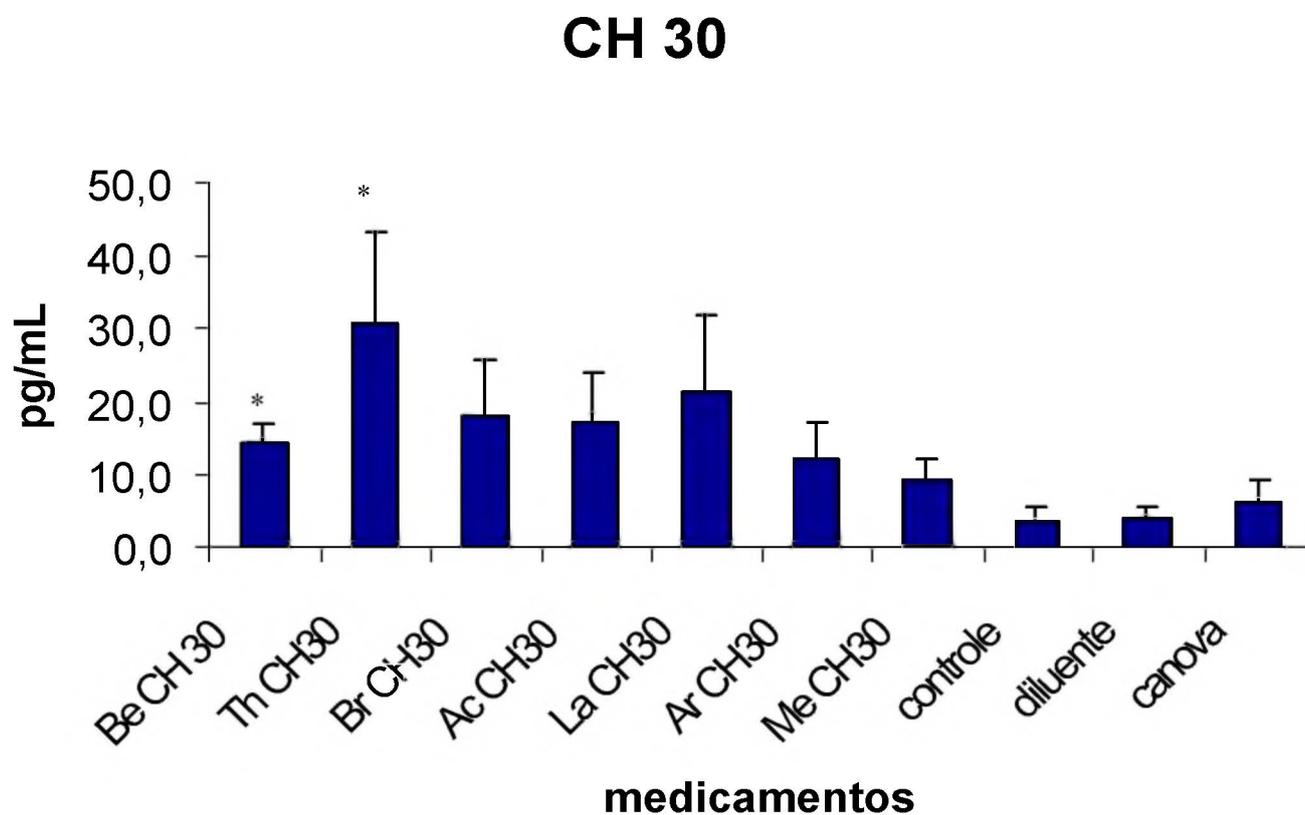
NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

GRÁFICO 8 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 12, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



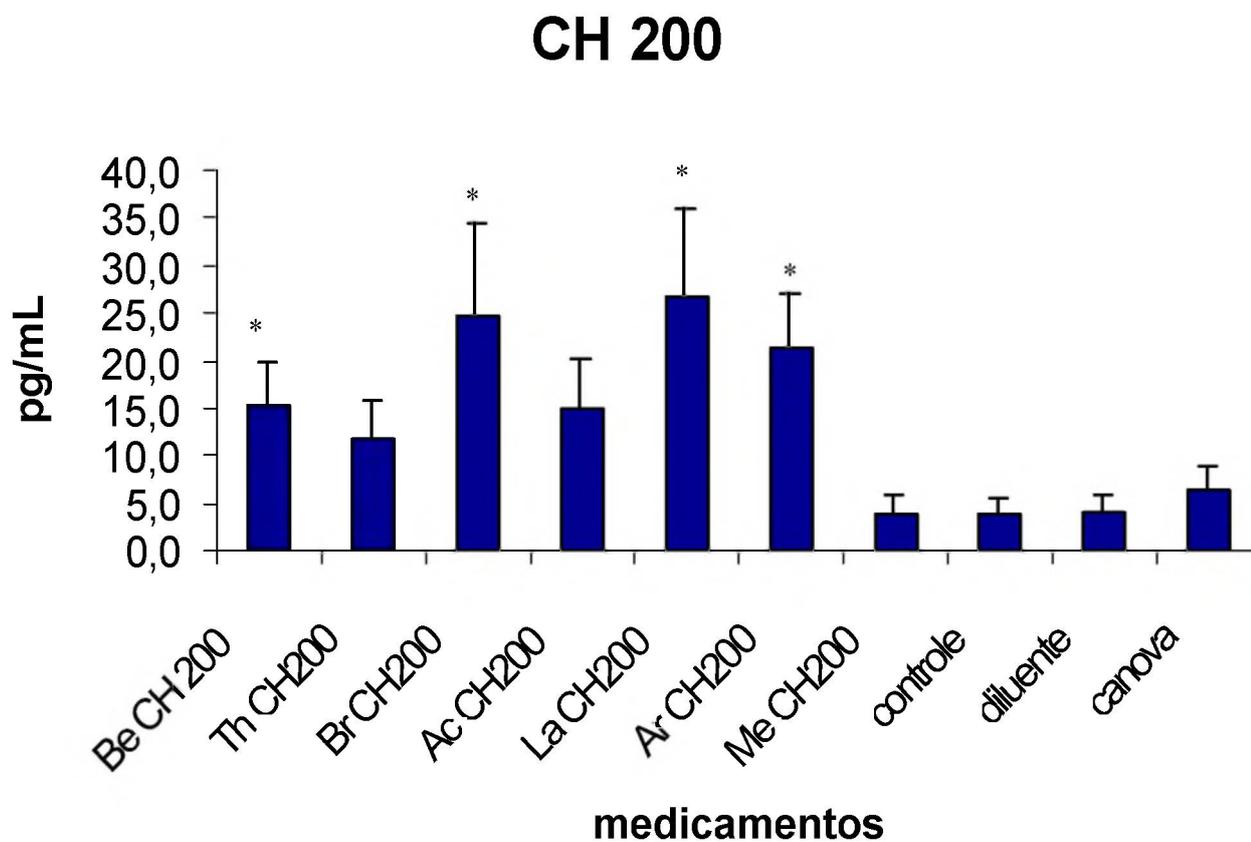
NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

GRÁFICO 9 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 30, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

GRÁFICO 10 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 200, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IFN- $\gamma$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



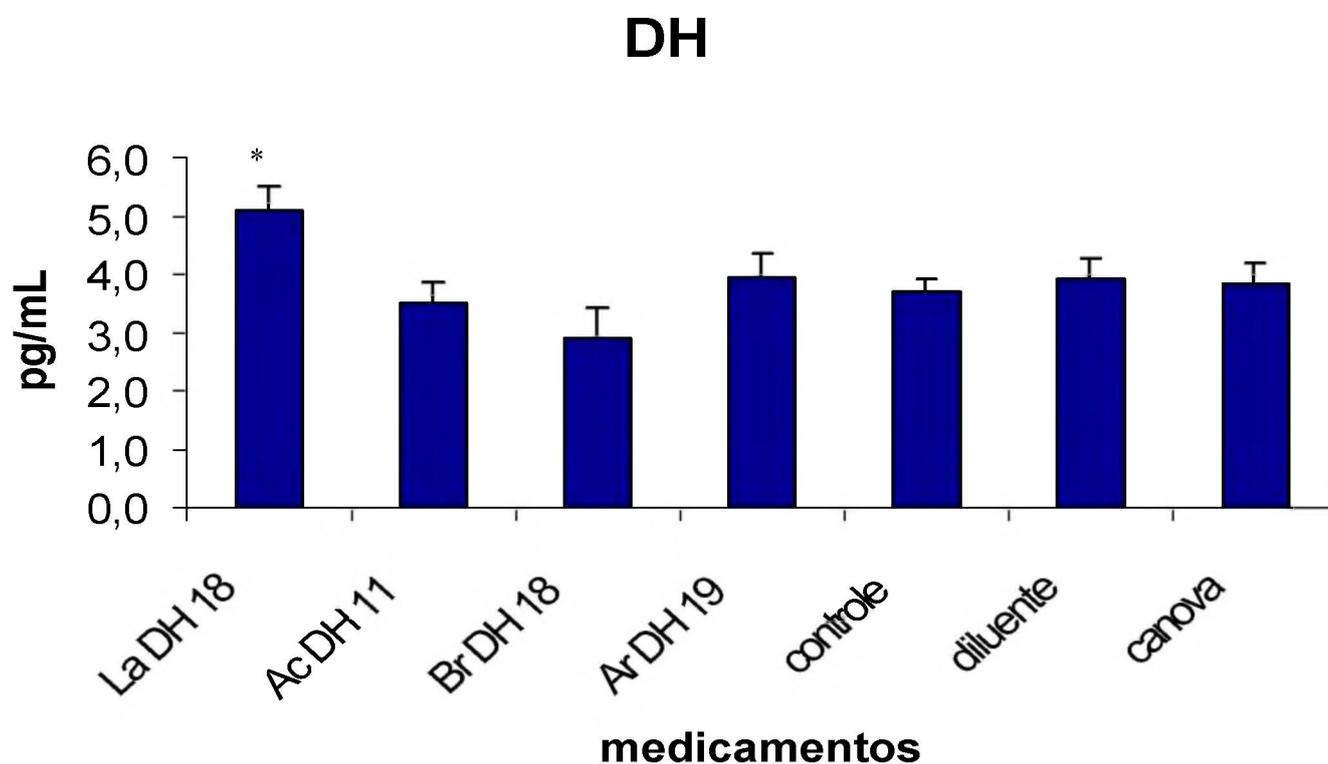
NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

### **6.2.3 Interleucina-5 (IL-5)**

A interleucina-5 (IL-5) é uma citocina com aproximadamente 20 kD, que funciona como um homodímero. A IL-5 pertence à família de citocinas de quatro α-hélices, com cada feixe de quatro hélices consistindo de três fitas de um monômero e uma fita de outro monômero (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). É responsável pela ativação e quimiotaxia de eosinófilos e basófilos (KAISER, 2004).

Em nossos estudos apenas o medicamento Lachesis muta na potência DH 18 mostrou alterar significativamente a produção da citocina IL-5 no grupo tratado com este medicamento quando comparado ao grupo controle sem tratamento (gráfico 11) diferente da análise dos demais grupos, onde não houve um aumento significativo da produção desta citocina quando comparados ao grupo controle sem tratamento. Isso pode ser observado pela análise dos gráficos distribuídos de acordo com a potência dos medicamentos. Os demais gráficos foram omitidos

GRÁFICO 11 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, EM POTÊNCIAS DECIMAIS, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-5 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

#### 6.2.4 Interleucina-4 (IL-4)

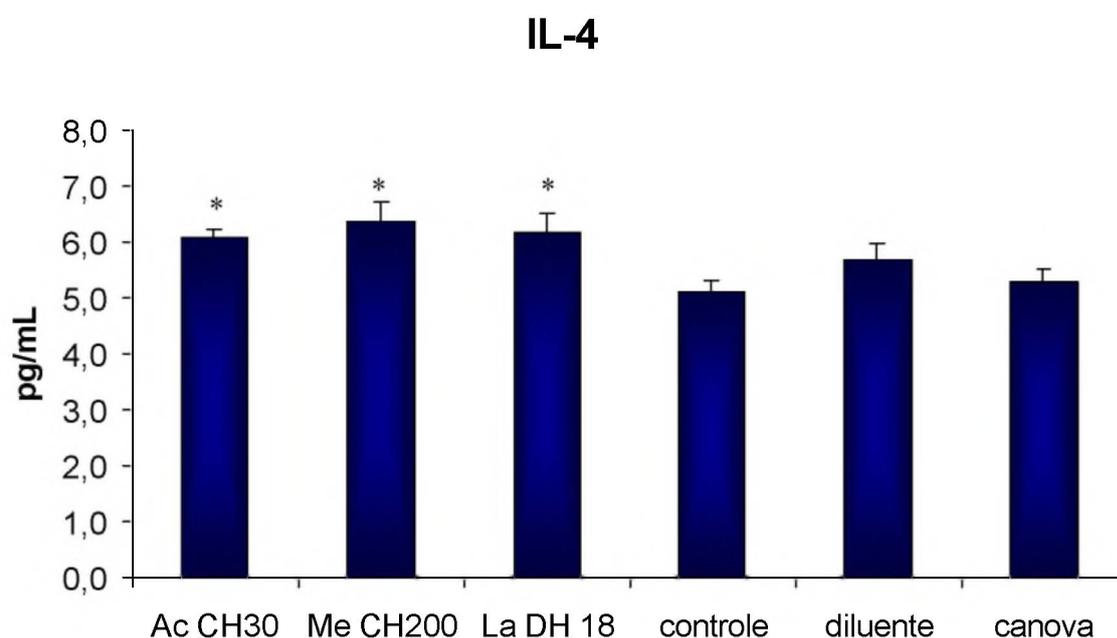
A interleucina 4(IL-4) é membro da família de citocinas de quatro  $\alpha$ -hélices, e seu receptor é uma proteína de 130 kD (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Como muitas citocinas, a IL-4 pode afetar uma variedade de células alvos em múltiplas maneiras. IL-4 tem um importante papel na regulação da produção de anticorpo, hematopoiese e inflamação e no desenvolvimento de respostas efetoras Th2. IL-4 está envolvida na proliferação e diferenciação de células B ativadas. No aumento da expressão de receptores para IgE sobre células B residentes. Sobre células B ativadas, IL-4 aumenta a expressão de IgG1 e IgE. IL-4 afeta várias outras células incluindo granulócitos, fibroblastos, células endoteliais. O efeito biológico da IL-4 são numerosos e muitos destes são como resultados da ação indireta da estimulação da IL-4 em outras células para produzir outras citocinas (HONG et al, 2005).

A IL-4 teve um aumento significativo na sua produção pelos macrófagos dos grupos tratados com os medicamentos *Aconitum napellus* CH 30, *Mercurius solubilis* CH 200 e *Lachesis muta* DH 18 quando comparados ao grupo controle sem tratamento (gráfico 12).

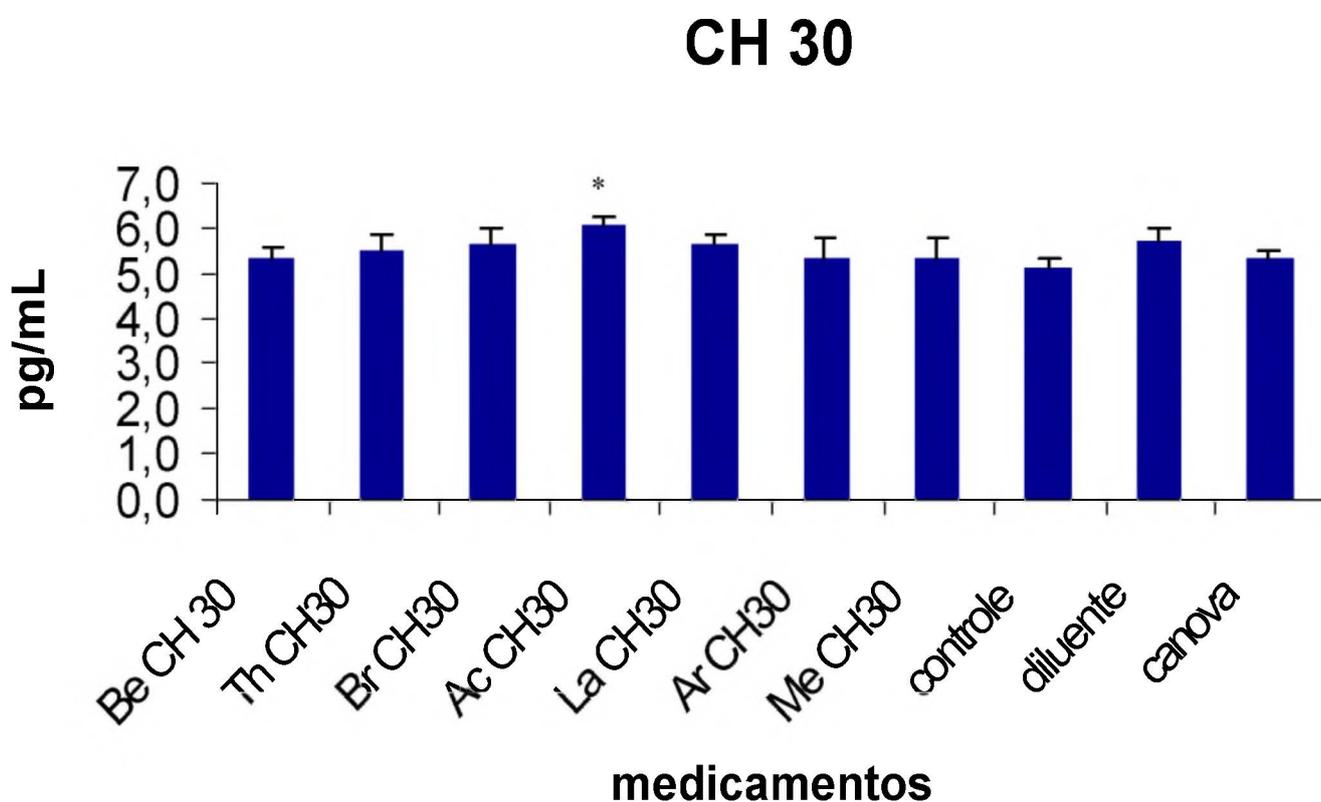
Nos demais grupos tratados com os outros medicamentos homeopáticos não houve um aumento significativo da produção desta citocina. Abaixo estão representados apenas os gráficos com os medicamentos significativos, os demais foram omitidos.

GRÁFICO 12 - MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS QUE MOSTRARAM ATIVAR A PRODUÇÃO DE IL-4 PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO QUANDO TRATADOS *IN VITRO*.



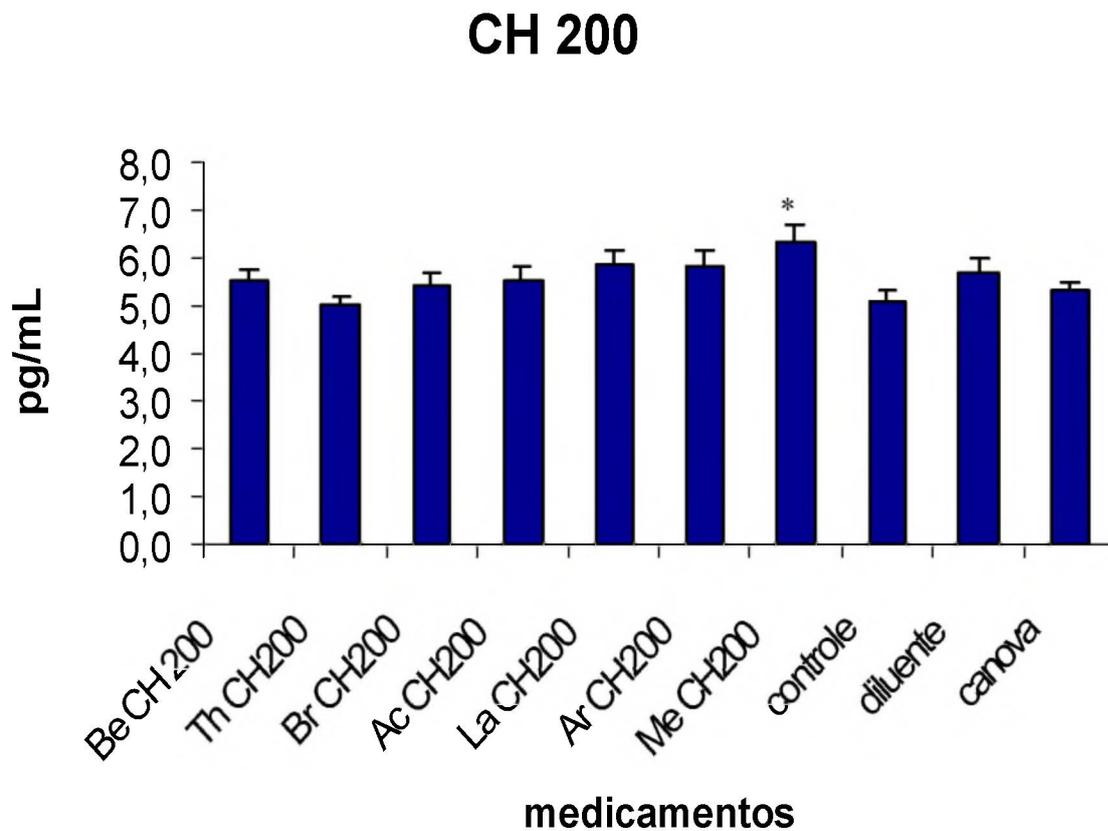
NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

GRÁFICO 13 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 30, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-4 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



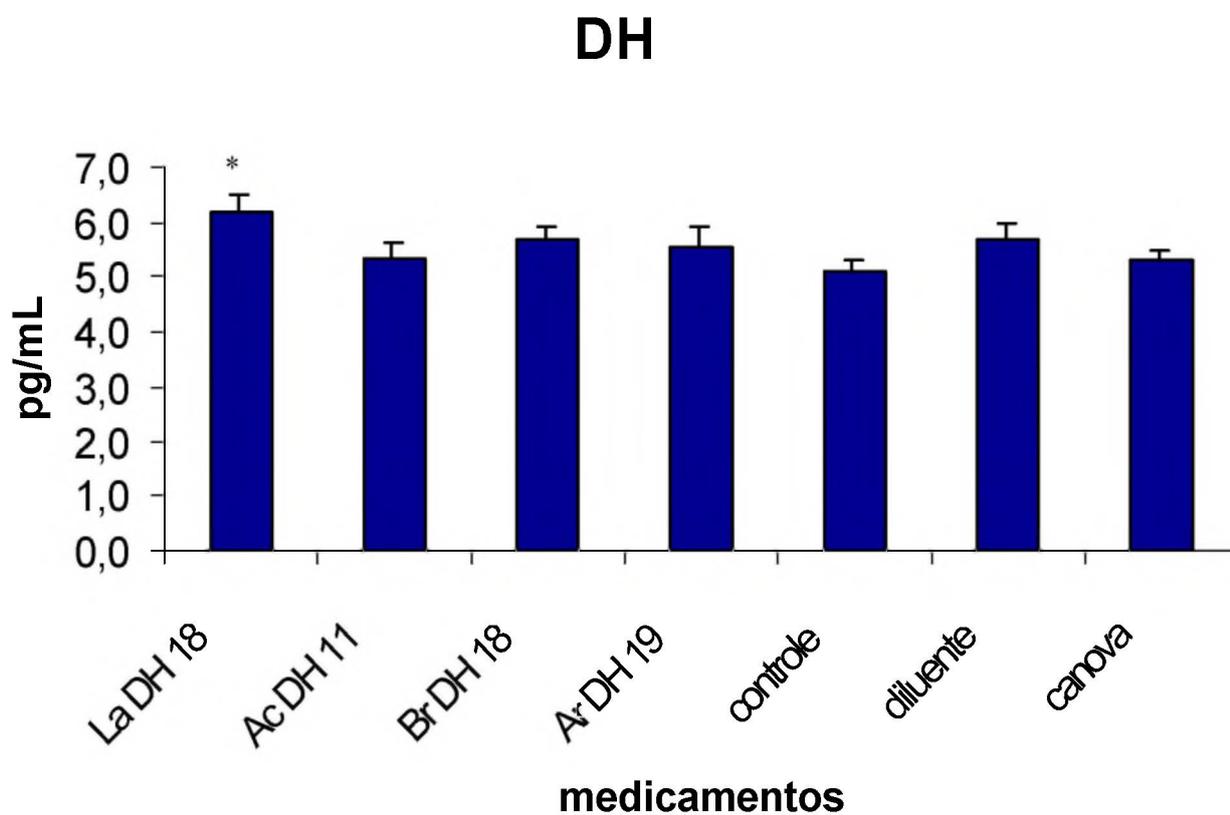
NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

GRÁFICO 14 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 200, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-4 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

GRÁFICO 15 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, EM POTÊNCIA DECIMAL, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-4 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

### 6.2.5 Interleucina-2 (IL-2)

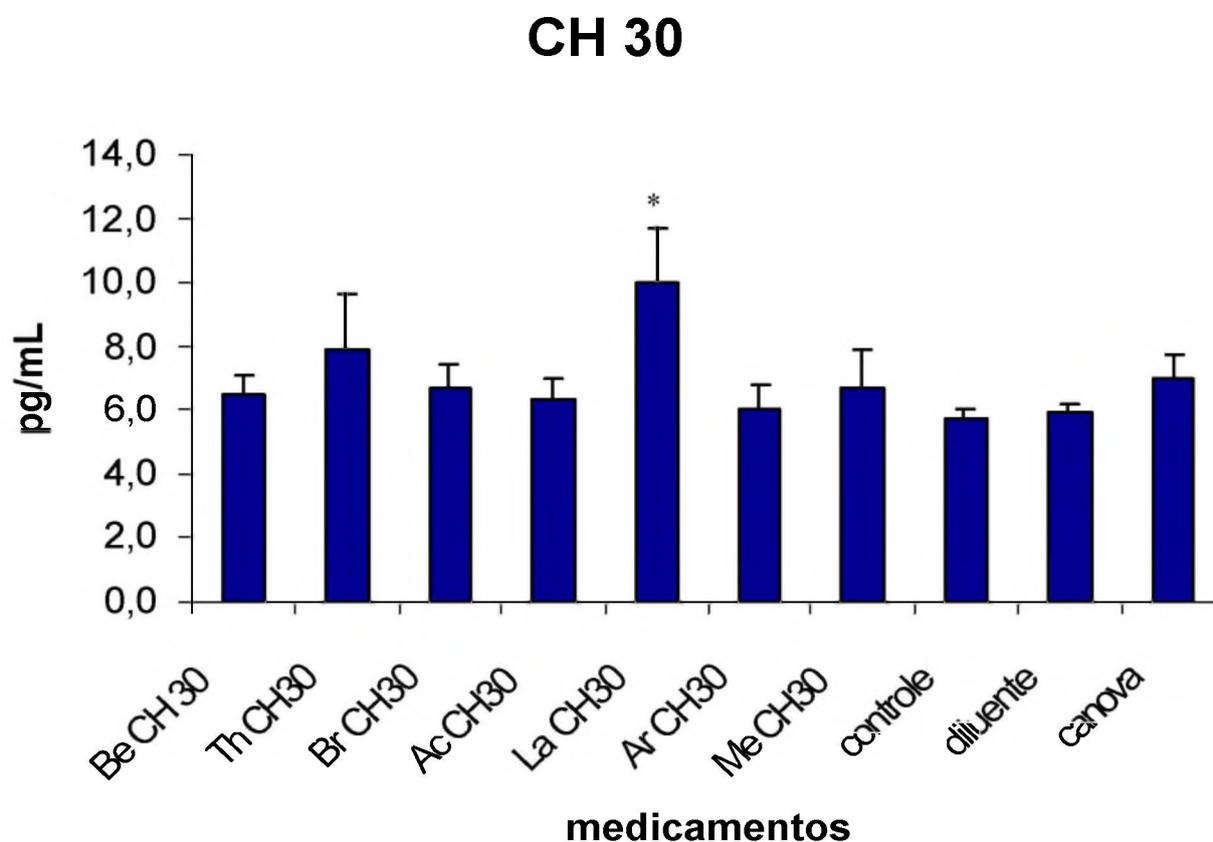
A IL-2 é uma glicoproteína de 14 a 17 kD, que em humanos é codificada por um gene único no cromossomo 4.

É originalmente chamada fator de crescimento da célula T (TCGF), é a principal citocina responsável pela progressão dos linfócitos T da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Durante as respostas imunes fisiológicas, a IL-2 não circula no sangue para agir a distância, e por isto não é considerada um fator de crescimento endócrino (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Possui múltiplas funções imunoregulatórias funcionais e propriedades biológicas. A sua produção leva a uma resposta imune celular tipo Th2. IL-2 junto com outros fatores e em conjunto com outros antígenos, ou anticorpos, controlam proliferação de células B e diferenciação destas em plasmócitos (HONG et al., 2005).

Apenas o medicamento *Lachesis muta* na potência CH 30 mostrou possivelmente atuar sobre os macrófagos através do aumento significativo na produção da citocina IL-2 quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle sem tratamento (gráfico 16).

Os demais medicamentos não mostraram atuar na via de produção desta citocina, dessa forma os gráficos representativos foram omitidos.

GRÁFICO 16 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, NA POTÊNCIA CH 30, SOBRE A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-2 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.



NOTA: Análise estatística para comparação de médias com ANOVA e significância definida pelo teste de Tukey (\*);  $p \leq 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  ep.

### 6.3 TRIAGEM DOS MEDICAMENTOS

Após a análise morfológica e a análise da produção de citocinas, foi feita uma sobreposição dos resultados e triagem dos medicamentos que tiveram ação sobre a ativação morfológica e a produção de citocinas simultaneamente. Resultaram, então, os medicamentos *Thuya occidentalis* CH 30, *Lachesis muta* CH 12 e 200, *Arsenicum album* CH 6, *Mercurius solubilis* CH 6 e 12, *Mercurius solubilis* CH 200, *Belladonna* CH 6, CH 30 e CH 200, *Aconitum napellus* CH 30 (figura 32).

QUADRO 3 – RESULTADOS DA MORFOLOGIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS

	Morfologia	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-5	IL-4	IL-2
Th CH6	■					
Th CH12						
Th CH30	■		■			
Th CH200	■					
Br CH6	■					
Br CH12						
Br CH30						
Br CH200			■			
Ac Ch 6			■			
Ac CH12	■					
Ac CH30	■				■	
Ac CH200						
La Ch 6	■					
La CH12	■		■			
La CH30						■
La CH200	■		■			
Ar Ch 6	■		■			
Ar CH12	■					
Ar CH30						
Ar CH200			■			
Me CH6	■		■			
Me CH12	■		■			
Me CH30	■					
Me CH200	■				■	
Be CH6	■		■			
Be CH12			■			
Be CH30	■		■			
Be CH200	■		■			
La DH18	■			■	■	
Th DH19	■					
Ac DH11						
Br DH18	■					
Ar DH19	■					
Tratado	■					
Diluyente						
Controle						



Medicamentos que alteraram a morfologia de macrófagos residentes para ativados e a produção de algumas citocinas.

Medicamentos que diminuíram o número de macrófagos ativados no cultivo.

Medicamentos que mostraram citotoxicidade aos macrófagos não permitindo seu espalhamento no substrato.

#### **6.4 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS *IN VITRO* COM OS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS.**

Outra via de importância para macrófagos é a de produção de óxido nítrico, (KIM et al, 2005). NO é uma molécula gasosa inorgânica produzida quando os macrófagos são estimulados com IFN- $\gamma$  e/ou lipopolissacarídeos (LPS). Em macrófagos ativados, NO é produzido por uma isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), a qual converte L-arginina a L-citrulina com a formação de NO. iNOS é expressa e está continuamente ativa durante a inflamação, estando envolvida na defesa do hospedeiro contra patógenos (CADENAS; CADENAS, 2002; PALUDAN et al, 1999). Devido ao NO ser um radical livre, ele é extremamente reativo e causa danos a proteínas e DNA. Portanto, NO tem potencial antitumoral bem como antimicrobiano, além de ser agente antiviral (PALUDAN et al, 1999).

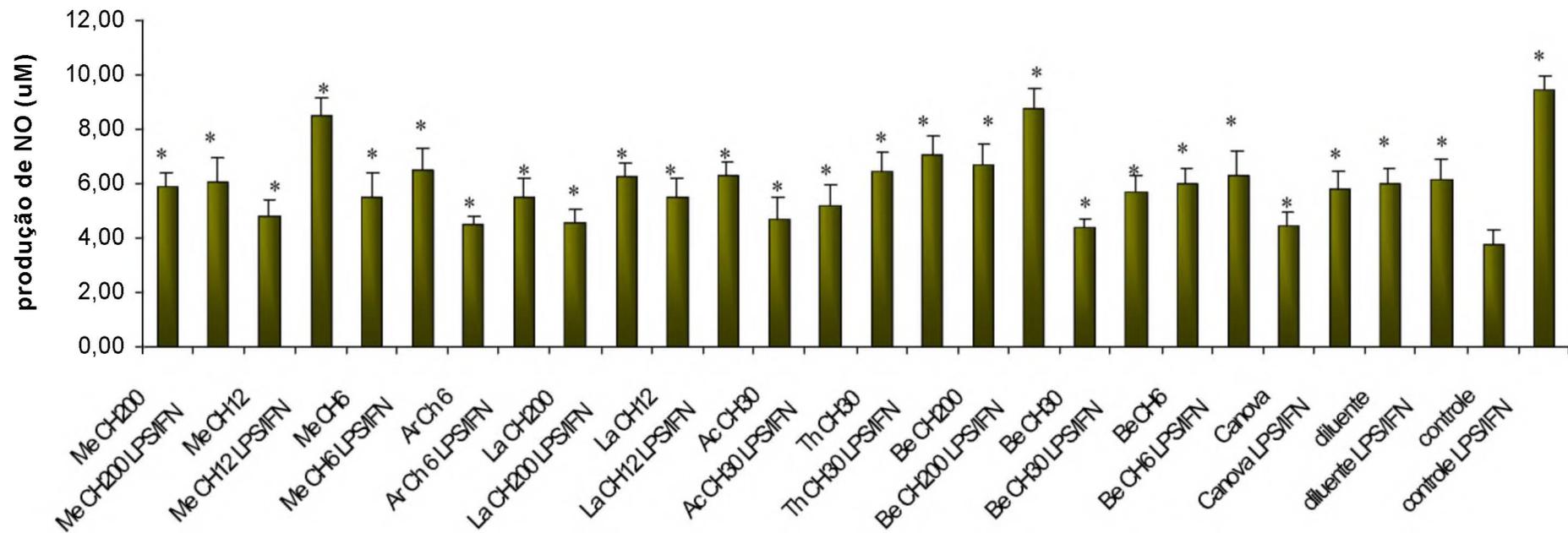
Após a triagem dos medicamentos homeopáticos como descrito no item 7.3, foi feita a mensuração da produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais de camundongo, após o tratamento *in vitro* dessas células com os medicamentos resultantes dessa análise, como protocolo descrito no item 6.5.7.

A produção de nitrito, como indicador de síntese de NO, foi mensurada no sobrenadante da cultura de macrófagos e Lipopolissacarídeo (LPS) e IFN- $\gamma$  foram usados como indutores da produção de óxido nítrico nos grupos controles positivos.

Com essa análise, todos os medicamentos estudados aparecem como estimuladores da produção de óxido nítrico quando são adicionados a cultura de macrófagos, mesmo aqueles que aparecem como estimuladores da produção de IL-4 (gráfico 17).

GRÁFICO 17 - EFEITO DA AÇÃO DOS MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS RESULTANTES DA TRIAGEM SOBRE A PRODUÇÃO DE NO REALIZADA POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO.

## NO



NOTA: Para estatística foram usados ANOVA e teste de Tukey para comparar as médias dos resultados significativos (\*) com a média do grupo controle.

## 7 DISCUSSÃO

O crescimento da popularidade da medicina complementar e alternativa (CAM) no setor público é refletida na comunidade científica, por um aumento no número de artigos científicos tentando avaliar a eficácia dos efeitos terapêuticos (CAULFIELD; DEBOW, 2005). Evidências para efetividade da homeopatia incluem três áreas de pesquisas: 1) comparações gerais de remédios homeopáticos e placebo; 2) estudos da efetividade da homeopatia em condições particulares da clínica; 3) estudos voltados para efeitos biológicos das potências, especialmente ultra-diluições. Dados sobre efeitos biológicos de ultra diluições são investigados, com estudos laboratórios, sob cuidadosas condições controladas. (JONAS; KAPTCHUK; LINDE; 2003). O uso de modelos com plantas ou animais permitem a observação de respostas diretas, as quais eliminam a subjetividade e especulações em relação ao efeito placebo, o qual é a principal crítica em relação aos estudos com humanos (HAMMAN; KONING; LOK, 2003).

A falta de estudos conclusivos que forneçam alguma informação de como a homeopatia atua, levou-nos a testar alguns medicamentos homeopáticos, amplamente utilizados por médicos homeopatas, usando, como modelo biológico, macrófagos peritoneais de camundongos. É conhecido que culturas celulares são particularmente apropriadas como um sistema de seleção inicial em pesquisas farmacêuticas, quando possíveis efeitos modulatórios de novas drogas são estimadas (PENNANEM et al., 1995). Este modelo experimental parece ser particularmente útil em avaliar os efeitos dos tratamentos homeopáticos, devido a grande possibilidade de dados para a análise estatística, sem as desvantagens da triagem clínica.

Estudos que testam produtos naturais como Ginsan (extraído do *Panax ginseng*) (SONG et al., 2002), Herbkinés (composto por oito ervas da medicina oriental) (HONG et al., 2005), diluições ultra elevadas da sílica (DAVENAS; POITEVIN; BENVENISTE, 1987) e o medicamento Canova (PIEMONTE, BUCHI, 2002), todos eles em macrófagos peritoneal de camundongo, demonstraram eficácia em aumentar atividades dessas células.

Neste estudo nós investigamos o efeito dos medicamentos homeopáticos *Aconitum napellus* DH 11, CH 6, CH12, CH30, CH200; *Arsenicum album* DH 19, CH 6, CH12, CH30, CH200; *Bryonia alba* DH 18, CH 6, CH12, CH30, CH200; *Lachesis muta* DH18, CH 6, CH12, CH30, CH200; *Thuja occidentalis* DH 19, CH 6, CH12, CH30, CH200; *Mercurius solubilis* CH 6, CH12, CH30, CH200 e *Belladonna* CH 6, CH12, CH30, CH200 sobre as células mediadoras do sistema imune chamadas macrófagos.

A *Atropa belladonna* (beladona), foi uma das primeiras substâncias estudadas na história da homeopatia. Seu maior ingrediente, a atropina, é ainda muito utilizada por suas propriedades parassimpáticas na medicina moderna (WALACH et al., 2001). A beladona é, ainda, comumente usada em inflamação local (garganta e pele), febre e dores de cabeça (PEDALINO et al., 2004). *Arsenicum album*, na forma de medicamento homeopático, foi observado como redutor da acumulação de arsênico em órgãos vitais (MITRA; KUNDU; KHUDA BUKHSH, 1998). As raízes da *Bryonia alba* e *Bryonia dioica* são bem conhecidas na homeopatia por suas atividades antireumáticas e expectorantes (KRAUZE-BARANOWSKA, KRAUZE-BARANOWS; CISOWSKI, 1995). A *Thuja occidentalis* é também amplamente utilizada na homeopatia e fitoterapia. Seu potencial imunofarmacológico tem sido demonstrado em numerosos modelos, testados *in vivo* e *in vitro*, mostrando atividades imuno estimuladoras e antivirais (NASER et al., 2005).

A ativação de macrófagos representa um dos primeiros eventos na resposta inata. Os mecanismos da imunidade inata e adaptativa são, no entanto, interdependentes (TRINCHERI, 1997). Esta intercomunicação é realizada através dos macrófagos, os quais participam na produção, mobilização, ativação e regulação de todas as células efetoras do sistema imunitário. Eles interagem reciprocamente com outras células, o que ocasiona a mudança de suas propriedades, para funções imunológicas especializadas (GORDON, 1999).

Macrófagos foram o alvo dos nossos experimentos devido ao seu papel central na modulação imune. Nossos estudos demonstraram que alguns medicamentos induziram ativação de macrófagos *in vitro*. Considerando o espalhamento, a ativação foi maior nos grupos tratados com *Aconitum napellus* CH 12,30, *Arsenicum album* CH 6,12 *Belladonna* CH 6,30,200, *Lachesis muta* CH 6,1,200, *Mercurius solubilis* DH 19, CH 6,12,30,200, e *Thuja occidentalis* CH 30,200.

A morfologia celular varia consideravelmente com diferentes estados funcionais do macrófago. A modificação do aspecto morfológico de residente para ativado, é acompanhado pelo aumento de diversas propriedades, como habilidade de se aderir e espalhar no substrato, fagocitose e produção de ROS (como o óxido nítrico) (NORTH, 1978), o que lhes confere habilidades altamente microbicidas e tumorocidas (UNANUE; ALLEN, 1987). Macrófagos podem executar esta função de uma maneira direta, envolvendo a liberação de produtos como radicais de oxigênio e nitrogênio e TNF- $\alpha$  que são prejudiciais aos microrganismos e para células cancerosas. Ou ainda eles podem ter uma ação indireta nestas atividades pela secreção de citocinas, as quais sinalizam outras células como os linfócitos T, ou por processamento e apresentação de antígenos, regulando o sistema imunitário e envolvendo-se no processo infeccioso, na modulação das resposta imunológica e na inflamação. ((HONG et al, 2005; UNANUE; ALLEN, 1987).

Interação de proteínas de membrana com proteínas solúveis como as citocinas, anticorpos, complementos e receptores sobre as células, representam os elementos de comunicação da conversa cruzada das células do sistema imunitário (TRINCHERI,1997). Macrófagos tem um importante papel na secreção de diversas citocinas, e além de agirem como células apresentadoras de antígenos (APC) são capazes de estimular células T durante as fases aferentes e eferentes da resposta (PATTERSONM et al., 2004).

O micro ambiente das citocinas influenciam diferenciação de células T. Em particular, as citocinas presentes durante a expansão de células T influencia a habilidade das células Th em diferenciar-se em células Th1 ou Th2 (TRINCHERI,1997). Esta dicotomia na resposta imune pode ser amplamente categorizada em resposta celular ou humoral. A produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12 leva a resposta celular tipo Th1, enquanto outras como IL-4, IL-5 ou IL-10 leva a resposta humoral do tipo Th2 (DREDGE et al., 2002). Os macrófagos podem influenciar características Th1/Th2 da imunidade e responder a ativação das células T e B através de interação celular e produtos solúveis como IFN- $\gamma$ , IL-4 e anticorpos que regulam atividades fagocíticas e microbiais (GORDON, 1998). IFN- $\gamma$  e IL-4 tem papéis importantes na efetivação das respostas Th1 e Th2 respectivamente, e essas citocinas podem possuir ainda a função de ser antagonista

uma da outra (PALUDAN et al., 1999). O desequilíbrio das respostas imune Th1/Th2 muitas vezes é responsável pelo agravamento de uma doença (GOERDT; ORFANOS, 1999).

Nós distinguimos dois grupos de medicamentos que poderiam desenvolver respostas imunes tipo Th1 ou Th2 dependendo do tipo de estímulo dos macrófagos. Os medicamentos *Thuya occidentalis* CH 6 e CH 30 e, *Lachesis muta* CH 12 e CH 200, *Arsenicum album* CH 6 e CH 200, *Aconitum napellus* CH 6, *Mercurius solubilis* CH 6 e CH 12, *Belladonna* CH 6, CH 12, CH 30 e CH 200 e *Bryonia alba* CH 200, demonstraram desencadear o processo de liberação da citocina IFN- $\gamma$ , logo, possivelmente, desencadeando a resposta imune celular ou Th1. E o grupo de medicamento constituído por *Aconitum napellus* CH 30, *Mercurius solubilis* CH 200 e *Lachesis muta* DH 18 que estimulou a produção da IL-4 nos macrófagos, podendo estimular o sistema imunitário a realizar uma resposta imune do tipo Th2 ou humoral.

O IFN- $\gamma$  é rapidamente estimulado a ser secretado na presença de produtos microbianos ou citocinas como IL-12 e o próprio IFN- $\gamma$ , que vão então estimular macrófagos de uma maneira parácrina ou autócrina, e ativar células T em direção a uma resposta imune (NISHIKAWA et al, 2003). IFN- $\gamma$  induz uma variedade de respostas fisiológicas significantes que contribuem para a imunidade (SAMUEL, 2001). Além do papel em promover respostas Th1, é uma importante citocina na defesa do hospedeiro contra infecções por vírus ou microorganismos patogênicos junto com NO (PALUDAN, 1997).

Nós encontramos que medicamentos que aumentam a liberação de IFN- $\gamma$  produz também um aumento na liberação de NO por macrófagos. De fato, IFN- $\gamma$  estimula a indução da transcrição da óxido nítrico sintase (iNOS) e consequentemente leva a uma indução na produção de NO (PALUDAN, 1999). O qual possui uma importante atividade microbicial e antiviral (BABIOR, 2000). NO também é uma molécula efetora e age como moduladora nos níveis de produção de citocina, influenciando o balanço entre Th1 e Th2 (HOLÁN et al., 2001).

Dessa forma, a interação entre macrófagos e linfócitos e a liberação de citocinas e NO são controles críticos nas reações imunes ((HONG et al, 2005; UNANUE; ALLEN, 1987).

IL-4 é uma citocina pleiotrópica que exerce uma grande variedade de efeitos sobre diferentes células do sistema imunitário. Ela afeta granulócitos, fibroblastos, células endoteliais e timócitos como células B, além de ter um importante papel na hematopoiese, inflamação e no desenvolvimento de respostas células T efectoras (GORDON, 1998). Ela leva a uma resposta imune tipo Th2 (PALUDAN, 1999), aumenta a expressão de antígenos MHC classe II, e receptores IgE sobre células B. Sobre células B ativadas, IL-4 aumenta a expressão de IgG1 e IgE (KAISER, 2004). No entanto, esta citocina também exerce profundo efeito anti-inflamatório sobre monócitos/macrófagos, inibindo a produção de citocinas pro-inflamatória e outros mediadores (CHOMARAT, 1998).

Apesar de IL-4 aumentar a capacidade de fagocitose, macrófagos ativados alternativamente não exercem funções diretas de destruição de micróbios. A produção de NO, por exemplo, é neutralizada em macrófagos alternativamente ativados por aumentar a expressão da arginase, competindo com NO sintase pelo substrato L-arginina (GOERDT; ORFANOS, 1999), e inibindo iNOS à nível transcricional (PALUDAN, 1999). No entanto, alguns dos medicamentos homeopáticos estudados, aumentaram a produção de NO, juntamente com a produção de IL-4. Provavelmente as células estão usando outra via para produzir NO, a qual não usa iNOS. No entanto, outros experimentos devem ser realizados.

Ativação de macrófagos e células T por estresse oxidativo e a secreção de citocinas pró-inflamatórias contribuem significativamente para a progressão da ativação do sistema imunitário e inflamação (TSE et al., 2003). A resposta inflamatória consiste da liberação sequencial de mediadores e do recrutamento de leucócitos circulantes (HANADA, 2002). No controle da imunidade bem como na inflamação não específica, células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas tem um papel principal (GOERDT; ORFANOS, 1999). No curso da reação inflamatória, mecanismos pró-inflamatórios são mais importantes para garantir a eliminação da causa infectiva, tóxica ou alérgica. Sendo muito importante para a homeostase e integridade do tecido. No entanto, é obrigatório que o processo inflamatório, uma vez induzido, não aumente progressivamente, mas sim, seja regulado e diminuído para permitir a cura. A ação descontrolada de enzimas proteolíticas e o processamento de mediadores químicos e radicais livres podem agravar a situação em alguns casos. Há muito tempo que pesquisas sobre a biologia

da inflamação tem sido focada sobre ações pró-inflamatórias de fagócitos mononucleares, incluindo processamento e apresentação de antígeno e secreção de citocinas (GOERDT; ORFANOS, 1999; PEDALINO, 2004).

O descontrole no balanço Th1/Th2 possui um importante papel no controle de doenças. Doenças inflamatórias e alergias não devem somente ser uma opressão da reação proinflamatória, mas podem também ser causadas por disfunção ou falha nos mecanismos de controles da reação anti-inflamatória. Regulação e expressão de genes e moléculas associadas a inflamação é regulada antagonisticamente por IL-4 e IFN- $\gamma$ , por exemplo, moléculas produzidas por macrófagos alternativamente ativados são induzidas por IL-4 e inibidas por IFN- $\gamma$ , enquanto moléculas produzidas por macrófagos classicamente ativados são induzidas por IFN- $\gamma$  e inibidas IL-4 (GOERDT; ORFANOS, 1999). Por exemplo, diversas condições alérgicas têm sido claramente ligadas a interleucinas 4, 5 e 13 enquanto doenças autoimunes estão associadas com a produção de citocinas como IFN- $\gamma$  (HOLLOWAY, 2001). Por exemplo, dermatite atópica (AD) é uma inflamação crônica da pele, onde pacientes com esta doença, apresentam, freqüentemente, elevados níveis sorológicos de imunoglobulina E (IgE). Produção de IgE é fortemente influenciada por citocinas como IL-4, IL-13. Por outro lado, IFN- $\gamma$  inibe produção de IgE induzida por IL-4 (KAMINISHI et al, 2002). Outra doença inflamatória onde é encontrada alta concentração de IL-4 é a asma. A patofisiologia desta doença é uma anormal ou inadequada regulação da resposta imune T CD4+, produzindo uma série de citocinas, incluindo IL-4, a qual estimula crescimento, diferenciação e recrutamento de células envolvidas na resposta alérgica (DRAZEN; AR; AUSTEN, 1996).

IL-4 é forte inibidor da expressão do CD 40 induzido por INF- $\gamma$ . O CD 40 é uma fosfoproteína membro da família dos receptores de TNF- $\alpha$ , a qual é expressa por células de linhagem monocítica como macrófagos, entre outras. A ligação do CD 40 ao seu ligante (CD 154) ativa numerosos vias levando a mudanças na expressão e função de muitos genes envolvidos em respostas neuroinflamatórias por promover produção de numerosas citocinas, quimiocinas, e neurotoxinas. A expressão aberrante de CD 40 por macrófagos e micróglia induzido por INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , está diretamente correlacionada com eventos patogénéticos no sistema nervoso central como esclerose múltipla, demencia associada a HIV-1. Assim, estratégias que

atenuam respostas inflamatórias dentro do sistema nervoso central por inibir a ativação de macrófagos e microglia (por supressão da expressão de CD 40) devem ser benéficos pra um grande número de doenças neuroinflamatórias (BENVENISTE; NGUYEN; WESEMANN, 2004).

O controle do parasita *Trypanosoma cruzi* durante as primeiras semanas de infecção é considerado ser criticamente dependente de citocinas as quais tem mostrado ser mediadoras da ativação *in vitro* de macrófagos para a morte celular do parasita. E os seus mecanismos regulatórios devem ser importantes no controle de patologias como na infecção por *T.cruzi* onde há intensa ativação de respostas tipo Th1 (ABRAHAMSOHN, 1996). Então estes dois mecanismos, (respostas do tipo Th1 e Th2) não são mutuamente exclusivos mas devem fornecer um exemplo da regulação de funções biológicas mostrando redundância por usar mais que um mecanismo, dependendo da circunstância.

O desenvolvimento de terapias capazes de modular o processo de inflamação, sem suprimir o efeito desejável dos seus aspectos fisiológicos, poderia ser uma interessante alternativa para se obter melhor eficácia da resposta tecidual contra agressores externos. Hoje em dia, medicamentos homeopáticos são constantemente usados no tratamento de processos inflamatórios. As defesas próprias do organismo e inerentes à cura são induzidas por medicamentos homeopáticos, visando mobilizar a reação natural do corpo debilitado (PEDALINO, 2004).

Uma grande contribuição de trabalhos experimentais com medicamentos homeopáticos é requerido ainda para estabelecer a complexa contribuição da estimulação da produção de citocinas, em doenças.

O papel dos receptores de reconhecimento inato dos APCs em direcionar as respostas imunes adquiridas Th1/Th2 precisam ser investigados, e a relação entre as interleucinas e a modulação fenotípica dos macrófagos deve ser esclarecidas, com referência especial contrastando as ações de aumento e supressão dos sistema imunitário. A definição de moléculas envolvidas na ativação de macrófagos durante a modulação através dos medicamentos homeopáticos pode nos fornecer uma definição mais clara de alvos terapêuticos.

O entendimento do mecanismo de transcrição do gene das citocinas é de interesse fundamental para estratégias futuras no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças relacionadas como imune.

Todos os nossos dados indicam que mesmo o medicamento mais diluído (CH 200) demonstrou uma resposta biológica, como pode-se observar seus efeitos sobre o metabolismo dos macrófagos. Diferentes resultados foram obtidos quando diferentes potências do medicamento inicial foram usadas, indicando que diferentes potências resultam em diferentes medicamentos. Esta diferença também foi constatada com o medicamento Canova quando comparado aos seus componentes testados isolados. O medicamento Canova mostrou resultados diferentes de todos os outros medicamentos, indicando que esta combinação de tinturas e diluições resultam em um outro medicamento com que age sobre os macrófagos em outra via.

Na análise inicial, os medicamentos *Thuya occidentalis* CH 12, *Bryonia alba* CH 12, 30 e 200, *Aconitum napellus* DH 11, CH 6 e 200, *Lachesis muta* CH 30, *Arsenicum album* CH 30 e 200, *Belladonna* CH 12 já não mostraram alterar significativamente a morfologia dos macrófagos quando tratados *in vitro* por estes medicamentos, no entanto, isto não significa que estes medicamentos não atuem no organismo. A ação destes medicamentos pode ocorrer através de outras células.

Os medicamentos *Thuya occidentalis* DH 19 e CH 200, *Aconitum napellus* CH 12, *Lachesis muta* CH 6, *Arsenicum album* CH 12, *Mercurius solubilis* CH 30 demonstraram ativar morfologicamente os macrófagos tratados *in vitro*, no entanto nós não seguimos com seu estudo por não apresentarem estímulo na produção das citocinas estudadas. Não excluindo, porém, a sua atuação sobre essas células. Provavelmente esses medicamentos usam outras vias de ativação as quais não foram testadas neste estudo.

O medicamento *Lachesis muta* CH 30 estimulou a liberação de IL-2 nos macrófagos, no entanto, não apresentou efeito sobre a ativação morfológica. Provavelmente, este medicamento ativou apenas a liberação dessa citocina, geralmente presente em vesículas nos macrófagos, mesmo em estado de residentes.

Os medicamentos *Thuya occidentalis* e *Bryonia alba* na potência CH 6 demonstraram diminuir o número de macrófagos ativados em relação ao controle. E a *Bryonia alba* DH 18 e a *Lachesis muta* DH 18 apresentaram uma toxicidade

elevada por não permitir a adesão e o espalhamento dos macrófagos. Apesar de apresentar toxicidade quando adicionado ao cultivo de macrófagos, o medicamento *Lachesis muta* DH 18 mostrou aumentar a produção de IL-4 e IL-5 pelos macrófagos.

O *Mercurius*, em especial, se mostrou um produto interessante, atuando cada potência como um medicamento diferente. Nas potências CH6 e CH12, induziu a liberação de IFN, na potência CH200, de IL4, portanto aparentemente antagônica, e em CH30, apesar da morfologia ativada, não detectamos nenhuma das citocinas medidas (apenas quantificamos 5 entre as dezenas conhecidas atualmente). Também é importante lembrar que os experimentos foram realizados com 3 repetições em triplicata e que o ANOVA só permite análise quando os resultados dessas repetições são harmônicos. A análise estatística cuidadosa e rigorosa nos dão segurança e credibilidade nos resultados obtidos.

As respostas obtidas com tratamento *in vitro* e *in vivo*, não são necessariamente as mesmas e estamos seguros de que muito mais estudos serão necessários para se afirmar sobre os efeitos desses medicamentos em organismos doentes. Mas também estamos seguros de que medicamentos altamente diluídos, atuando em células isoladas num cultivo celular, não estão mostrando um efeito placebo, uma vez que controles cuidadosos foram feitos durante todos os experimentos. A ativação de macrófagos *in vitro*, mostrando uma resposta Th1 ou Th2 nesses experimentos, é de alta relevância, instigando ainda mais novas pesquisas controladas com homeopatia.

## 8 CONCLUSÃO

- ✓ Estudos *in vitro* com macrófagos são um bom modelo biológico para estudar homeopatia.
- ✓ Diversos medicamentos homeopático possuem ação sobre macrófagos.
- ✓ Possível via de ação desses medicamentos no organismo seria através de respostas Th1 e Th2
- ✓ Potências diferentes de uma mesma substâncias são medicamentos diferentes
- ✓ O medicamento Canova possui ação diferente de todos os outros medicamentos que o compõe, quando analisados isoladamente.

## 9 Referências bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 3<sup>a</sup> ed., Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2000.

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity infection. **Experimental Parasitology**; v. 84, p. 231-244, 1996.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**, 3<sup>a</sup>ed., Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. **Homeopatia - 25 anos como especialidade médica no Brasil**. Disponível em <http://www.amhb.org.br/nuke/modules.php?name=News&file=article&sid=252>  
Acesso em 5 de setembro de 2005.

AUGER, M. J. e ROSS, J. A. The biology of the macrophages. In: **The natural immune system: the macrophage**. Rds. C. E. Lewis e J.D. Mc Gee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p. 1-57, 1992.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**,v. 109, p. 33-44, 2000

BAROLLO, C. R. **Aos que se tratam pela Homeopatia**. 7<sup>o</sup>ed., São Paulo, Typus ed., 1995.

BENVENISTE, E. N; NGUYEN, V.T.; WESEMANN, D.R. Molecular regulation of CD 40 gene expression in macrophages and microglia. **Brain, Behavior and Immunity**. V. 18, p.7-12, 2004.

BRONFMAN, J. J.; **Diálogos com um homeopata**, 2<sup>a</sup>edição, Buenos Aires, Argentina, Ediciones Siglo Veinte.

BROWN, G. C.; FOXWELL, N.; MONCADA, S. Transcellular regulation of cell respiration by nitric oxide generated by activated macrophages.**FEBS Letters**, v. 439, p. 321-324, 1998.

BROWNING, M.; McMICHAEL, A. **HLA and MHC genes, molecules and function**. BIOS Scientific Publishers Limited; 1<sup>a</sup> ed, Oxford, 438pg; 1996.

BUCHI, D.F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.24, n.1, p.135-141,1992.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Flighiting the stranger-antioxidante protection against endotoxin toxicity, **Toxicology**, p. 45-63, 2002.

CANOVA DO BRASIL, **Método Canova**, Ano 01, 06, 2001.

CARTER, L.L.; DUTTON, R.W. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 336-342, 1996.

CAULFIELD, T., DEBOW, S. A systematic review of how homeopathy is represented in conventional and CAM peer reviewed journals. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 5:12, 2005,

CHOI, E.; HWANG, J. Enhancement of oxidative response and cytokine production by yam mucopolysaccharide in murine peritoneal macrophage. **Fitoterapia**, n. 73, p. 629-637, 2002.

COSTA, R.; **Nosódios Vivos**. Rio de Janeiro, editora Farmácia Homeopática ÁTOMO Ltda, 2002.

CHOMARAT, P., BANCHEREAU, J. Intreleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. **International Reviews of Immunology**,v. 17, p. 1-52, 1998

DAVENAS, E.; POITEVIN, B.; BENVENISTE, J. Effect on mouse peritoneal macrophages of orally administrated very high dilutions of silica. **European Journal of Pharmacology**,v.135, p.313-319, 1987.

DEL VECCHIO, M.; BUCHI, D.F.; **Laboratório Canova do Brasil**. Disponível em < <http://www.canovado brasil.com.br/oque.htm>> Acesso em: 16 jul. 2004.

DRAZEN, J.M.; ARM, J.P.; AUSTEN, K.F. Sorting Out the Cytokines of Asthma. **Journal of Experimental Medicine**,v. 183:, p.1-5, 1996.

DREDGE, K.; MARRIOTT, J.B.; TODRYK, S.M.; DALGLEISH, A.G. Adjuvants and the promotion of TH1-type cytokines in tumor immunotherapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.51, p.521-531, 2002.

FORMAN, J. H.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p.189-216, 2001.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Color Textbook of Histology**, Philadelphia, p. 58-69, 1997.

GESSANI, S.; BELARDELLI, F. Expression in Macrophages and its Possible Biological Significance. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 2, p. 117-123, 1998.

GODOY, L. **Efeitos do medicamento Método Canova<sup>®</sup> sobre a funcionalidade de macrófagos.** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

GOERDT, S.; ORFANOS, C.E. Other Functions, Other Genes: Alternative Activation of Antigen-Presenting Cells. **Immunity**, v.10, p.137-142, 1999.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunology**, v. 149, p.685-688, 1998

GORDON, S. Macrophages and the immune response. **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 533-545, 1999.

GORDON, S.; PERRY, V.H.; RABINOWITZ, S.; CHUNG, L-P; ROSEN, H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **Journal Cell Science**, suppl. 9, p. 1-26, 1988.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A;GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK,J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15Nnitrates] in biological fluids. *Anal. Biochem.* , v.126, p. 131-138,1982.

HAMMAN, B.; KONING, G.; LOK, K.H. Homeopathically prepared gibberellic acid and barley seed germination, **Homeopathy**, v.92, p. 140-144, 2003.

HAN, Y.; KWON, Y.; CHUNG, H.; LEE, S.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T. R.; KIM, Y. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophage. **Nitric oxide: biology and Chemistry**. v.5, p. 504-513, 2001.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 13, p. 413-421, 2002.

HAYFIELD, R. **Vida nova: homeopatia. Remédios simples para uma saúde natural.** Lisboa: editora estampa Ltda, 1999.

HOLÁN, V.; KRULOVÁ, M.; ZAJÍCOVÁ, A.; PINDJÁKOVÁ, J. Nitric oxide as a regulator and effector molecule in the immune system. **Molecular Immunology**, v.38, p.989-995, 2001.

HOLLOWAY, A. F.; SHANNON, M.F. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. **Molecular Immunology**. v. 38, p.567-580, 2001.

HONG, S.; JEONG, H.; CHUNG, H.; KIM, H; CHAE, H.; SHIN, T.; SEO, Y., KIM, H. An herbal formula, Herbkinex, enhances cytokines production from immune cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 149-155, 2005.

HUNT, A. E.; WILLIAMS, L. M.; LALI, F. V.; FOXWELL, B.M. J. IL-4 regulation of p38 MAPK signalling is dependent on cell type. **Cytokine** v. 18, n.6, p. 295-303, 2002.

JANEWAY, C. A. Jr; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**, 5ª ed., artmed editora, Porto Alegre, 2002.

JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da homeopatia**, Rio de Janeiro, editora Campus, 1996.

JONAS, W., KAPTCHUK, T.J., LINDE, K A critical overview of homeopathy. **Annals of Internal Medicine**, v.138, p. 393-399, 2003.

KAMINISHI, K.; SOMA, Y.; KAWA, Y.; MIZOGUCHI, M. Flow cytometric analysis of IL-4, IL-13 and IFN- $\gamma$  expression in peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL-13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease. **Journal of Dermatological Science**, v.29, p. 19-25, 2002.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; AVERY, S.; BALU, S. Evolution of the interleukins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, p.375-394, 2004.

KIM, J. Y.; OH, K.N.; HAN, E. H.; KIM, D. H.; JEONG, T. C.; LEE, E. S.; JEONG, H. G. Methoxychlor-induced nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression in macrophages via NF- $\kappa$ B, ERK, and p38 mitogen-activated protein-kinases. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 333, p. 1234-1240, 2005.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G. E; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEM, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer, **Critical Reviews in Oncology/hematology**, v. 44, p. 183-161, 2002.

KRAUZE-BARANOWS, K.A. M.; CISOWSKI, W. Flavone c-glycosides from *Bryonia alba* and *B. dioica*. **Phytochemistry**, v.39 (3), p. 727-729, 1995.

LOPES, L.; GODOY, L.; OLIVEIRA, C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.; BUCHI, D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, in press, 2005 .

MARKS, CASSANDRA. **Homeopatia: guia prático**. São Paulo: Callis Editora Ltda, 1997.

MITRA, K.; KUNDU, S.N.; KHUDA BUKHSH, A.R.; Efficacy of a potentized homeopathic drug (Arsenicum Album-30) in reducing toxic effects produced by arsenic trioxide in mice: I. On rate of accumulation of arsenic in certain vital organs. **Complementary Therapies in Medicine**, v.6, p. 178-184,1998.

NASER, B.; BODINET, C.; TEGTMEIR, M.; LINDEQUIST, U. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **ECAM**, v.2(1), p. 69-78, 2005.

NELSON, D.J.; JOW, F. Whole-cell currents in macrophage: Human monocytes-derived macrophages. **J. Membr. Biol.**, v. 117, p. 29-44, 1990.

NEVEU, P.J. The mononuclear phagocyte system. **Bull. Inst. Pasteur**, v. 84, p. 24-66, 1986.

NISHIKAWA, Y.; INOUE, N.; MAKALA, L.; NAGASAWA, H. A role for balance of interferon-gama and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. **Veterinary parasitology**, v.116, p. 175-184, 2003.

NOGUEIRA, G. W. G.; RIMOLI, M.A.; TURCI, M. B.; GUILHERME, S.D.; MOLLO, S. A.; BARNABÉ, V.D. **Doutrina Médica Homeopática**, São Paulo, Grupo de Estudos Homeopáticos de São Paulo "Benoit Mure", 1986.

NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. **The journal of immunology**, v. 121, n.3, 1978.

OLIVEIRA, F. J. D. M. **Avaliação da eficácia e efetividade do método terapêutico homeopático no contexto da prática clínica em serviços públicos de saúde**. The Royal London Homoeopathic Hospital NHS Trust, 1995-1996. Relatório técnico.

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of infection**, *in press*, 2005.

PALUDAN, S.R.; ELLERMANN-ERIKSEN, S.; LOVMAND, J.; MOGENSEN, S.C. Interleukin-4-mediated inhibition of nitric oxide production in interferon- $\gamma$ -treated and virus-infected macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 49, p. 169-176, 1999.

PATTERSON, R.; VEJA, L.; TROUB, K.; BORTNER, C.; GERMOLEC, D.; Arsenic-induced alterations in the contact hypersensitivity response in Balb/c mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.198, p.434-443, 2004.

PARHAM, P. **O sistema imune**, Artmed Editora, 2001.

PARKIN, J.; COHEN, B.; Overview of the immune system, **The Lancet**, v. 357, 2001.

PEAKMAN, M; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**, editora Guanabara Koogan, 1999.

PEDALINO, C.M.V.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T.; MARTINHO, K.S.; MASSOCO, C.; BONAMIM, L.V. Effect of *Atropa belladonna* and *Echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, v.93, p. 193-198, 2004.

PENNANEN, N.; LAPINJOKI, S.; PALANDER, A.; URTTI, A.; MONKKONEN, J. Macrophage-like raw 264 dell line and time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) as tools in screening drug effects on cytokine secretion, **International Journal Immunopharmacology**, v. 17, n. 6, p. 475-480, 1995.

PEREIRA W.K.V.; LONARDONIB, M.V.C.; GRESPANA R.; CAPARROZ-ASSEFA S.M.; CUMANA, R.K.N.; BERSANI-AMADOA C. A. J. Immunomodulatory effect of *Canova* medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infection**, v. 51, p. 157–164, 2005.

PIEMONTE, M. R. **Alterações Estruturais em Macrófagos Peritoneais de Camundongos Tratados com o Método Canova®**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Morfologia), Universidade Federal do Paraná.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production,  $\alpha_5\beta_1$  integrins and actin filaments distribution in intraperitoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 3, 2002.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.

PLAYFAIR, J. **Infection and Immunity**. Oxford University Press Inc., New York, 1995.

RUIZ, R. **A montagem da teoria da dinamização dos medicamentos homeopáticos de Samuel Hanemann**, São Paulo, 1999. Tese de doutorado – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5<sup>a</sup>ed., Editora Manole Ltda., São Paulo, 1999.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of interferons. **Clinical Microbiology Review**, v.14,p. 778-809, 2001.

SASAKI, M. G. M. et al. Estudo clínico randomizado placebo controlado para avaliar a eficácia e segurança do Método Canova na terapêutica de pacientes portadores de HIV/AIDS em uso de anti-retrovirais. **Braz J. Infectious Diseases**, 5, supplement 1, 58, 2001.

SATO, D. Y. O. **O efeito do Método Canova sobre os parâmetros leucocitários em camundongos normais e portadores de sarcoma 180**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

SATO, D.Y.O.; WAL, R.; OLIVEIRA, C.C.; CATTANEO, R.I.I., MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a brazilian homeopathic medication, **Homeopathy**, v.94, p. 26–32, 2005.

SHEALY, NORMAN. **Enciclopédia ilustrada de remédios naturais**. Barcelona: editora Konemann, 1999.

SEADI, C. **Princípios Básicos de Imunologia**, 1<sup>a</sup>ed., Editora da Ulbra, Canoas, 1998.

SELIGMANN, I.C.; LIMA, P.D.L.; CARDOSO, P.C.S.; BURBANO, R.; BUCHI, D.F. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 223-228, 2003.

STITES, D.P.; TERR, A.I. **Imunologia**, Editora Prentice/Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1992.

STITES, D.; TERR, A.; PARLOW, T.G. **Imunologia médica**. Guanabara Koogan, 9<sup>a</sup> edição, Rio de Janeiro, 689pg; 2000.

SONG, J.Y.; HAN, S.K.; SON, E.H.; PYO, S.N.; YUN, Y.S; YI, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 857-865, 2002.

TOLEDO, J. A. **Estudiate a ti mismo**. Buenos Aires, Argentina, editora Casa Jacobo Peuser, 1910.

TRINCHERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p.17-23, 1997.

TSE, H. M.; MILTON, M. J.; PIGANELLI, J. D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells:

implication for their use in targeting oxidation-reduction reactions in innate immunity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 233-247, 2004.

ULLMAN, D. **A Homeopatia – Medicina para o Século XXI**. São Paulo, Ed. Cultrix, 1995.

UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M.; The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, vol. 236, p. 551-557, 1987.

VAN DER VEEN, R.C.; DIETLIN, T.A.; GRAY, J.D.; GILMORE, W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. **Cellular Immunology**, v.1999, p.43-49, 2000.

VENKATA-REDDY, M.; GANGADHARAM, P.R.J. Heat shock treatment of macrophages causes increased released superoxide anion. **Infect. Immunol.**, v. 60, p. 2386-2390, 1992.

VIKSVEEN, P., Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative? **Homeopathy**, p. 99-107, 2003.

WAL, R. **Estudo Histopatológico do Sarcoma 180 de Camundongos Tratados com Medicamento Homeopático Método Canova<sup>®</sup>** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

WALACH, H.; KÖSTER, H.; HENNIG, T.; HAAG, G.; The effects of homeopathic belladonna 30 CH in healthy volunteers – a randomized, double-blind experiment. **Journal of Psychosomatic Research**, v.50, p.155-160, 2001.

WOOD, K.J., AUSTYN, J.M. **Principles of celular and molecular immunology**. Oxford University press Inc, New York, 1993.