

SIMONE MARTINS DE OLIVEIRA

**ESTUDO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUTURAL DA AÇÃO DO MÉTODO CANOVA  
EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

Monografia de conclusão de curso apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, apresentada ao Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi

**CURITIBA, 2004**

SIMONE MARTINS DE OLIVEIRA

**ESTUDO CITOQUÍMICO ULTRAESTRUTURAL DA AÇÃO DO MÉTODO CANOVA  
EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

Monografia de conclusão de curso apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, apresentada ao Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi

**CURITIBA, 2004**

À minha família linda que nunca  
me deixa desanimar e a qual  
amo incondicionalmente.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, neste momento, principalmente por ter me oferecido o caminho da ciência, me fazendo valorizar cada vez mais, a cada passo, toda a vida. E por sempre colocar no meu caminho, pessoas que, de uma forma ou de outra me ajudaram a crescer, a acreditar no meu potencial e a conquistar esta etapa tão importante na minha vida.

À minha família maravilhosa, meu paizinho pelo seu amor tão grande e pelos seus esforços tão imensos, minha mãezinha linda que sempre tem aquela palavra certa, aquele afago gostoso, que me faz sentir capaz de mover o mundo. Ao meu irmãozinho Sandro e ao meu irmão Sidney os quais sempre me fizeram acreditar que eu sou capaz.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Dorly de Freitas Buchi por me iniciar no meio da pesquisa.

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

A minha amiga e conselheira do laboratório e de todos os momentos Carolina C. de Oliveira que sempre ouviu minhas histórias.

A Lyris Godoy por ter me ensinado os primeiros passos do cultivo celular.

A todos do lab que sempre me ajudaram no trabalho diário quanto me fizeram rir nos momentos de desespero, quanto me agüentaram nos momentos de alegria: Ana Paula R. Abud, Luis F. Cavazzani, Luciana Lopes, Mônica D. Ferrucio, Elenice Stroparo, Samuel, Raffaello P. Di Bernardi, Fabiano R. Palauro, Luis Eduardo D. Barbosa, Adriana Sayuri Kurogi, Lucas Gennaro, Plínio C. Casarotto.

Aos meus amigos que fizeram com que estes anos durante a faculdade fossem muito mais prazerosos, pelo companheirismo nas aulas e por me ajudarem a suportar a dor distância. Em especial á minha primeira amiga de sala de aula Mariza Bortolanza, Márcia R. Pincerati, Naiana de P. Arruda e a companheira notável de correrias pra formatura Aline S. Fonseca.

A todos os meus amigos de infância e adolescência que, depois da minha família, foram as pessoas que mais acreditaram na minha capacidade de chegar até aqui e sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica desta universidade, pelo uso de seus equipamentos.

Aos funcionários do biotério, Cândido, Luís, Ezequiel e demais funcionários.

Ao Canova do Brasil Ltda.

Ao PIBIC/CNPq

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 O TRATAMENTO HOMEOPÁTICO.....	1
1.2 O MEDICAMENTO CANOVA.....	3
1.3 SISTEMA IMUNE.....	4
1.4 MACRÓFAGOS.....	6
1.5 CITOCROMO OXIDASE.....	10
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>12</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	13
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	13
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 ANIMAIS.....	14
4.2 EXPERIMENTO IN VIVO.....	14
4.3 EXPERIMENTO IN VITRO.....	14
4.4 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONIAIS.....	14
4.5 MARCAÇÃO ULTRAESTRUTURAL CITOQUÍMICA DA ENZIMA.....	15
4.6 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	15
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>

## Resumo

O Medicamento Canova (MC) é uma especialidade farmacêutica produzida através de técnicas homeopáticas, possuindo função imunomoduladora. Os macrófagos, integrantes do sistema imune, quando ativados, possuem capacidade fagocítica, de reconhecer e lisar células alteradas. Com o objetivo de continuar verificando alterações na ativação dos macrófagos tratados com Medicamento Canova, foram realizados experimentos onde: 1) visou-se detectar possíveis alterações na atividade de enzimas presentes nos macrófagos, como a citocromo oxidase (COX). Nos grupos tratados foi adicionado ao meio de cultura 10% de MC e após 24 horas mais 1% de MC. Seguiu-se o protocolo rotineiro para a COX. Nesta etapa foi separado mais grupo controle para a enzima. Após a incubação, as células foram processadas e observadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. As eletromicrografias foram geradas pelo processador de imagens GATAN. A detecção dos produtos reativos indicativo da atividade da citocromo oxidase foram observados nos experimentos tanto in vivo quanto in vitro. Os produtos reativos encontrados no grupo controle foram evidentes e bem distribuídos em vesículas e membranas internas. Reações positivas não foram encontradas no grupo tratado, ou apenas marcações fracas. Nenhum produto da reação foi encontrado no grupo controle da enzima. É sabido que a "down-regulation" da COX pode ser uma consequência dos efeitos causados pelo NO e ONOO<sup>-</sup>, podendo levar a uma estimulação da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS são conhecidos como importantes componentes do sistema defensivo antimicrobial dos macrófagos.

## **1 Introdução**

### **1.1 O tratamento homeopático**

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 imunológico, 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 imunológico, onde a ação desse determina de maneira decisiva o prognóstico do paciente e uma resposta imune 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 ?

A homeopatia é um método de tratamento que busca intensificar os mecanismos de cura do próprio organismo e de que maneira geral, não apresenta toxicidade.

É um sistema de tratamento que usa substâncias especialmente preparadas e altamente diluídas para colocar em ação os mecanismos de cura do próprio, de forma abrangente. Utiliza 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. Esse processo de preparação compreende a diluição em etapas com agitação entre estas. Os preparados homeopáticos são testados em indivíduos saudáveis para determinar seus efeitos.

Esses efeitos são então usados como sintomas-guias para a administração do remédio apropriado ao doente (JONAS; JACOBS, 1996).

Esse sistema terapêutico foi criado no século XVIII pelo médico alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843), fundamentado no princípio da similitude "*similia similibus curantur*", no qual semelhantes são curados pelos semelhantes (BAROLLO, 1995).

Hahnemann desenvolveu esta abordagem no decorrer de um período de 50 anos. Era um pensador progressista, um crítico mordaz da medicina da época. Abandonou a prática da medicina várias vezes antes da descoberta da homeopatia, especificamente porque não considerava ético o uso de doses múltiplas e muitas vezes tóxicas dos medicamentos, na época o método normal de tratamento (JONAS; JACOBS, 1996).

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).

Homeopatas tão antigos quanto Hahnemann acreditavam que substâncias altamente diluídas devem agir no nível sub ou não molecular e que as informações da substância original dever ser armazenadas de alguma forma na mistura diluída de água e álcool. Também se acreditava que a agitação em série, ou dinamização, contribuía de alguma forma para esse processo (BERNAL, 1993).

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 imunológico 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 imune, 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).

## 1.2 O Medicamento Canova

O Medicamento Canova (MC) é uma especialidade farmacêutica desenvolvido a partir de derivados *do Aconitum, Bryonia, Thuya, Lachesis e Arsenicum*, diluídos em água destilada e álcool (0,01%) (CANOVA DO BRASIL, 2001). É um produto preparado através de técnicas homeopáticas. Relatos clínicos e estudos realizados em nosso laboratório indicam que o medicamento possui função imunomoduladora. Por esse motivo, o MC é indicado em patologias onde o sistema imunológico 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.

O Medicamento Canova é originário da Argentina, sendo atualmente, manipulado pela farmácia A Homeoterápica em Curitiba, PR.

Buchi em 1997 iniciou os estudos laboratoriais com o medicamento Canova. 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.

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. Outros estudos em animais mostraram que este medicamento é eficaz no controle de infecções virais, bacterianas, parasitas e inclusive no controle de tumores experimentais em camundongos. No entanto, estudos *in vitro* 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 e atuando através de um mecanismo imunomodulador (GODOY, 2002 ; WAL, 2002; SATO,2002).

### **1.3 Sistema imune**

O sistema imune é o maior alvo para o desenvolvimento de estratégias de tratamento, em particular para melhorar a manutenção de infecções, tumores e doenças autoimunes, resistentes a terapias convencionais (PARKIN & COHEN, 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 freqüentemente, nos proteger de infecções e de células cancerosas (AUSTYN; WOOD, 1993; GUYTON; HALL, 2002).

Qualquer vertebrado que venha a nascer com algum defeito severo no sistema imune terá morte precoce, a menos que medidas extraordinárias sejam tomadas para isolá-lo de agentes infecciosos - bacteriano, viral, micótico e parasitário. Os invertebrados possuem um sistema de defesa menos especializados, baseado principalmente em células fagocitárias. Estas células (principalmente macrófagos e neutrófilos) também exercem papel importante na defesa dos vertebrados contra a infecção, mas são apenas parte de uma estratégia de defesa mais complexa e sofisticada (ALBERTS et al., 1997).

O sistema imune é composto de numerosos tipos de células e uma variedade de moléculas as quais estão espalhadas através do nosso corpo (SEADI, 1998). As células que constituem o sistema imunológico se originam na medula óssea, onde muitas também amadurecem. A partir da medula, elas migram em função do patrulhamento dos tecidos, circulando no sangue e em um sistema especializado de vasos, chamado sistema linfático. As células tronco hematopoiéticas da medula dão origem a todos os elementos do sangue, inclusive as células vermelhas que transportam oxigênio, as plaquetas que deflagram a coagulação sanguínea e as células brancas do sistema

imunológico. No início, essas células tronco originam células precursoras ou progenitoras. Um grupo dessas células progenitoras chamado progenitor mielóide é o precursor dos granulócitos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos do sistema imune. O progenitor mielóide dá origem aos linfóides (JANEWAY et al., 2002).

A resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é denominada resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Há vários tipos de resposta imune. De uma maneira mais ampla, os diferentes tipos de respostas imune enquadram-se em duas categorias: respostas inatas ou nativa (imunidade natural) e respostas imunes específicas ou adaptativa (imunidade adquirida) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999). Estas respostas são um conjunto integrado de estruturas, células e elementos do sangue que permitem ao organismo reconhecer e responder a agentes potencialmente agressores do meio ambiente (antígenos) (SEADI, 1998).

A imunidade natural é aquela presente ao nascer (PEAKMAN & VERGANI, 1997). 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. Suas características são aquelas que ele apresenta por toda vida, não tendo especificidade nem memória. Protege principalmente contra bactérias, fungos e vermes. Seus componentes são barreiras mecânicas, produtos secretados, além de incluir um grupo de leucócitos chamado fagócitos, e outro grupo chamado de 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 imunidade adquirida não está presente ao nascer, mas é adquirida como parte do desenvolvimento (PEAKMAN; VERGANI, 1997). É um componente de um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual numerosas células e moléculas funcionam de maneira cooperativa. O sistema imune específico retém muito de seus mecanismos de imunidade natural necessários para eliminar invasores estranhos, com o acréscimo de duas propriedades importantes: a especificidade e a memória. A resposta imune específica amplifica os mecanismos de imunidade natural e potencializa sua função,

particularmente com exposições repetidas ao mesmo antígeno estranho (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Há duas grandes classes de resposta imune adquirida: (1) resposta imune mediada por anticorpos ou humoral e (2) resposta imune mediada por células (ALBERTS et al., 1997).

As células do sistema imune normalmente estão presentes como células circulantes no sangue e na linfa, com coleções anatomicamente definidas nos órgãos linfóides e como células dispersas em todos os tecidos, exceto o sistema nervoso central. A organização dessas células e sua capacidade de circular e de ser transportada entre o sangue, a linfa e os tecidos são de importância crítica para a geração de respostas imunes (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Os principais constituintes celulares do sistema imune são os linfócitos, os fagócitos mononucleares e as células acessórias relacionadas. Os linfócitos são as únicas células imunocompetentes capazes do reconhecimento específico de antígenos. Os fagócitos mononucleares são críticos para a defesa do hospedeiro na ausência de imunidade específica mas também participam de diferentes fases das imunidades específicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

#### **1.4 Macrófagos**

O macrófago é uma célula que se encontra presente em todos os tecidos do organismo e apresenta funções importantes no sistema imune. A ingestão de partículas estranhas e seu processamento levam à ativação do sistema imune através da apresentação de antígenos aos linfócitos, da secreção de substâncias capazes de regular o sistema imune 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 quando encontrados em tecidos, 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 lisossomos 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 (GUYTON; HALL, 2002).

Macrófagos residentes no tecido conectivo 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 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).

O papel de ativação de macrófagos na defesa contra células tumorais tem sido investigado extensivamente por décadas. Há um aumento de evidências indicando que macrófagos ativados são capazes de reconhecer e lisar células tumorais incluindo aquelas que resistem a drogas citostáticas (KLIMP et al., 2002).

Ativação de macrófagos e células T por estresse oxidativo e a secreção de citocinas próinflamatórias contribuem significativamente para a progressão da ativação do sistema imune e inflamação (TSE et al., 2003).

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). Os macrófagos respondem a estímulos externos provenientes de alguns microorganismos ou de linfócitos ativados, modificando 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).

Espécies reativas do oxigênio (ROS) são gerados durante o metabolismo celular normal. ROS 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 (FORMAN & TORRES, 2001).

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. A produção de NO tem também sido detectada em preparações mitocôndriais e a existência de uma NOS mitocondrial (mtNOS) associada com a membrana interna da mitocôndria tem sido postulada (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).

### 1.5 Citocromo oxidase

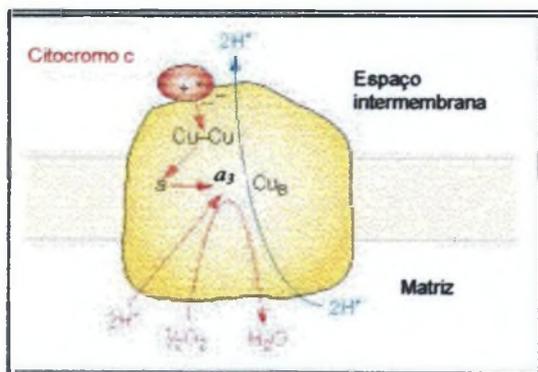
A citocromo oxidase (COX) tem atraído muitos cientistas nos últimos anos, sendo uma das enzimas de membranas melhores conhecidas (AZZI, *et al*, 1985).

A COX (complexo IV da cadeia respiratória) é uma hemoproteína de membrana de múltiplos domínios encontrada em eucariotos e procariotos (HALTIA; FREIRE, 1995), sintetizada pelo mitDNA (DNA mitocondrial) e DNA nuclear (BERTONI-FREDDARI, *et al*, 2001). É a enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons. Ela catalisa a redução do oxigênio à água. O doador de elétrons é o citocromo c e a reação resulta em uma translocação de prótons através da membrana da organela (RAGNO, *et al.*, 1997), contra um gradiente eletroquímico, devido a potencial de energia gerado pela transferência de elétrons (MILLS & FERGUSON-MILLER, 2002).

A COX é responsável por virtualmente todo oxigênio consumido dos tecidos. É o único componente da fosforilação oxidativa por operar fora de um equilíbrio, e então tem sido considerado como um potencial sítio para regular a síntese mitocondrial de adenosina trifosfato (ATP) (BROWN, 1995).

A fosforilação oxidativa fornece a maior parte do combustível para as performances celulares adequadas. Este processo ocorre dentro da mitocôndria, onde a energia derivada de reações oxidativas é utilizada para sintetizar ATP. De acordo

com a demanda de energia o potencial de fosforilação oxidativa para fornecimento de ATP passa por constantes adaptações executadas através de “up regulations” tanto da atividade mitocondrial como de sua biogênese. Fornecimentos de ATP adequados são transmitidos a vários e diferentes tecidos e órgãos dependendo de suas necessidades funcionais, então o metabolismo mitocondrial parece constituir um determinante básico em vários processos e condições patológicas (BERTONI-FREDDARI et al., 2001).



Visão geral da função da citocromo oxidase. As setas vermelhas mostram a direção do movimento do substrato (elétrons, prótons e oxigênio) associado com a redução do oxigênio. Os centros heme  $a_3$  e  $Cu_B$  são reduzidos por elétrons vindos do citocromo c e reoxidado pelo oxigênio durante o ciclo da reação. A energia redox neste processo é conservada ocorrendo a formação de um gradiente eletroquímico de próton através da membrana mitocondrial interna (COOPER, 2002).

Sendo a COX uma enzima catalisadora do passo final do metabolismo oxidativo, pode ser usada como um marcador para visualizações diretas da capacidade oxidativa de células específicas e seus processos (VERCELLI et al., 1999).

## 2 Justificativa

A medicina homeopática vem sendo utilizada por mais pessoas a cada dia, uma vez que é um método de tratamento que além de não apresentar toxicidade, tem baixo custo e é de fácil acesso.

O Canova é utilizado no tratamento de câncer e AIDS e tem apresentando resultados clínicos positivos, aumentando a qualidade de vida dos pacientes.

Nossos resultados prévios mostraram que a atividade oxidativa de macrófagos mostra uma moderada, mas significativa “up-regulation” da produção do óxido nítrico (NO) e uma provável formação de peróxido nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) por estar ligada ao burst respiratório.

É sabido que a “down-regulation” da COX pode ser uma consequência dos efeitos causados pelo NO e  $\text{ONOO}^-$  sobre sua atividade, iniciando uma rápida, seletiva, potente mas reversível inibição (GROVES, 1999; BROWN; BORUTAITE, 2002). Segundo RAGNO et al., (1997) a “down-regulation” da COX poderia refletir em uma interferência geral no metabolismo oxidativo e, em particular, conduzir a uma estimulação da produção de ROS.

Devido a esses fatores resolveu-se fazer-se um estudo mais detalhado sobre a atuação desse medicamento na atividade da enzima COX em macrófagos.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 *Objetivo Geral***

Este trabalho objetiva ampliar os conhecimentos sobre a ação do Medicamento Canova no organismo.

#### **3.2 *Objetivo Específico***

Detectar atividade da enzima citocromo oxidase em macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vitro* e *in vivo* com o medicamento Canova (MC);

## **4 Material e métodos**

### **4.1 Animais**

Para os experimentos foram utilizados 12 camundongos (*Mus musculus*) suíços, albinos, machos, de aproximadamente 3 meses de idade, com peso entre 20g e 30g.

### **4.2 Experimento *in vivo***

Para o experimento *in vivo* os camundongos foram divididos em dois grupos:

- 1) 5 camundongos tratados com 7  $\mu$ l/g de MC por dia, durante 1 semana.
- 2) 5 camundongos utilizados para grupo controle (sem nenhum tipo de tratamento).

Após este período os camundongos foram sacrificados com posterior obtenção dos macrófagos como será descrito no item 4.4.

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

Para o experimento *in vitro* foram utilizados macrófagos de camundongos sem tratamento prévio.

Estabeleceram-se 2 diferentes grupos de células:

1) Grupo Tratado: onde se adicionou ao meio de cultura o Medicamento Canova em concentração de 10%, após 24 horas de cultivo repetiu-se o tratamento com 1% de MC;

3) Grupo Controle: foi cultivado somente com o meio de cultura.

As células foram cultivadas por 48 horas.

### **4.4 Obtenção dos macrófagos peritoniais**

Os camundongos foram sacrificados por asfixia com éter etílico e crucificados. Imediatamente, o tecido cutâneo do abdômen foi aberto com o auxílio de duas pinças dentes de rato, expondo assim o peritônio. Com ao auxílio de uma seringa foi injetado na cavidade peritoneal 10 mL de solução de PBS (Phosphate Buffered Solution) estéril pH 7,2. A solução salina foi ressuspendida, em seguida retirada com seringa e armazenada em garrafas estéreis à 4°C.

As células foram plaqueadas em garrafas de cultivo, contendo  $4 \times 10^6$  células cada uma e mantidas em estufa por 15 min., para adesão. Após este tempo, as células não aderentes foram descartadas. Adicionou-se meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal e penicilina  $1 \mu\text{g/mL}$ , streptomicina  $1 \mu\text{g/mL}$ , e anfotericina  $2,5 \mu\text{g/L}$ , mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$

As células permaneceram em estufa por 48 horas para o experimento *in vitro*, onde foram tratadas. Após este tempo, seguiu-se o protocolo rotineiro para a detecção da citocromo oxidase e depois para a microscopia eletrônica de transmissão.

Para o experimento *in vivo* as células não passaram pela incubação de 48 horas seguindo, após o tempo de adesão, para o processamento da enzima e microscopia

#### **4.5 Marcação ultraestrutural citoquímica da enzima**

Nesta etapa dos experimentos é separado mais um grupo: Controle da Enzima, o qual é estabelecido somente durante o processamento enzimático. Neste grupo não é adicionado o substrato da enzima, para que se possa garantir a especificidade da marcação.

Os macrófagos foram processados para a detecção da atividade da citocromo oxidase. Para a detecção *in vivo* e *in vitro* da citocromo oxidase, as células aderidas foram lavadas a  $4^\circ\text{C}$  em tampão cacodilato  $0.1 \text{ M}$  (pH 7.5) contendo 5% de sacarose. Fixadas durante 1 hora a  $25^\circ\text{C}$  em uma solução contendo 1% de glutaraldeído em  $0.1 \text{ M}$  de tampão cacodilato (pH 7.2) contendo 5% de sacarose, lavadas duas vezes com tampão cacodilato  $0.1 \text{ M}$  (pH 7.2) contendo 5% de sacarose, lavadas duas vezes com tampão TRIS-HCl  $0.05 \text{ M}$  (pH 7.6) contendo 5% sacarose, e então incubadas por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  em meio contendo tampão TRIS-HCl  $0.05 \text{ M}$  (pH 7.6) e 5 mg diaminobenzidina (DAB) e subseqüentemente, foram incubadas por 10 minutos em tampão  $0.05 \text{ M}$  TRIS-HCl (pH 7.6).

#### **4.6 Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As células foram raspadas das garrafas de cultivo após o processamento para a citocromo oxidase, coletadas e centrifugadas, sempre respeitando os grupos sem

misturá-los. Fez-se então a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 2 mM, desidratação em acetona, infiltração em mistura de epon: acetona em série decrescente e emblocagem em Epon. Após a polimerização em estufa à 60°C, os blocos foram cortados em ultramicrótomo e observados sem contrastação no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Foram observados cortes de células pescados em gradinhas de cobre de 300 mesh. Estes foram obtidos através de cortes aleatórios, em intervalos de 0,5  $\mu\text{m}$  das  $12 \times 10^6$  células de cada grupo experimental. Cada grupo foi feito em duplicata, totalizando portanto  $24 \times 10^6$  células por grupo.

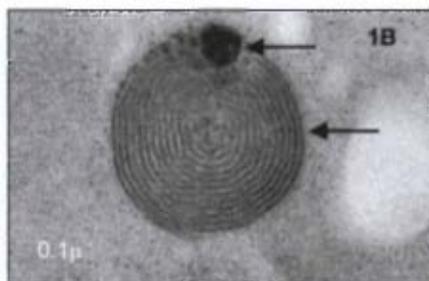
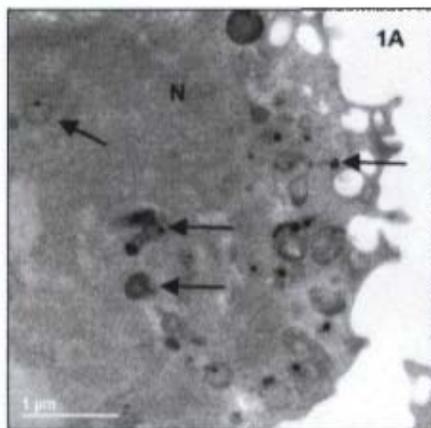
## 5 RESULTADOS

### Citoquímica ultraestrutural para citocromo

A detecção dos produtos reativos (precipitado de DAB) indicativo da atividade da citocromo oxidase foram observados nos experimentos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

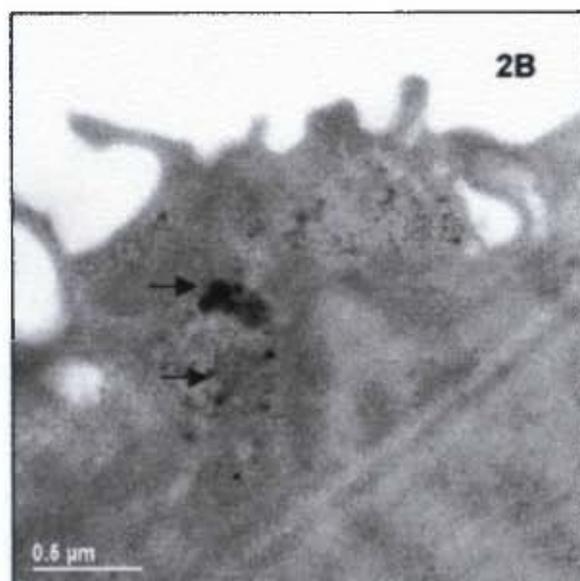
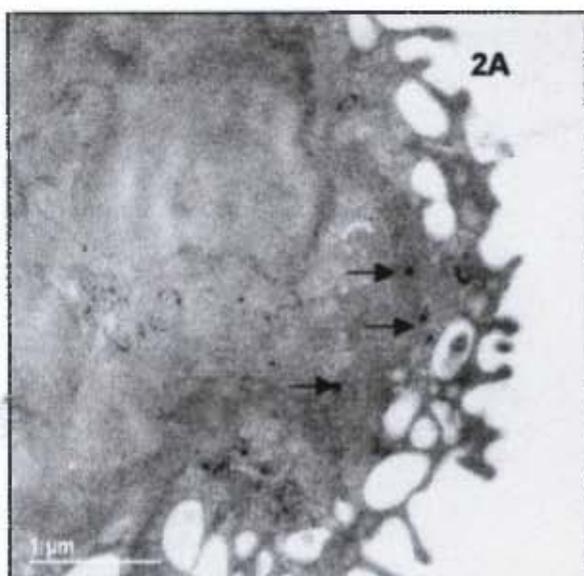
Grupo Controle (*in vivo* e *in vitro*).

Os produtos reativos encontrados no grupo controle foram evidentes e bem distribuídos em vesículas e membranas internas (eletromicrografia 1A e 1B)



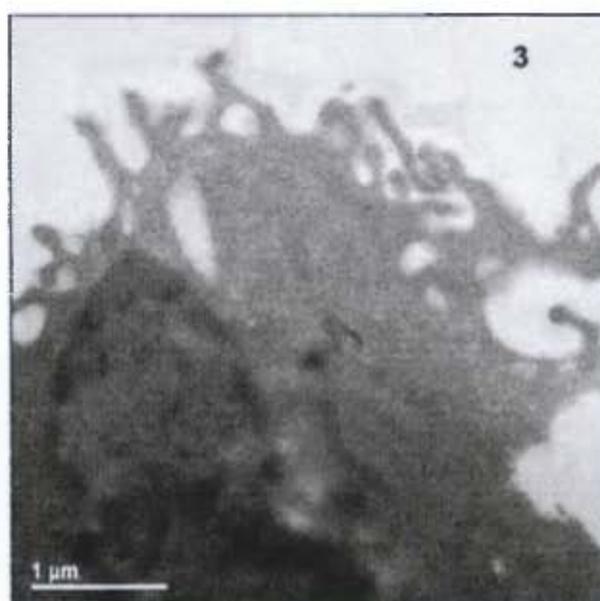
Grupo tratado (*in vivo* e *in vitro*).

Reações positivas não foram encontradas no grupo tratado, ou apenas marcações fracas (eletromicrografia 2A e 2B).



Grupo controle da enzima (*in vivo* e *in vitro*).

Nenhum produto da reação foi encontrado no grupo controle da enzima (fig.3).



## 6 Discussão

O sistema imunológico, 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 imunológico, onde a ação deste determina de maneira decisiva o prognóstico do paciente e uma resposta imune 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? A homeopatia é um método de tratamento que busca intensificar os mecanismos de cura do próprio organismo e de que maneira geral, não apresenta toxicidade. Nossos resultados fornecem uma explicação de como o tratamento com MC pode aumentar funções imunes e poderia ser particularmente importante nas ações citotóxicas dos macrófagos, fornecendo uma provável terapia em tumores, infecções e doenças inflamatórias. A marcação da enzima citocromo oxidase, por exemplo, evidencia como vias do metabolismo podem ser desviadas e alteradas de acordo com a estimulação do macrófago.

Resultados prévios do nosso laboratório mostraram que a atividade oxidativa de macrófagos tratados com o método Canova possuem uma moderada, mas significativa "up-regulation" da produção do NO e uma provável formação de peróxido nítrico ( $\text{ONOO}^-$ ) por estar ligada ao burst respiratório.

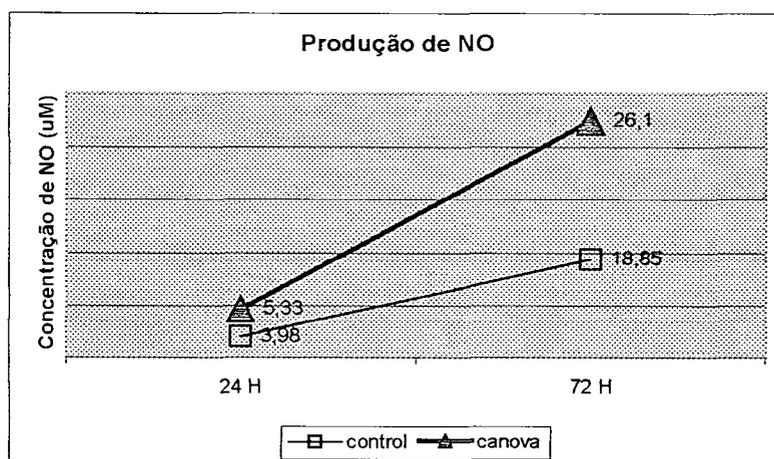


Grafico 1 – produção de NO. Macrófagos foram obtidos após 7 dias de tratamento dos camundongos com 7ml/g de MC ou de animais não tratados. No grupo tratado, 1% do medicamento foi adicionado ao meio de cultura em intervalos de 24 horas. Concentração de Nitrito (mM) no sobrenadante foi determinada após 24 e 72 horas de cultura e resultados estão expressos como média ( $p < 0.01$  comparado ao grupo controle,  $n=64$ ) (GODOY, 2002).

ROS geralmente são considerados produtos tóxicos da respiração mitocondrial, no entanto, eles também são conhecidos por terem funções benéficas individuais, podendo estes serem usados com o papel de defesa contra agentes anaeróbicos invasores (CADENAS; CADENAS, 2002).

RNS e ROS são produzidas por fagócitos assim como macrófagos e neutrófilos em contato com infecções bacterianas, células tumorais e participam da atividade bactericida e tumoricida destas células. Estes produtos difusos e de vida curta tem papéis na defesa antimicrobiana tão bem definida como bem sinalizada na célula (HAN et al., 2001).

Organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos de proteção contra os ROS. Estes consistem em defesas enzimáticas e não enzimáticas. Há um fino balanço entre a geração de ROS e defesas antioxidantes na célula. Quando a geração de ROS supera os antioxidantes celulares, estresse oxidativo é produzido (CADENAS; CADENAS, 2002).

Estresse oxidativo é iniciado, então, por uma produção excessiva de ROS (TSE, et al., 2003). Os ROS e NO podem interagir com diversas moléculas alvo redox suscetível que contenham thiol ou ferro, ativando a resposta ao estresse celular e induzindo proteínas de estresse incluindo a heme oxigenase e proteína "heat shock". Alvos redox suscetíveis incluem proteínas de sinalização celular e fatores de transcrição, incluindo NF- $\kappa$ B e proteínas "heat shock" (HAN et al., 2001). Desse modo, são considerados potentes indutores da resposta inflamatória por meio de citocinas proinflamatória, prostaglandinas, leucotrienos, moléculas de adesão de leucócitos. Alta produção de radicais livres é detectado em um grande número de doenças porque o metabolismo oxidativo é uma parte crucial de toda maquinaria metabólica celular (TSE, et al, 2003).

Tem sido mostrado também que estresse oxidativo “upregulates” o fator estimulador de colônia de macrófagos (m-CSF) e a expressão de moléculas de adesão via ativação do NF-kB (HAN et al.,2001).

O fator nuclear kB (NF-kB) é um fator de transcrição envolvido na expressão de muitos genes, particularmente naqueles das respostas inflamatórias e imunes. A forma predominante do NF-kB em células não estimuladas ocorre no citoplasma como um heterodímero de duas proteínas, p50 e p65, complexado a uma subunidade inibitória chamada IκB que impede migrações do heterodímero ao núcleo e sua ligação ao DNA. A ativação de células por estímulos apropriados resulta na fosforilação, ubiquinação e degradação da subunidade IκB, permitindo a migração do heterodímero ao núcleo onde pode se ligar ao DNA e interagir com promotores de genes alvos, assim como iNOS, aumentando a sua transcrição (BRENNAN; O’NEILL, 1995; HAN et al.,2001).

NF-kB é ativado por uma grande extensão de fatores incluindo lipopolissacarídeos (LPS), as citocinas interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF). A ativação do NF-kB deve ser vista como um evento chave nas vias de sinalização, levando a mudanças na expressão de muitos genes (BRENNAN; O’NEILL, 1995), assim como possui um papel importante na expressão dos genes da iNOS em vários tipos celulares, incluindo macrófagos de murinos (HAN et al.,2001).

Os eventos intracelulares que levam a ativação do NF-kB envolvem cascatas de fosforilação e desfosforilação e parecem ser controlados pela situação redox da célula. NF-kB é ativado por um estado pro-oxidante na célula e é potencialmente inibido por antioxidantes (CADENAS; CADENAS, 2002).

Um aumento de evidências indica que antioxidantes suprimem ativação de NF-kB em resposta á LPS, fortemente suportando o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) na ativação do NF-kB. Diversos fatores indicam o envolvimento de ROS no caminho da transdução de sinais levando a ativação do NF-kB. Primeiro, a maioria dos agentes ativadores do NF-kB desencadeia a formação de ROS. Segundo, tratamento direto com oxidantes, assim como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ativa NF-kB em algumas células sempre na ausência de algum estímulo fisiológico. Terceiro, a ativação do NF-kB pode ser bloqueada por interferência com o sistema mitocondrial de transporte de elétrons.

Quarto, uma variedade de antioxidantes tem sido mostrada como inibidores da ativação do NF- $\kappa$ B em resposta a LPS e outros ativadores, ambos *in vitro* e *in vivo*. Estas observações sugerem que a ativação do NF- $\kappa$ B é no mínimo facilitada por algumas reações oxidantes (CADENAS; CADENAS, 2002).

O nível da expressão da iNOS é determinada, em parte, pela taxa de transcrição, e a transcrição é dependente da ativação do NF- $\kappa$ B. O promotor iNOS de murinos contém dois sítios funcionais ligantes no NF- $\kappa$ B, e o inibidor do NF- $\kappa$ B bloqueia expressão de iNOS em macrófagos. Embora radicais possam modular a ativação de NF- $\kappa$ B, seus papéis na regulação da expressão da iNOS e produção de NO em macrófagos de murinos LPS estimulados não é bem estabelecido, no entanto, fortes evidências indicam que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode estimular a fosforilação de proteínas, as quais são bem conhecidas na ativação do NF- $\kappa$ B (HAN et al.,2001).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido em macrófagos participa da “upregulation” da expressão da iNOS via ativação do NF- $\kappa$ B e conseqüentemente aumenta a produção de NO. Em contraste, a alta produção de NO suprime a produção de iNOS e NO por meio de um mecanismo que pode envolver inibição da tradução da iNOS (HAN et al.,2001), desse modo, NO é um inibidor “feedback” negativo da expressão da proteína iNOS (CADENAS; CADENAS, 2002), prevenindo que possíveis danos sejam causados pelos ROS.

O NO tem mostrado inibir a ativação do NF- $\kappa$ B estabilizando o seu inibidor  $\kappa$ B ou impedindo a ligação do NF- $\kappa$ B ao DNA. Por outro lado, é sugerido que o NO ativa NF- $\kappa$ B em células mononucleares humanas por aumentar a atividade da proteína tirosina fosfatase (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).

Vários estudos mostram que TNF $\alpha$ , um forte ativador do NF- $\kappa$ B, induz a formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> na mitocôndria. O<sub>2</sub><sup>-</sup> pode ser dismutado por Mn superóxido dismutase (Mn SOD) gerando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o qual pode facilmente atravessar a membrana mitocondrial e liberado no

citosol onde poderia induzir a ativação do NF- $\kappa$ B. Além disso, TNF $\alpha$  durante inflamações transitoriamente ativa neutrófilos e macrófagos, desse modo causando a liberação de  $O_2^-$ , como uma consequência da ativação de NADPH oxidase associado a membranas. NADPH oxidase associada à membrana de fagócitos geram  $O_2^-$  dentro do espaço extracelular, o qual é dismutado espontaneamente ou enzimaticamente a  $H_2O_2$ . É certo que  $O_2^-$  extracelular não atravessa facilmente a membrana citoplasmática, enquanto que o anfipático  $H_2O_2$  facilmente difunde-se para dentro das células (HAN et al., 2001).

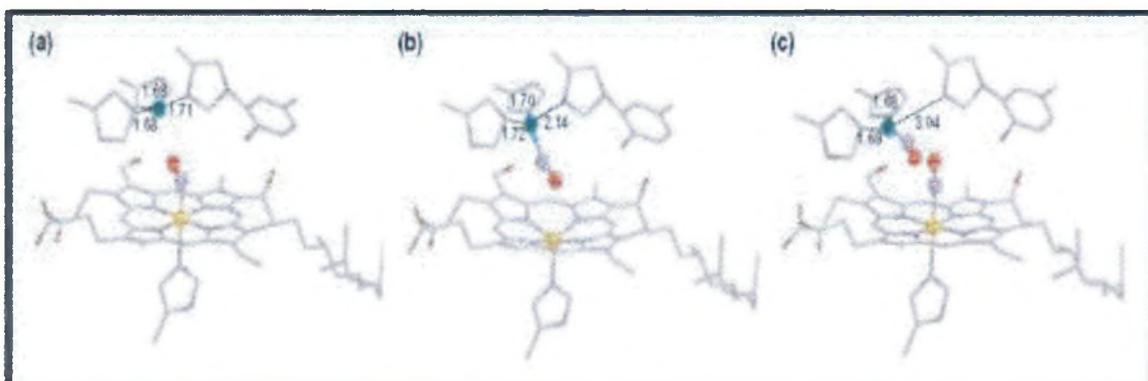
ROS e NO podem interagir de diferentes maneiras e agir sinergisticamente causando citotoxicidade. Os radicais NO e  $O_2^-$  reagem para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um poderoso oxidante o qual é capaz de nitrar proteínas, enfraquecendo, desse modo, a atividade de diferentes enzimas mitocondriais, levando a uma diminuição nos níveis de energia (CADENAS; CADENAS, 2002). Em baixas concentrações,  $ONOO^-$  pode participar de processos sinalizadores (FORMAN; TORRES, 2001).

A enzima antioxidante MPO liberada de fagócitos interagem com  $H_2O_2$  e produz o agente bactericida HOCl. Portanto, é possível que  $H_2O_2$  tenha duas funções, incluído atividade bactericida e a regulação da expressão do gene da iNOS em macrófagos (HAN et al., 2001).

NO e seus derivados estimulam produção de  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  pela mitocôndria, inibindo a respiração mitocondrial por vários meios (BORUTAITE, et al., 2000). NO liga-se com alta afinidade a COX, no sítio ligante do oxigênio, quando este sítio está reduzido (BROWN, 1995). Desse modo, controla funções celulares via reversível e específica inibição da respiração, aumentando então, o escoamento de elétrons da cadeia respiratória (CADENAS; CADENAS, 2002).

A inibição da COX é competitiva com oxigênio. Inibição da citocromo oxidase causaria decréscimo na produção de ATP, e então aumentaria níveis celulares de ADP, AMP, GDP, e Pi. Os níveis destes metabólitos regulam a grande extensão de processos celulares, incluindo contração muscular, sínteses de proteínas e transporte de íons, e

então inibidores da citocromo oxidase potencialmente regulam estes processos. (BROWN, 1995).



Esquema mostrando 3 formas de NO ligar-se a COX. Em a) NO liga-se ao grupo heme a<sub>3</sub>, em b) ao Cu<sub>B</sub> e em c) ligando-se aos dois centros simultaneamente. As esferas coloridas representam, em vermelho ferro (Fe), em verde cobre (Cu), em vermelho oxigênio (O) e nitrogênio (N) em roxo (COOPER, 2002).

Inibição da respiração pelo NO pode contribuir para efeitos citotóxicos e citostáticos da atividade de macrófagos, os quais estão envolvidos na defesa do hospedeiro (BROWN, et. al, 1998). Assim, o estímulo da produção de (ROS) através da inibição da COX seria um fator interessante em situações de proteção do organismo contra certos antígenos.

## 7 Conclusão

Macrófagos tratados com o MC apresentaram a detecção de uma menor atividade da enzima citocromo oxidase, visualizada através da técnica de marcação ultraestrutural citoquímica.

Resultados prévios mostram uma moderada, mas significativa “up-regulation” da produção do óxido nítrico (NO) e uma provável formação de peróxido nítrico (ONOO<sup>-</sup>) por estar ligada ao burst respiratório. Estes resultados juntamente com os resultados apresentados aqui sugerem que a “down-regulation” da COX pode ser uma consequência dos efeitos causados pelo NO e ONOO<sup>-</sup> sobre sua atividade, iniciando uma rápida, seletiva, potente mas reversível inibição, confirmando os dados encontrados na literatura. A “down-regulation” da COX poderia refletir, então, em uma interferência geral no metabolismo oxidativo e, em particular, conduzir a uma estimulação da produção de ROS. Esta explosão respiratória é uma parte crucial do mecanismo de defesa do nosso organismo.

Dessa forma, os nossos dados acentuam a importância da utilização do medicamento Canova em pessoas com sistema imune debilitado.

## 8 Referências bibliográficas

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 3ª ed., Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2000.
2. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**, 3ª ed., Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.
3. 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.
4. AZZI, A.; MÜLLER, M.; ÓSHEA, P.; THELEN, M. Molecular properties of reconstituted cytochrome c oxidase: new evidence supports vectorial proton translocation, **Journal of inorganic biochemistry**, v. 23, p. 341-347, 1985.
5. BAROLLO, C. R. **Aos que se tratam pela Homeopatia**. 7ª ed., São Paulo, Typus ed., 1995.
6. BERNAL, G. G. Homeopathy and physics: a brief history. **British Homeopathic Journal**, 82, p.210-216, 1993.
7. BORUTAITE, V.; BUDRIUNAITE, A; BROWN, G.C. Reversal of nitric oxide, peroxyxynitrite and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols, **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1459, p. 405-412, 2000.
8. BERTONI-FREDDARI, C.; FATTORETTI, P.; CASOLI, T.; DI STEFANO, G.; SOLAZZI, M.; MEIER-RUGE, W.; Quantitative cytochemical mapping of mitochondrial enzymes in rat cerebella, **Micron**, v. 32, p. 405-410, 2001.
9. BRENNAN, P.; O'NEILL, L. A. J. Effects of oxidantes and antioxidantes on nuclear factor kB activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1260, p. 167-175, 1995.

10. BROWN, G. C. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase, **FEBS Letters**, v.369, p. 136-139, 1995.
11. BROWN, G. C., BORUTAITE, V.,. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, 1440-1450. 2002.
12. 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.
13. CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Flighiting the stranger-antioxidante protection against endotoxin toxicity, **Toxicology**, p. 45-63, 2002.
14. CANOVA DO BRASIL, Informações Científicas. Curitiba, 2000.
15. CANOVA DO BRASIL, Monografia: Método Canova®. Curitiba, 2001.
16. COOPER, E. C., Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 1, 2002.
17. COOPER, G. M. **A célula, Uma Abordagem Molecular**, 2<sup>a</sup> ed., Artmed Editora, Porto Alegre, 2001.
18. ERWIG, L. P.; KLUG, D.C.; WALSH, G.M.; REES, A.J. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J. Immunol.**, Baltimore, v.161, n.4, p.1983-1988, 1998.
19. FORMAN, J. H.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p.189-216, 2001.
20. GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Color Textbook of Histology**, Philadelphia, p. 58-69, 1997.

21. 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.
22. 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.
23. GROVES, J.T., *Current Opinion in Chemical Biology* V.3, 226-235, 1999.
24. GUYTON, A C.; HALL, J. E. **Fisiologia Médica**, 10<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2002.
25. HALTIA, T, FREIRE E., *Biochimica et Biophysica Acta* 1228 (1995) 1-27.
26. 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-kB 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.
27. JANEWAY, C. A. Jr; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**, 5<sup>a</sup> ed., artmed editora, Porto Alegre, 2002.
28. JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da homeopatia**, Rio de Janeiro, p. 13-19, 21-28, 61-78, 1996.
29. 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.
30. MILLS, D. A; FERGUSON-MILLER, S., Influence of structure, ph and membrane potential on proton movement in cytochrome oxidase, **Biochimica et biophysica Acta**, v. 155, p. 96-100, 2002.
31. NELSON, D.J.; JOW, F. Whole-cell currents in macrophage: Human monocytes-derived macrophages. **J. Membr. Biol.**, v. 117, p. 29-44, 1990.

32. NEVEU, P.J. The mononuclear phagocyte system. **Bull. Inst. Pasteur**, v. 84, p. 24-66, 1986.
33. PARKIN, J.; COHEN, B.; Overview of the immune system, **The Lancet**, v. 357, 2001.
34. PEAKMAN, J. ; VERGANI L. **Imunologia Básica**. Editora Manole Ltda., São Paulo, 1999.
35. PLAYFAIR, J. **Infection and Immunity**. Oxford University Press Inc., New York, 1995.
36. RAGNO S., ESTRADA I., BUTLER R., COLSTON M.J., Immunology letters 57 (1997) 143-146
37. ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5<sup>a</sup>ed., Editora Manole Ltda., São Paulo, 1999.
38. 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.
39. 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.
40. SEADI, C. **Princípios Básicos de Imunologia**, 1<sup>a</sup>ed., Editora da Ulbra, Canoas, 1998.
41. STITES, D.P.; TERR, A.I. **Imunologia**, Editora Prentice/Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1992.
42. 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.

43. ULLMAN, D. **A Homeopatia – Medicina para o Século XXI**. São Paulo, Ed. Cultrix, 1995.
44. 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.
45. VERCELLI, A., REPICI, M., BIASIOL, S., VERCELLI, S. J. Maturation of NADPH-A activity in the rat's Barrel- Field cortex and its relationships to cytochrome oxidase activity. **Experimental Neurology** v. 156, p. 294–315, 1999.
46. VIKSVEEN, P., Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative? **Homeopathy**, p. 99-107, 2003.
47. WAL, R. **Estudo Histopatológico do Sarcoma 180 de Camundongos Tratados com Medicamento Homeopático Método Canova®** Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.
48. WOOD, K.J., AUSTYN, J.M. **Principles of celular and molecular immunology**. Oxford University press Inc, New York, 1993.