

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS FERRARI DE ANDRADE

**AÇÃO DE COMPLEXO HOMEOPÁTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS E
NO SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS**

Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas – Licenciatura e Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dorly de Freitas
Buchi

CURITIBA

2009



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas

**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos 10 dias do mês de dezembro de 2009 a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta pelos Professores EDVALDO DA SILVA TRINDADE, RUTH J. G. SCHADECK e DORLY DE FREITAS BUCHI, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia **AÇÃO DE COMPLEXO HOMEOPÁTICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS E NO SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS** de autoria do acadêmico LUCAS FERRARI DE ANDRADE.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 10,0 (Doz).

Prof.(a) Orientador(a)

Membro da Comissão

Membro da Comissão

Curitiba, 10 de DEZEMBRO de 2009.

RESUMO

O sistema imunológico constitui-se de um conjunto de células e moléculas capacitadas para o reconhecimento e destruição de microorganismos invasores, células tumorais e células próprias infectadas por patógenos intracelulares. Alterações na efetividade do sistema imunológico de camundongos já foram previamente descritas em testes experimentais de complexos homeopáticos. Aqui, foi avaliada a atividade biológica de um complexo homeopático derivado de *Calcarea carbonica* com associações (M8). Três grupos experimentais foram analisados: sem tratamento, tratado com solução diluente e tratado com M8. No experimento *in vivo* o tratamento foi feito através da água de beber de camundongos *Mus musculus* por sete dias. Após esse período, os leucócitos do sangue periférico foram analisados por extensão sanguínea e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para o experimento *in vitro*, macrófagos peritoneais de *Mus musculus* não tratados foram cultivados em DMEM com 10% de soro fetal bovino e mantidos a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O tratamento consistiu na adição de 20% na da solução na cultura, com dose reforço de 1% após 24h. Após 48h do início do cultivo, foi analisada a marcação de vesículas ácidas com vermelho neutro. Como ferramenta estatística foi utilizado ANOVA one way (P<0,05) com pós teste de Tukey (P<0,05) através do software GraphPad® Prism 5. No experimento *in vivo*, não foram detectadas alterações através da extensão sanguínea e imunofenotipagem. Também, nos experimentos *in vitro*, não foram detectadas alterações na marcação de vesículas ácidas. Resultados prévios em nosso laboratório mostraram um aumento na resposta do sistema imune, Th1 e Th2, após tratamento com M8. Nossos resultados aqui apresentados não mostram novas informação sobre os mecanismos de ação do tratamento com M8, mas nos permite concluir que em camundongos saudáveis não existem efeitos colaterais no sangue periférico e nas vesículas ácidas de macrófagos. Assim, mais estudos sobre *Calcarea carbônica* e associações são necessários.

Palavras-chave: Macrófagos, imunofenotipagem sanguínea.

ABSTRACT

The immune system is composed of a collection of cells and molecules able to recognize and destroy invading microorganisms, tumor cells and self cells infected by intracellular microorganisms. Changes in the efficiency of the mouse immune system already had been described in experimental tests of homeopathic complexes. Here, the biological activity of another homeopathic medication, the *Calcarea carbonica* and associations (M8), was assessed. Three experimental groups were assessed: without treatment, treated with the dilution solution, and treated with M8. In the *in vivo* experiment, the treatment was done through the drinking water of *Mus musculus* mice for seven days. After, the peripheral blood leucocytes were analyzed by immunophenotyping by Flow Cytometry and blood smear. For the *in vitro* experiments, mouse peritoneal macrophages were cultured in DMEM, supplemented with 10% of bovine fetal serum, at 37°C, atmosphere of 5% of CO₂. The treatment was done through a dose of 20% in culture conditions, with a new dose of 1% after 24 hours. After 48 hours of the beginning of the culture, the macrophages were assessed for neutral red labeling of acid vesicles. As a statistical tool, one-way ANOVA, with Tukey post test, $p < 0,05$, through GraphPad® Prism software. In the *in vivo* experiments, there were not found changes in the leukocytes immunophenotyping and blood smear. Also, in the *in vitro*, there were not found changes in the neutral red labeling. Previous results in our lab showed an improvement in immune system response, both Th1 and Th2, after treatment with M8. Our results here presented didn't show any new information about the action mechanisms of M8 treatment, but allow us to conclude that in normal health mice there aren't side effects available in peripheral blood and macrophages acid vesicles and more studies about *Calcarea carbonica* and associations are needed.

Key words: macrophages; immunophenotyping.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
LINFÓCITOS	8
MACRÓFAGOS	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
COMPLEXO HOMEOPÁTICO	14
ANIMAIS	14
EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	15
EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	16
ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	18
EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	20
6. CONCLUSÃO	21
7. REFERÊNCIAS	22
8. ANEXO	25

1. INTRODUÇÃO

Utilizada desde 1940 no Brasil, reconhecida como especialidade médica e uma forma terapêutica oficial desde 1979 pela Associação Médica Brasileira (ABM), a Homeopatia é uma terapia de grande aceitação popular devido a seus resultados, baixo custo capital, e não se ter registro de toxicidades ou efeitos colaterais. Entretanto, a eficácia terapêutica do tratamento homeopático é pouco comprovada cientificamente, com uma quantidade ainda insuficiente de estudos controlados e que utilizam metodologias com qualidades. Isso justifica o desenvolvimento de estudos para avaliação da efetividade da homeopatia em problemas de saúde comuns e relevantes na população brasileira, com a perspectiva de complementar ou mesmo substituir práticas terapêuticas hoje empregadas hegemonicamente pela comunidade médica (DANTAS, 1994).

Na manipulação de medicamentos homeopáticos, a técnica da terapêutica homeopática utiliza substâncias especialmente preparadas e altamente diluídas. Cada diluição é precedida de uma vigorosa homogeneização, chamada pelos homeopatas de dinamização ou sucussão. Também, antes de qualquer tratamento, o medicamento necessita ser sucussionado novamente. Esse procedimento é fundamental para a manutenção das propriedades farmacológicas de qualquer medicamento homeopático.

A experimentação científica com homeopatia utiliza dois controles: sem tratamento e tratamento com a solução veículo do medicamento. Resultados prévios com formulação medicamentosa baseada em técnicas homeopáticas demonstraram, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, o aumento do metabolismo de macrófagos de camundongos. Também, a produção de TNF- α *in vitro* mostrou-se significativamente reduzida por essas células (PIEMONTE; BUCHI, 2002). O tratamento aumentou o índice endocítico bem como o sistema endosomal/lisossomal dos macrófagos, quando desafiados com leveduras (LOPES *et al.*, 2006). O tratamento proporcionou modulação tanto *in vivo* quanto *in vitro* dos efeitos da interação entre macrófagos com *Leishmania amazonensis* e *Paracoccidioides braziliensis*, controlando a progressão da infecção e limitando a sua disseminação (PEREIRA *et al.*, 2005) (TAKAHACHI G. *et al.*, 2006).

Em estudos envolvendo o modelo tumoral do Sarcoma 180, nos grupos tratados *in vivo*, houve redução do volume tumoral e aumento significativo da infiltração leucocitária e da fibrose peritumoral e 30% de animais apresentaram remissão total do tumor (SATO *et al.*, 2005).

Em pesquisas realizadas com células da medula óssea, todas as técnicas de microscopia mostraram que a linhagem monocítica (CD11b+) e estromal (células aderentes) encontravam-se mais ativadas pelo tratamento. Também se verificou aumento de agrupamentos celulares sobre células aderentes sugerindo nichos de proliferação e diferenciação (ABUD *et al.*, 2006) (CESAR *et al.*, 2008). Este complexo não se mostrou tóxico nem mutagênico (SELIGMANN I.C. *et al.*, 2003).

A análise da expressão gênica em macrófagos por Microarranjo (GeneChip® MG74Av2 (Affymetrix, Inc, CA, USA)) ocorrida após o tratamento dos camundongos, revelou expressão diferencial (de OLIVEIRA *et al.*, 2008). Esses resultados mostram que o tratamento homeopático atua no sistema imunológico e pode ser benéfico ao organismo.

Embora os medicamentos homeopáticos sejam utilizados por grande número de pessoas, as pesquisas científicas ainda são muito escassas. A maioria dos estudos é de natureza clínica, com metodologia variada, resultados polêmicos e duvidosos com relação a sua real eficácia.

2. OBJETIVOS

Geral

- Avaliar alterações no sistema imunológico de camundongos tratados com medicamento complexo homeopático (M8).

Específicos

- Quantificar os leucócitos do sangue periférico através de contagem diferencial em extensão sanguínea e imunofenotipagem em citometria de fluxo;
- Detectar a marcação de vesículas ácidas com vermelho neutro em macrófagos;

3. REVISÃO DA LITERATURA

Muito do que se sabe hoje sobre os componentes celulares e moleculares da resposta inflamatória foi descoberto gradualmente a partir do século XIX (GORDON; PHILIP, 2005). O sangue periférico é um local em que circulam grandes quantidades de células imunológicas, como os linfócitos e as suas subpopulações, os granulócitos e os monócitos.

LINFÓCITOS

Os linfócitos são células de tamanho entre 6 –10 μm , geralmente arredondadas, com relação núcleo/citoplasma elevada quando analisadas em microscópio comum, após coloração hematológica adequada. São encontrados principalmente no baço, medula óssea, linfonodos e timo. Os linfócitos podem ser categorizados de acordo com seus marcadores de membrana, reações a estímulos, padrões de migração e vida média (ARDAWI; NEWSHOLME, 1985). São importantes na resposta imunitária tanto humoral, quanto celular, e suas funções estão relacionadas não só com a capacidade de defesa do organismo contra infecções, mas também com o desenvolvimento de doenças auto-imunes.

Linfócitos B

Os linfócitos B (ou células B) iniciam maturação na medula óssea e se caracterizam pela presença de imunoglobulinas inseridas na membrana plasmática, as quais atuam como receptores específicos de antígenos. As células B, quando diferenciadas para plasmócitos, são as células capazes de produzir anticorpos. Entre os vários antígenos expressos na superfície dessas células, os CD19, CD20 e CD22, são atualmente os principais marcadores utilizados na identificação de células B humanas e em camundongos. O CD19 é uma glicoproteína transmembrânica de 95 kDa, um membro da superfamília das imunoglobulinas, que é expressa durante todo o desenvolvimento do linfócito B a partir da célula pré-B, nos estágios de maturação da célula B e deixa de se expressar no plasmócito. Na superfície desta célula B, a molécula CD19 associa-se com o CD21 (CR-2) e o

CD81 (TAPA-1), e esse complexo multimolecular se relaciona com imunoglobulinas da superfície para promover ativação celular. O CD19 participa no desenvolvimento e ativação do linfócito B, na maturação dos linfócitos B de memória e na regulação da tolerância (KROP *et al.*, 1996).

Linfócitos T

Uma segunda classe de linfócitos é formada pelos linfócitos T, cujos precursores originam-se na medula óssea e depois migram pela corrente sanguínea para o timo, onde amadurecem. Os linfócitos T se subdividem em populações funcionalmente distintas, das quais as mais bem definidas são as células T auxiliares ou helper (Ta ou Th) e as células T citotóxicas ou citolíticas (Tc ou CTLs). Essas células T reconhecem e respondem aos antígenos associados à superfície celular e não aos solúveis, de tal modo que o seu receptor de antígenos (chamado de TCR) reconhece somente antígenos peptídicos ligados às proteínas codificadas por genes no complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e expressas na superfície de outras células. O reconhecimento do antígeno/MHC pelo TCR é a interação biológica fundamental, responsável para iniciar e perpetuar a resposta imunológica, como ativar a proliferação e diferenciação das células T, assim como o desempenho de suas funções efetoras (FRAZER *et al.*, 1999).

Os linfócitos T maduros encontrados no sangue periférico e em órgãos linfóides secundários expressam CD2 e CD3 em sua superfície. O CD3 é um complexo de 4 diferentes polipeptídios transmembrânicos de superfície, que se associam aos receptores de célula T (TCR), servindo de transmissor de sinais dos receptores para o citoplasma e necessário para que os receptores possam ser transportados para a superfície celular. As subpopulações de células T podem ser distinguidas pela presença de diferentes marcadores, de tal modo que as células T helper, com função de auxiliar ou induzir respostas imunológicas, apresentam o marcador CD4; e as células T citotóxicas, com função de lisar células, apresentam o marcador CD8. Uma das funções do CD4 e CD8 é promover a adesão das células T, restritas pelo MHC às células apresentadoras de antígenos (APCs) ou às células alvos, em razão da sua afinidade específica para as moléculas do MHC. Rosenstein *et al.* (1988) e Weber (1993) mostraram que o CD4 e o CD8, expressos na

superfície das respectivas células T, participam na adesão TCR/MHC, uma interação de baixa afinidade; aumentando a avidéz dessa interação, funcionam como "co-receptores" dos TCRs (FRAZER *et al.*, 1999).

No sangue humano ou nos tecidos linfóides secundários, aproximadamente 70% das células T consistem em células CD4+CD8- (denominadas células CD4), enquanto 25% são de CD4-CD8+ (denominadas células CD8), ambas conhecidas como linfócitos positivos simples e são as que estão mais envolvidas nas respostas imunológicas. Os 4% restantes são linfócitos duplo-negativo CD4-CD8-, que expressam uma forma alternativa de TCR com polipeptídios γ e δ . Podem produzir linfocinas, exibem ação citolítica, *in vitro* algumas dessas células podem reconhecer antígenos não peptídicos derivados de micobactérias.

Linfócitos NK

Células NK são uma subpopulação distinta de linfócitos que, sem sensibilização prévia e sem necessidade de restrição ao MHC podem matar células tumorais e células normais infectadas por vírus. O mecanismo pelo qual as células NK preferencialmente reconhecem e lisam alvos transformados, em vez de normais, não é bem claro. Mas células tumorais que falham na expressão de pelo menos um alelo da classe I do MHC são mais efetivamente atacadas pelas células NK (SCHREIBER, 1999).

A atividade citotóxica das células NK pode ser aumentada *in vitro* e *in vivo* com linfocinas IL-2 e IFN, originando as células LAK (células matadoras ativadas por linfocinas). Assim, a atividade das células NK pode ser intensificada pelas respostas imunológica e podem representar uma defesa inicial do hospedeiro contra o crescimento de células transformadas nos sítios primários e metastáticos, como um mecanismo efetor recrutado pelas células T para suplementar a resposta anti-tumoral específica (COSTELO *et al.*, 2004).

In vitro, células de tumor sólido são mortas por um processo que envolve cobertura com anticorpos (opsonização) e subsequente fagocitose pelos macrófagos. Esse processo pode ser intensificado em presença de fatores do complemento. Alternativamente, células tumorais cobertas com anticorpos podem ser mortas na ausência de fagocitose pela citotoxicidade mediada por células

dependentes de anticorpo, quando cultivadas em conjunto com macrófagos, células NK, ou neutrófilos. A relevância desses mecanismos para matar células tumorais *in vivo* não está clara (SCHREIBER *et al.*, 1999). Podem ser importantes para indução de respostas para o tumor pelas células T citotóxicas, pela secreção de IL-1 ou IL-6 (GREENBERG *et al.*, 1994).

MACRÓFAGOS

Derivados de monócitos sanguíneos, que se originam na medula óssea de um progenitor mielóide comum, os macrófagos são células que possuem uma grande heterogeneidade, com um fenótipo determinado pelo tecido onde está diferenciado e a sua função (MORRISSETE; *et al.*, 1999). Recentemente, macrófagos tem sido objeto de intensivos estudos devido à variedade de funções que desempenham, tanto em situações fisiológicas de saúde, quanto em diversas enfermidades.

Como outras células hematopoiéticas, macrófagos têm sua origem na medula óssea, a partir de células pluripotentes, com renovação própria, circulam no sangue periférico como monócitos antes de migrarem para os diversos tecidos, onde amadurecem e se diferenciam, formando uma população residente de macrófagos (GORDON, *et al.*, 1988). Portanto, os macrófagos estão normalmente presentes em locais como o Sistema Nervoso Central, órgãos endócrinos, tubo digestivo, rim, órgãos linfóides, etc. (MARTIN; LEBOVICH, 2005). Também, eles estão estrategicamente situados em locais de contato com o meio exterior, formando uma primeira linha de defesa, aptos a iniciar uma reação de defesa através da fagocitose, liberação de mediadores químicos intercelulares (SILVA; QUELUZ, 1996).

O número de macrófagos nos tecidos pode ser alterado em resposta a uma injúria ou infecção, pois macrófagos estimulados ou imunologicamente ativados podem ser rapidamente recrutados. Uma vez que os macrófagos tenham adquirido o fenótipo inflamatório eles são recrutados para os sítios de lesões inflamatórias, onde desempenham sua função no sistema imunológico como uma linha de defesa contra patógenos, reconhecendo-os e destruindo-os (PEREIRA *et al.*, 2005). Esses macrófagos são, em geral, também eficientes na liberação de vários mediadores e

enzimas (MARTIN; LEIBOVICH, 1996). Tais características representam um mecanismo de amplificação imunológica competente no combate à maioria das infecções.

Os macrófagos respondem a estímulos externos provenientes de alguns microorganismos, de outros macrófagos ou de linfócitos ativados, modificando algumas de suas propriedades, tais como: habilidade para aderir e espalhar-se à substratos, taxa de endocitose e fusão de lisossomos com vesículas endocíticas. Em resposta a um estímulo, essas células também liberam radicais e moléculas derivadas do oxigênio, como O₂⁻ (superóxido) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), e de nitrogênio (óxido nítrico) (SILVA; QUELUZ, 1996).

Os macrófagos apresentam uma série de funções relacionadas principalmente com a defesa do organismo. Essas funções estão envolvidas com um reconhecimento primário que ocorre ao nível de receptores da membrana plasmática. Esses receptores de superfície são moléculas glicoproteicas expressas na superfície celular, que permitem a comunicação dos macrófagos com o meio em que está localizado, recebendo informações para exercer suas funções ou para acessá-las (PONTZER, RUSSEL, 1990). Receptores presentes na membrana dos macrófagos ativados desempenham um importante papel na capacidade da célula em reconhecer e destruir macromoléculas diversas (COLLINS, 2000).

Os receptores da membrana plasmática controlam as atividades dos macrófagos tais como crescimento, diferenciação, ativação, migração, endocitose e secreção. Portanto, os receptores são importantes em processos fisiológicos e patológicos, incluindo a defesa do hospedeiro, inflamação e reparo. A versatilidade de resposta destas células a vários estímulos depende da sua habilidade em expressar um grande repertório de receptores, alguns restritos exclusivamente aos macrófagos, e outros em comum com diversos tipos celulares (SILVA; QUELUZ, 1996).

A interação de alguns receptores com seus respectivos ligantes permite a ativação de fosfolipases, tornando os macrófagos fonte de metabólitos do ácido araquidônico, importantes mediadores na inflamação (MANTOVANI *et al.*, 2007). Essas fosfolipases agem sobre fosfolipídeos da membrana, os quais dão origem a prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano; pela via das lipoxigenases são

formados leucotrienos. As prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano influenciam o tônus do músculo liso, agregação de plaquetas, funções linfocitárias, mielopoiesis, permeabilidade vascular, dor e febre. Leucotrienos mediam agregação de neutrófilos, adesão ao endotélio vascular e quimiotactismo para os leucócitos sanguíneos, contração do músculo liso e aumento da permeabilidade vascular (SILVA; QUELUZ, 1996).

Dentre a gama de células e moléculas capazes de mediar respostas imunes, as citocinas merecem destaque. As citocinas constituem um grupo extenso de moléculas representadas por proteínas, peptídeos ou glicoproteínas, responsáveis na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. São pequenas moléculas secretadas por uma determinada célula que alteram o seu próprio funcionamento ou o funcionamento de outras células. O efeito biológico depende da citocina e da(s) célula(s) envolvida(s), mas geralmente essas moléculas efetuam ativação celular, divisão, apoptose ou movimento. Em resposta a citocinas e produtos microbiais, fagócitos mononucleares expressam propriedades funcionais especializadas (COLLINS, 2000).

De forma alusiva às respostas Th1 e Th2, para via de respostas imunológicas de linfócitos, muitos pesquisadores se referem a macrófagos ativado como M1 e M2 (MANTOVANI *et al.*, 2007). M2 é um nome genérico para as várias formas de ativação de macrófagos que não são M1, e incluem macrófagos expostos à Interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13), complexos imunes, interleucina-10 (IL-10), glicocorticóide, ou hormônios específicos (MANTOVANI *et al.*, 2007).

Células M1 têm um fenótipo de alta excreção de Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-23 (IL-23) e baixa excreção de IL-10. Elas são eficientes produtoras de moléculas efetoras (reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio) e citocinas inflamatórias Interleucina-1b (IL-1b), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6), e participam como indutores e efetores na resposta Th1. Eles também oferecem resistência contra parasitas intracelulares e tumores. Em contraste, as várias formas de macrófagos M2 possuem um fenótipo de baixa excreção de IL-12 e IL-23, enquanto que alta excreção de IL-10, e possuem uma variável capacidade de produzir citocinas inflamatórias, dependendo do sinal utilizado para ativação (SHBATA, *et al.*, 1991).

Embora a adição de citocinas e fatores estimulantes sejam necessários para a diferenciação de monócitos, tanto para células dendríticas (DC) como para macrófagos, medicamentos homeopáticos complexos têm-se mostrado eficientes na diferenciação *in vitro* para macrófagos, como reporta estudo recente (EUREKE *et al.*, 2008). Essa diferenciação é interessante, pois demonstra que a homeopatia tem potencial efeito sobre monócitos funcionando como um fator estimulante à sua diferenciação. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre como medicamentos homeopáticos podem induzir tal diferenciação em monócitos e quais seriam as conseqüências, tanto quanto qual o fenótipo adquirido pelos macrófagos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

COMPLEXO HOMEOPÁTICO *Calcareo carbonica* E ASSOCIAÇÕES (M8)

O M8 é um complexo produzido a partir de *Calcareo carbônica* e associações, altamente diluído, que segue a farmacotécnica homeopática de Hahnemann durante sua produção. As tinturas-mães foram adquiridas de agências autorizadas pelo Ministério da Saúde, Brasil. Essas agências asseguram a qualidade (livre de endotoxinas) e a composição físico-química de seus produtos. A partir da tintura-mãe, um extrato em solução de etanol, são realizadas várias diluições em água destilada, sempre seguidas de várias succussões (termo comum aos homeopatas que se refere a misturar vigorosamente), processo denominado de dinamização. Diferentes complexos foram produzidos e o que recebeu o nome código de M8 consiste numa matriz complexa obtida da *Calcareo carbonica* CH5 com associações de outros produtos. A solução aquosa possui um teor alcoólico inferior a 1% e a solução final foi mantida a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, sendo agitada vigorosamente (succussionada) imediatamente antes do uso.

ANIMAIS

Todas as exigências da Legislação Nacional Brasileira (nº 6.638.058 Nov. 1979) para o uso de animais foram satisfeitas. Também, o Comitê de Ética para Experimentação Animal – SCB -UFPR aprovou todas as práticas usadas nesse

estudo. Camundongos *Mus musculus* com 2-3 meses de idade e pesando entre 30-35 g, receberam uma dieta alimentar padrão de laboratório e água *ad libitum*.

EXPERIMENTO *IN VIVO*

Três grupos, constituídos de 10 animais cada, foram examinados, especificamente: (1) grupo tratado com água (controle); (2) grupo tratado com a solução hidroalcoólica sucussionada (HS); e (3) grupo tratado com M8. Todos os tratamentos foram administrados na água de beber dos camundongos por um período de sete dias. A cada 24 horas o medicamento foi sucussionado novamente, e a cada 48 horas foi substituído por um novo. Após o período de tratamento, os animais foram divididos em triplicatas e eutanasiados; então coletou-se o sangue periférico em tubos contendo heparina para os estudos de imunofenotipagem e extensão sanguínea. Os resultados foram avaliados de forma duplo-cega para então a tabulação dos dados na análise estatística.

Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

50µl de sangue foram marcados para os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluoróforos, para a leitura em um citômetro de fluxo: anti-CD8 (PE), anti- anti-CD4 (PE), anti-DX5(PanNK) (PE), anti-CD19 (PE) e por fim anti-CD45 (FITC) com anti-CD11b (PE). Após, as hemáceas foram lisadas com solução hemolítica Pharmlise® e as amostras foram analisadas em um citômetro BD® FACSCalibur, com um total de 10.000 eventos por amostra contados.

Extensão sanguínea

Para a extensão sanguínea, uma gota do sangue periférico foi posta em uma lâmina de vidro para microscopia de luz. Então, procedeu-se segundo as recomendações do kit Instant Prov-Corante Rap.Hemat (NewProv®). As lâminas foram analisadas por microscopia de luz, com a objetiva de 100x, para discriminar e contar o número de neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

EXPERIMENTO *IN VITRO*

A cavidade intraperitoneal de camundongos foi lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, para a coleta de macrófagos peritoneais. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer, plaqueadas, e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 15 min. Então, células não aderentes foram removidas e as células aderentes foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂, em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1 U/ml de penicilina e 1 µg/ml de streptomycina. Após 2 horas, nos grupos HS e M8 adicionou-se 20% dos mesmos nos respectivos grupos para completar o volume final da solução de cultura. Então, as células foram cultivadas por 48 horas, recebendo uma dose reforço de 1% nas primeiras 24 horas. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após as 48 horas os macrófagos cultivados foram processados conforme protocolo específico.

Marcação com vermelho neutro

Vermelho neutro é um corante vital que se acumula em vesículas ácidas nas células. Apresenta a coloração vermelha em pH < 7,0. A cultura foi incubada com vermelho neutro (10ug/ml) por 30 min. Então, as células foram lavadas com PBS e uma solução de extração etílica foi adicionada para solubilizar o vermelho neutro. A leitura da absorbância foi feita em 550nm em um leitor de microplacas. Para análise em microscopia de luz, as lâminas foram montadas sobre duas colunas de Parafilm® (LOPES et al., 2006), conforme o esquema abaixo.

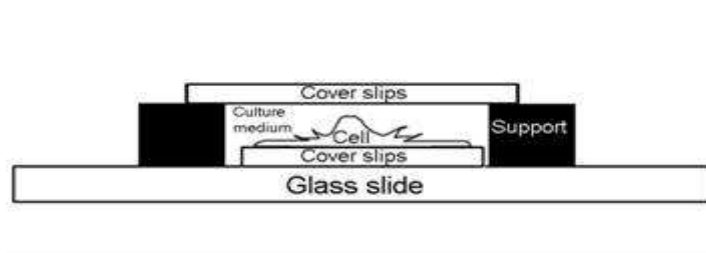


Figura 1: Representação do aparato para utilizado para visualização da marcação de vesículas ácidas pó vermelho neutro em macrófagos aderidos. Fonte: Lopes et al., 2006).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram feitos em triplicata, avaliação duplo-cega, contendo os grupos: controle, HS e M8. Para teste estatístico foi utilizado o ANOVA one way com pós-teste de Tukey, $P < 0,05$. Para isso, foi utilizado o software Graphpad® Prism.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPERIMENTO *IN VIVO*:

EXTENSÃO SANGUÍNEA E IMUNOFENOTIPAGEM EM CITOMETRIA DE FLUXO

Pela contagem da extensão sanguínea não se detectou diferenças significativas entre no número de basófilos, eosinófilos e neutrófilos (Figura 4). Na imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico, também não se encontrou diferença na expressão dos marcadores utilizados (Figura 2), com exceção do Anti-CD45 (Figura 3), que foi reduzida. Esse último é um antígeno leucocitário comum e sua marcação é evidente em todos os leucócitos sanguíneos.

O tratamento com M8 reduziu a quantidade de células marcadas com CD45. Sendo assim, o sangue periférico de camundongos tratados com M8 apresentou uma quantidade significativamente menor de Leucócitos. Entretanto, essa diferença não foi encontrada através dos grupos celulares marcados para citometria de fluxo e nem com a extensão sanguínea, onde também não foram encontradas diferenças estatísticas relevantes entre os números de basófilos, eosinófilos e neutrófilos. Como a diferença estatística da marcação com CD45 é pequena, decimal, embora estatisticamente relevante, e os níveis de monócitos e linfócitos permaneceram constantes, pode ser necessário um ensaio mais sensível, como, por exemplo, imunofenotipagem por citometria de fluxo dos granulócitos, dada a ausência de marcação nesse estudo, através de um marcador específico para cada um dos três: Neutrófilos, Basófilos e Eosinófilos.

Tipo Celular:	Anticorpo:
Leucócitos	Anti-CD45
Monócitos	Anti-CD11b
Linfócitos T auxiliares	Anti-CD3 + Anti-CD4
Linfócitos T citotóxicos	Anti-CD3 + Anti-CD8
Linfócitos B	Anti-CD19
Linfócitos NK	Anti-DX-5 – Anti-CD3

Figura 2: Marcadores utilizados para imunofenotipagem por citometria de fluxo dos diferentes leucócitos sanguíneos.

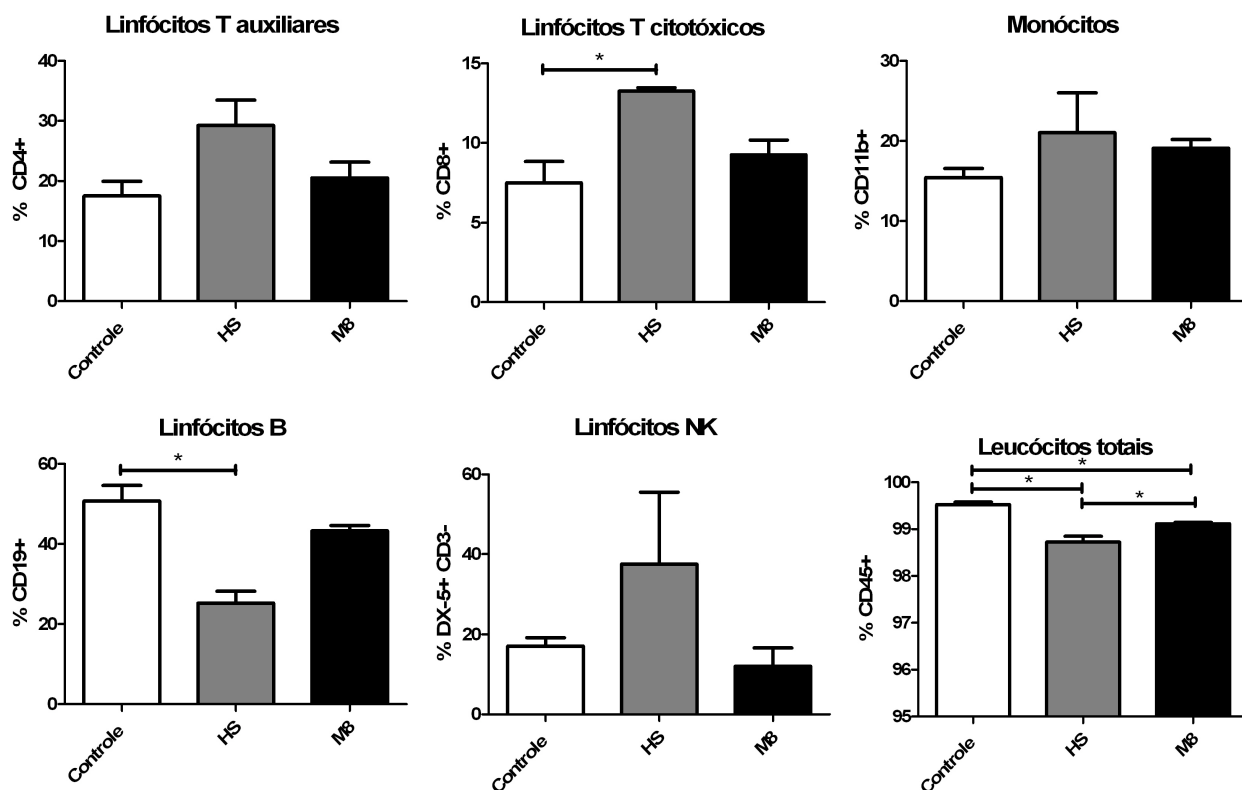


Figura 3: Imunofenotipagem por citometria de fluxo dos leucócitos do sangue periférico. Somente a marcação para o CD45 foi significativamente menor para o M8. *P < 0,05. As demais não foram estatisticamente relevantes. Para a realização do ensaio, o sangue periférico de camundongos tratados *in vivo* com M8 foi coletado e procedeu-se ao protocolo descrito em materiais e métodos.

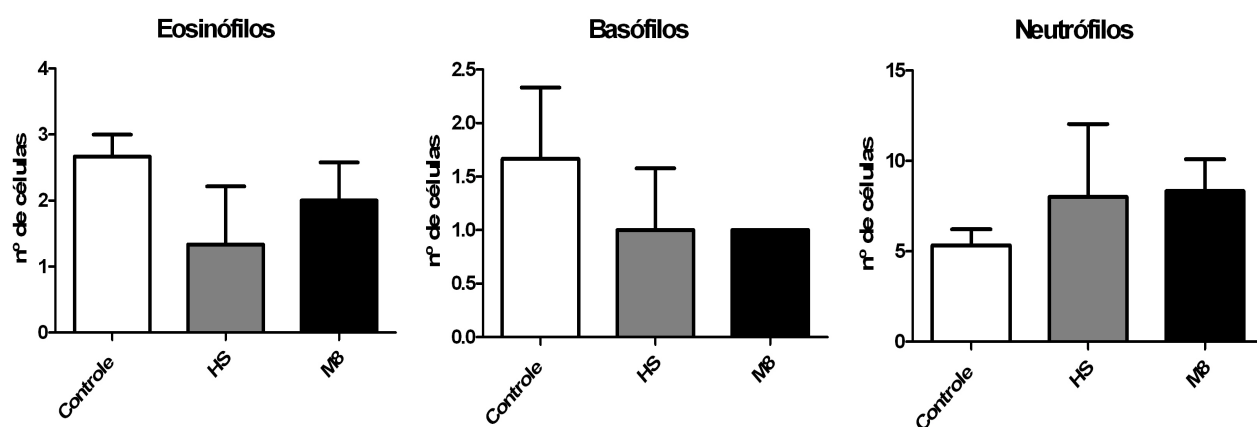


Figura 4: Contagem de Basófilos, Eosinófilos e Neutrófilos por extensão sanguínea. Não houve relevância estatística entre os grupos. *P<0,05. Para a realização do

ensaio, o sangue periférico de camundongos tratados *in vivo* com M8 foi coletado e procedeu-se ao protocolo descrito em materiais e métodos.

EXPERIMENTO IN VITRO:

MARCAÇÃO DE VESÍCULAS ÁCIDAS COM VERMELHO NEUTRO

O nível de marcação do vermelho neutro pode ser relacionado com a quantidade de vesículas ácidas nos macrófagos. Tanto por absorvância quanto por microscopia de luz, não houve diferenças estatísticas relevantes entre os grupos analisados (Figura 5).

O Vermelho Neutro é um corante vital que se acumula nas vesículas ácidas das células. Em $\text{pH} < 7$, ele apresenta a coloração vermelha. Como os lisossomos possuem pH ácido ($\sim 4,8$), eles são corados por vermelho neutro. O M8 não aumentou a marcação de vermelho neutro pelos macrófagos, o que implica em afirmar que não há diferenças na quantidade de lisossomos dos macrófagos, nos diferentes grupos.

Uma vez que macrófagos ativados possuem uma alta taxa de fagocitose e digestão, a análise da quantidade de lisossomos pode ser usada como parâmetro para avaliar sua ativação. Os lisossomos são vesículas com pH ácido, sendo rica em hidrolases ácidas, como proteases, fosfatase, nucleases e lipases. Essas enzimas são importantes para a digestão das partículas que foram fagocitadas. Portanto, a produção de vesículas ácidas está intimamente relacionada com a ativação de macrófagos, uma vez que a fagocitose é uma das principais funções desempenhadas por essas células.

Como os macrófagos que foram tratados com M8 não aumentaram a produção de vesículas ácidas, pode-se supor que o tratamento não efetiva a ativação dos macrófagos. Em uma alusão ao fenótipo M1 e M2, relacionado com o papel dos macrófagos nas respostas imunes Th1 e Th2 respectivamente, a ativação a que as vesículas ácidas podem se relacionar é a M1. Essa é a que efetiva a fagocitose dos macrófagos, assim como a produção de moléculas importantes para a digestão celular. Os lisossomos, que são vesículas ácidas, estão intimamente relacionados á digestão intracelular e, por conseqüência, a ativação M1 dos macrófagos.

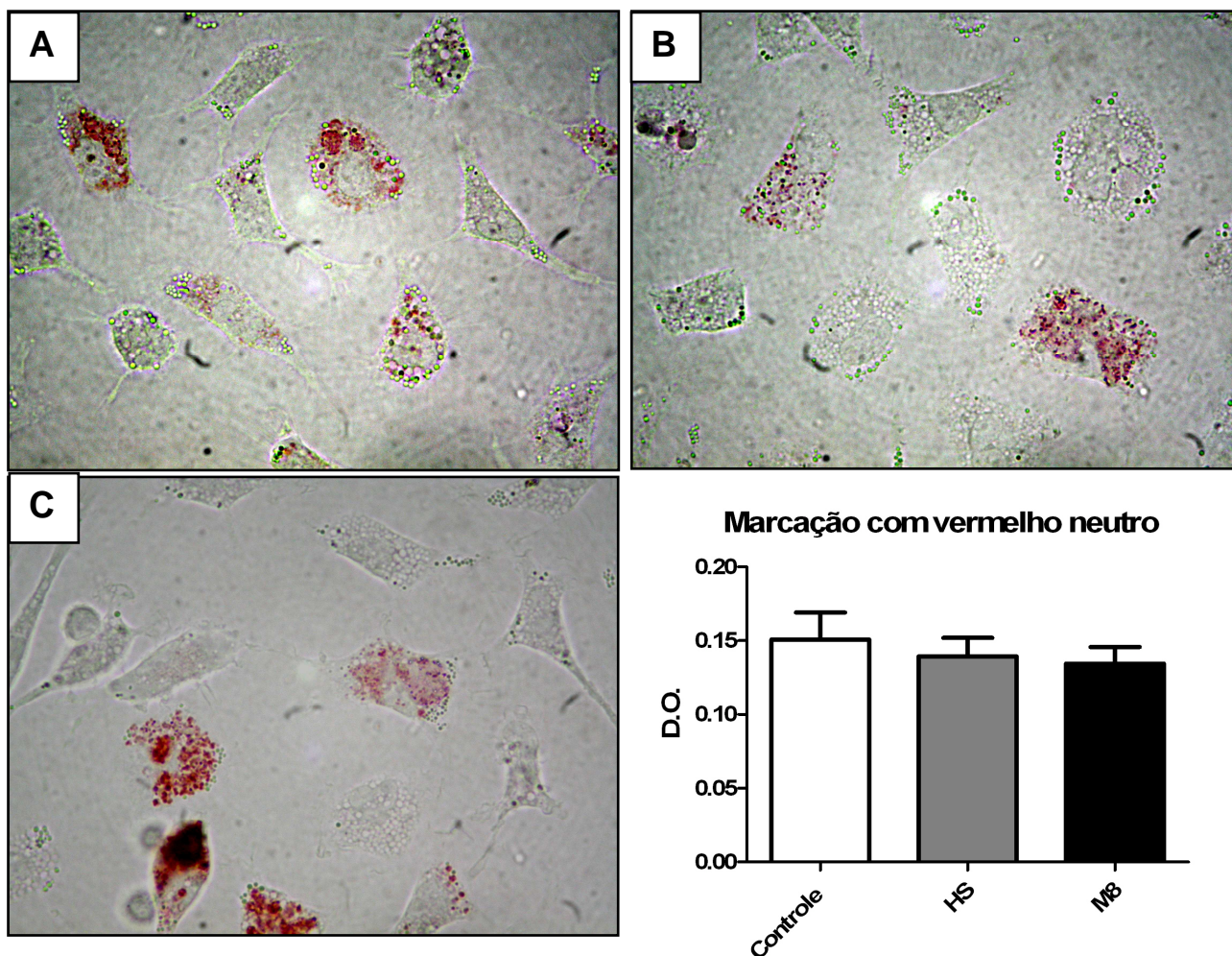


FIGURA 5: Ensaio de endocitose de vermelho neutro por macrófagos. Imagens por microscopia de luz. Gráfico por leitura da absorvância em 550nm. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos, com $P < 0,05$. (A) Controle; (B) HS; (C) M8.

6. CONCLUSÃO

Estudos prévios utilizando o M8 demonstram um aumento na resposta do sistema imune após tratamento, tanto Th1 quanto Th2. Entretanto, resultados aqui apresentados não mostram novas informação sobre os mecanismos de ação do tratamento com Med 8. Ainda assim, podemos concluir que em camundongos saudáveis não existem efeitos colaterais no sangue periférico e nas vesículas ácidas de macrófagos. Também concluimos que mais estudos sobre *Calcareo carbônica* e associações são necessários.

7. REFERÊNCIAS

- ABUD A.P.R.; CESAR B.; CAVAZZANI L.F.M.; de OLIVEIRA C.C.; GABARDO J.; BUCHI D.F.. Activation of bone marrow cells treated with Canova in vitro. *Cell Biol. Int.* 30 (10), 2006.
- ALBERTO MANTOVANI; ANTONIO SICA; MASSIMO LOCATI. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 37, 2007.
- ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Metabolism in lymphocytes and its importance in the immune response. *Essays in Biochemistry* 21, 1985.
- CESAR B.; ABUD A.P.R.; OLIVEIRA C.C.; CARDOSO F.; GREMSKI W.; GABARDO J.; BUCHI D.F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated in vitro with a complex homeopathic medication. *Micron* 39, 2008.
- COLLINS, P.D. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. *Journal of Immunological Methods* 243, 2000.
- COSTELO, R. T.; FAURIAT, C; SIVORI, S.; MARCENARO, E.; OLIVE, D. NK Cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends in Immunology* 25, 2004.
- DANTAS, F. Avaliação da efetividade da homeopatia: uma proposta para a realidade brasileira. Relatório de pós-doutoramento ao CNPQ. Londres: The Royal Homoeopathic Hospital NHS Trust, 1994.
- de OLIVEIRA, C. C.; de OLIVEIRA, S. M.; GOES, V. M.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; BUCHI, D. F. Gene Expression Profiling of Macrophages Following Mice Treatment With an Immunomodulator Medication. *J. Cellular Biochemistry*, DOI 10.1002/jcb.21713, 2008.
- FRAZER, J.K.; CAPRA, J.D. Immunoglobulins: structure and function. In: PAUL, W. (ed) *Fundamental immunology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 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, 1988.

GREENBERG, P.D. Mechanisms of tumor immunology. In: STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G. Basic & clinical immunology. 8. ed. London: Printice-Hall International Inc., 1994.

KROP, I.; SHAFFER, A.L.; FEARON, D.T.; SCHISSELL, M.S. The signaling activity of murine CD19 is regulated during B cell development. *J. Immunol.* 157, 1996.

LOPES L.; GODOY L.M.F.; OLIVEIRA C.C.; GABARDO J.; SCHADECK R.J.G.; BUCHI D.F. Phagocytosis, endosomal/lisosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. *Micron* 37, 2006.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology* 15, 2005.

MORRISSETE, N.; GOLD, E.; ADEREM, A. The macrophage – a cell for all sensations. *Trends in Cell Biology* 9, 1999.

PEREIRA W.K.V.; LONARDONI M.V.C.; GRESPAN R.; CAPARROZ-ASSEF S.M.; CUMAN R.K.N.; BERSANI-AMADO C.A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *J. Infect.* 51 (2), 2005.

PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-12, IFN-g and TNF-alpha production, $\alpha 5 \beta 1$ integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 33 (4), 2002.

PONTZER, C.H., & RUSSEL, S.W. Interferons exhibit temporally distinct regulation of two bovine macrophage Fc receptors. *J. Leuc. Biol.* 47, 1990.

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* 94 (1), 2005.

SCHERIBER, H. Tumor immunology. In: PAUL, W. Fundamental immunology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

SELIGMANN I.C.; LIMA P.D.; CARDOSO P.C.; KHAYAT A.S.; BAHIA M.O.; BUCHI D.F.; CABRAL I.R.; BURBANO R.R. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. *Genet. Mol. Res.* 2 (2), 2003.

SHBATA, Y.; ABIKO, Y.; TAKIGUSHI, H. Macrophage membrane: structure and function. *Blood Cell Biochemistry* 2 , 1991.

SIAMON GORDON; PHILIP R. TAYLOR. Monocyte and Macrophage heterogeneity. *Nature Reviews, Immunology*, DOI 10.1038/nri1733, 2005.



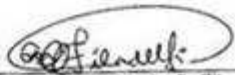
SILVA, M.H.C.; QUELUZ, T.H.A.T. Macrófagos pulmonares. *Journal Pneunology*, v. 22, n.1, 1996.

SMIT EUREKE; PRETORIUS ETHERESIA; ANDERSON RONALD; OOMMEN JOYCE; POTJO MOLIEHI. Differentiation of Human Monocytes in Vitro Following Exposure to Canova in the Absence of Cytokines. *Ultrastructural Pathology* 32, 2008.

TAKAHACHI G., MALUF M.L.F., SVIDZINSKI, DALALIO M.M.O., BERSANI-AMADO C.A., CUMAN R.K.N. In vivo and in vitro effects of the Canova medicine on experimental infection with *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. *Indian J. Pharmacol.* 38 (5), 2006.

8. ANEXO

CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA

	<p>Ministério da Educação UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Setor de Ciências Biológicas Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)</p>	
		<p>Nº 302</p>
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, 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 em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
CERTIFICATION		
<p>The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
PROCESSO:	23075.009225/2008-19	APROVADO:
		25/03/2008 – R.E. 01/2008
TÍTULO:	Pesquisa em células inflamatórias utilizando o medicamento homeopático Canova: um estudo da interação entre macrófagos e linfócitos em co-cultura	
AUTORES:	Dorly de Freitas Buchi, Edvaldo da Silva Trindade, Fernando de Souza Fonseca Guimarães, Eric Felipe Yugi Maruyama, Lucas Ferrari de Andrade, Ediely de Oliveira Coletto	
DEPARTAMENTO:	Biologia Celular	
	 Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi Coordenadora do CEEA	