

**CAROLINA CAMARGO DE OLIVEIRA**

**DETEÇÃO DE PRODUTOS REATIVOS INTERMEDIÁRIOS  
DE OXIGÊNIO EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM O  
MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO MÉTODO CANOVA®**

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  
2002**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me deram a vida, que possibilitaram os meus estudos e que sempre estiveram por perto quando precisei.

À minha avó Ana por estar sempre cuidando de mim.

Ao meu amor Rodrigo, por estar do meu lado, me amar e tentar me aceitar do jeito que sou.

À Profª Drª Dorly de Freitas Buchi pela orientação e conselhos dentro fora da área profissional. Por seu carinho, compreensão (sempre que possível) e por aceitar, sem relutar, em ter uma orientada “patricinha”.

Ao Canova do Brasil pelo apoio financeiro, pela doação dos medicamentos e por confiarem a nós uma parte tão importante, a credibilidade e comprovação científica.

Às minhas amigas Ana, Fer, Ma e especialmente a Lu, pela amizade verdadeira, por todos os bons momentos em que estivemos juntos e pelos maus também, pois com eles nós aprendemos (eu espero) e crescemos como pessoas.

Aos meus colegas de laboratório Lyris, Darcy, Raquel, Sabrina, Fernando, Raffaello, Samuel, Fabiano e Simone, por tornarem os dias de trabalho mais proveitosos somente pelo fato de estarem presentes, além de toda a ajuda que me deram. À Eliane por sua ajuda técnica. Especialmente à Mari pela sua amizade, ajuda e ensinamentos a qualquer hora que eu precisasse (até mesmo durante o carnaval).

Às minhas sempre amigas Karim, Patty, Lia, Luciana e Minisa por compartilharmos alegrias e tristezas.

Ao laboratório Marcus Henrietti, por permitir a utilização do leitor de ELISA, especialmente à Mara por dispor de seu tempo e boa vontade para me auxiliar na utilização desse equipamento.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, especialmente a Matilde, Regina, Daura e Rosi por toda a ajuda prestada.

À Ana pelo protocolo da produção de peróxido de hidrogênio e pela ajuda durante a execução de alguns experimentos.

À MSc Patrícia Stuelp-Campelo por sanar minhas dúvidas sobre o protocolo da produção de peróxido de hidrogênio.

À Profª Drª Maria Angélica Haddad por acreditar em meu potencial, iniciando-me na pesquisa científica e por seu carinho e amizade durante todos esses anos.

Ao Prof Dr Sílvio Sanches Veiga, por permitir o uso de seu laboratório e equipamentos.

À Profª Drª Maria Benigna M. de Oliveira por permitir o uso de seus equipamentos sempre que necessário.

Ao pessoal do biotério Cândido, Dª Tereza, Ezequiel, Luís e demais funcionários por todo o apoio técnico.

Ao PIBIC/CNPq pela bolsa de estudos concedida durante o período da realização de minha iniciação científica.

Aos camundongos por darem a suas vidas pelo “bem da ciência”.

Por último, mas não menos importante, à minha dog, Beta, pela lealdade, por me alegar sempre que estou triste e compreender minha ausência estando sempre feliz ao me ver.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	v
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Sistema imune	1
1.2 Macrófagos	3
1.3 O tratamento homeopático	9
1.4 Método Canova®	12
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	14
<b>3 OBJETIVOS</b>	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	16
4.1 Detecção da atividade enzimática da NAD(P)H oxidase	16
4.1.1 Coleta	16
4.1.2 Plaqueamento	16
4.1.3 Incubação da NAD(P)H oxidase (com cloreto de cério)	17
4.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão	18
4.2 Produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	19
4.2.1 Tratamento	19
4.2.2 Coleta	19
4.2.3 Plaqueamento	20
4.2.4 Dosagem de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20
4.2.5 Curva de concentração padrão de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21
4.2.6 Análise estatística	22
<b>5 RESULTADOS</b>	23
5.1 Atividade enzimática da NAD(P)H oxidase	23
5.2 Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25
5.2.1 Curva de concentração padrão de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25
5.2.2 Dosagem de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e análise estatística	26
<b>6 DISCUSSÃO</b>	29

<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>32</b>

## RESUMO

O organismo humano é constantemente ameaçado pela invasão de vários tipos de microrganismos. Para combater essas infecções foi desenvolvido um sistema imune dedicado especificamente a eliminar qualquer invasor. Macrófagos são células do sistema imune que possuem várias funções, incluindo a fagocitose através da qual um invasor é ingerido, morto e digerido. Depois de englobados, a maioria dos microrganismos é morta rapidamente utilizando moléculas tóxicas, algumas derivadas de oxigênio e outras não. Para isso o oxigênio molecular é reduzido a anion superóxido ( $O_2^-$ ), via NAD(P)H oxidase. O  $O_2^-$  pode ser convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou, antes disso, se combinar com óxido nítrico formando nitrato. Experimentos anteriores em nosso laboratório comprovaram que macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova<sup>®</sup> apresentam-se ativados. Visando detectar a atividade da enzima NAD(P)H oxidase através de marcações eletrondensas, foi realizado experimento *in vitro*, onde macrófagos peritoneais de camundongos foram cultivados durante 48 horas. No grupo tratado foram adicionados 10% de Método Canova<sup>®</sup> após duas horas de cultivo em estufa à 37°C 5%  $CO_2$  e após 24 horas mais 1%. Seguiu-se então o protocolo para NAD(P)H oxidase. Após a incubação as células foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão, ultramicrotomadas e observadas sem contrastação no Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1200 EXII do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. A mensuração da produção de  $H_2O_2$  baseia-se na oxidação dependente de peroxidase do vermelho de fenol pela  $H_2O_2$ . Os animais utilizados para esses ensaios foram tratados *in vivo* durante sete dias, com doses subcutâneas de 0,2 ml de cada substância testada. A produção do reativo intermediário de oxigênio por macrófagos tratados com o Método Canova<sup>®</sup> foi determinada segundo o método descrito por PICK & MIZEL (1981). A leitura da produção foi feita em leitor de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA: fator duplo sem repetição) e do teste de Tukey. As células tratadas mostraram reação eletrondensa positiva mais intensa para a enzima NAD(P)H oxidase quando comparadas com as do grupo controle. No grupo controle da enzima não foi observado marcação, confirmando a especificidade dessa. Os macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova<sup>®</sup> não sofreram alterações estatisticamente significativas na produção de  $H_2O_2$  nos tempo analisados, na ausência de moléculas patógenas.

Palavras-chave: Método Canova<sup>®</sup>, macrófagos, NAD(P)H oxidase,  $H_2O_2$ .

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Sistema imune

O organismo humano é constantemente ameaçado pela possível invasão de vários tipos de microrganismos como bactérias, vírus e parasitas, os quais quando violam a integridade do corpo podem prejudicar o delicado balanço interior. Para combater essas infecções, durante o processo evolutivo um sistema imune altamente sofisticado foi desenvolvido, sendo esse dedicado especificamente a eliminar qualquer invasor, também denominados antígenos (MARSH & KENDALL, 1996).

O sistema imune é composto por diferentes tipos celulares e uma grande variedade de moléculas, os quais encontram-se espalhados pelo corpo (WOOD & AUSTYN, 1993). A resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é denominada resposta imune (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2000). Quando alguma barreira do nosso corpo é violada, o sistema imune é ativado e a resposta imune resultante geralmente leva a destruição e remoção do organismo estranho (WOOD & AUSTYN, 1993). Para o sistema trabalhar corretamente três componentes são essenciais:

- sistema de reconhecimento, para identificar a presença de um corpo estranho. Esse reconhecimento ocorre em nível molecular através de várias moléculas de reconhecimento;
- sistema de remoção/eliminação, para matar ou eliminar a ameaça. Esse sistema ocorre em nível molecular e celular;
- sistema de comunicação, para coordenar as atividades de vários elementos, tanto de reconhecimento quanto de remoção/eliminação (PLAYFIR, 1995).

O sistema imune pode responder a uma imensa variedade de organismos diferentes e uma enorme diversidade de respostas imunes é possível (WOOD & AUSTYN, 1993). De uma maneira mais ampla, os diferentes tipos de resposta imune enquadram-se em duas categorias: respostas inatas (ou não adaptativas) e respostas imunes específicas (adaptativas ou adquiridas) (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1999).

A inata possui capacidade de distinção limitada, respondendo de maneira semelhante a qualquer agente. É responsável pela defesa inicial tendo papel importante na indução das respostas específicas. A imunidade específica possui alta especificidade para distintas moléculas além da memória imunológica, o sistema imune adquirido “lembra” de cada encontro com um micróbio ou antígeno estranho, de modo que os encontros subseqüentes estimulam mecanismos de defesa crescentemente eficazes. Linfócitos e os anticorpos são seus componentes principais. Esse tipo facilita os mecanismos protetores da inata, tornado-a mais eficaz além de acrescentar um alto grau de especialização aos relativamente estereotipados mecanismos da inata. As interações entre as imunidades são bidirecionais. Dentre as células do sistema imune estão os linfócitos, que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos, as barreiras físicas e químicas (pele, epitélio mucoso, antimicrobianos químicos, etc), as proteínas sanguíneas (complemento), os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) além das células Natural Killer. A organização anatômica e a capacidade de intercambiar com o sangue, linfa e tecidos são muito importantes para a geração da resposta imune (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2000).

Evidencialmente, os dois tipos de respostas são complementares. Como resultado da ação das células envolvidas na primeira linha de defesa (local da resposta inflamatória) os produtos da quebra dos antígenos invasores são levados por uma célula apresentadora de antígenos (APC), através do sistema linfático aferente, ao linfonodo mais próximo. Nesse, linfócitos T ou B que migraram para o linfonodo interagem com o antígeno apresentado, originando moléculas efetoras como os anticorpos e células efetoras como células T citotóxicas. Através do sistema linfático eferente essas células e moléculas alcançam a circulação sistêmica de onde elas podem extravasar até o local da infecção para eliminar efetivamente a fonte da infecção (MARSH & KENDALL, 1996). Em outro tipo de interação, alguns fagócitos podem capturar antígenos e apresentá-los aos linfócitos T, que por sua vez liberam fatores solúveis (citocinas) que ativam os fagócitos, e estes então destroem os patógenos capturados (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1999).

A imunidade possui três propriedades fundamentais:

- especificidade – as porções que são reconhecidas especificamente são chamadas determinantes ou epitopos. Receptores de membrana são expressos por linfócitos ao responderem aos antígenos, sendo assim, esses receptores são capazes de distinguir até mesmo as diferenças mais sutis dos antígenos;

- diversificação – os linfócitos são capazes de reconhecer diversos antígenos, e essa capacidade é denominada repertório linfocitário, são estimados que pelo menos  $10^9$  determinantes antigênicos distintos são reconhecidos pelo sistema imune de mamíferos;

- memória – subseqüentes exposições a um determinado antígeno intensifica a capacidade de resposta do sistema imune, ou seja, as respostas imunes secundárias são mais rápidas e maiores.

## 1.2 Macrófagos

O macrófago foi descrito por Metchnikoff (1905) no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir de estudos de MacKanness et al. (1970), no início dos anos 70, a atividade secretora dessa célula adquiriu importância (ASCHOFF, 1924 *apud* SAMPAIO, 2000). 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).

São originados de monócitos provindos da medula óssea (STITES & TERR, 1992) de células tronco hematopoiéticas pluripotentes, as quais são capazes de produzir diferentes células em resposta a uma variedade de sinais incluindo citocinas e fatores de crescimento. Os precursores dos macrófagos são liberados na circulação como monócitos sanguíneos. Essas células imaturas irão adquirir características de macrófagos assim que emigrarem da circulação para os tecidos. São conhecidos por influenciar na atividade celular e homeostase em vários tecidos; providenciar uma linha frontal de defesa contra antígenos invasores e células tumorais recém-formadas; e por servirem de células apresentadoras de antígenos para o reconhecimento inicial e remoção de células senescentes (MARSH &

KENDALL, 1996). Suas principais funções são neutralização, englobamento e distribuição de partículas (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1999).

Os fagócitos são importantes na interação bidirecional das respostas imune inata e específica. A inata inicia e regula a específica, sendo que a específica aumenta os mecanismos de defesa da inata. Os macrófagos apresentam funções nas fases de reconhecimento, ativação e efetora da imunidade específica. Entre essas se encontra a de célula apresentadora de antígenos. As células fagocitárias apresentam antígenos em sua superfície que são reconhecidos pelos linfócitos T específicos; produzem citocinas que são capazes de estimular linfócitos T a se proliferarem e diferenciarem-se. São também importantes células efetoras da imunidade celular além de eliminarem antígenos estranhos pela resposta imune humoral. Na imunidade inata, suas funções incluem a produção de citocinas, responsáveis por alguns efeitos sistêmicos da inflamação, produzem fatores de crescimento para fibroblastos e endotélio vasculares, promovem reparo de tecidos lesados e a fagocitose de partículas estranhas. Além disso, secretam enzimas (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2000).

A idéia de que os macrófagos são importantes na resposta imune foi reforçada nos anos 70 quando o MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) foi reconhecido em células T, pois foi descoberto que macrófagos apresentavam moléculas do MHC classe II, que são necessárias para o reconhecimento de antígenos pela célula T. Mais tarde, descobriu-se que macrófagos podiam produzir moléculas solúveis ou citocinas, chamadas de “fator de ativação de linfócito”, conhecidas agora por interleucina-1 (IL-1), as quais podem levar a proliferação linfocitária, em parte pela estimulação de outra citocina, a IL-2, de ativação de células T (WOOD & AUSTYN, 1993).

Em resposta a estímulos provenientes de algum microorganismo ou de linfócitos ativados, os macrófagos modificam 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-REDDY & GANGADHARAM, 1992). Uma notável consequência da ativação de macrófagos é o grande aumento da expressão de moléculas de classe II do MHC pelas células. Isto presumivelmente potencializa sua interação com células T helper ativadas durante a

resposta imune adaptativa (WOOD & AUSTYN, 1993).

A fagocitose é um processo complexo contendo várias etapas através das quais uma partícula é ingerida, morta e digerida. Uma vez englobados a maioria dos microrganismos são mortos rapidamente (PLAYFAIR, 1995). Talvez a principal função dos macrófagos ativados seja a grande capacidade de matar microrganismos e algumas células tumorais. Isso pode ocorrer através de mecanismos oxigênio ou nitrogênio dependentes, nos quais reativos intermediários de oxigênio (ROIs) e de nitrogênio (RNI) são produzidos. Os produtos de oxigênio produzidos pelos macrófagos incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o anion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) (WOOD & AUSTYN, 1993). A resposta da “explosão respiratória” originalmente associada somente com a fagocitose é hoje conhecida também por ser estimulada pelo sistema complemento e por imunoglobulinas durante o simples contato com partículas ou com superfícies grandemente opsonizadas, independentes da fagocitose (NYGREN et al., 2001). Um dos reativos intermediários de nitrogênio produzido por macrófagos ativados é o óxido nítrico (NO), que pode também ser produzido por outros tipos celulares e é importante em outros sistemas do corpo. O NO usado em respostas citotóxicas de macrófagos ativados é gerado por uma rota, provavelmente induzida por uma citocina. Esse RNI é um importante efetor molecular que leva a destruição de certos microorganismos e células neoplásicas pela ativação de macrófagos, pelo menos em camundongos (WOOD & AUSTYN, 1993).

Quando os macrófagos participam da resposta imunológica tem sua capacidade de secretar ROIs aumentada. Isso é em parte regulado pelo interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Análises cinéticas sugeriram que o aumento da capacidade de geração de ROIs de macrófagos ativados, comparados com macrófagos residentes, pode ser atribuído ao aumento da afinidade da sua oxidase por NAD(P)H. Dois aspectos da “explosão respiratória” de macrófagos têm interesse particular para estudar sua base enzimática. Primeiro, como mencionado anteriormente, essa via pode ser importante no potencial antitumoral, antimicrobial e antiinflamatório. Segundo, a “explosão respiratória” de macrófagos é altamente sensível à regulação. O IFN- $\gamma$ , um produto de linfócitos T, aumenta a capacidade secretora em macrófagos humanos e murinos,

enquanto que o produto de células tumorais tem efeito contrário (TSUNAWAKI & NATHAN, 1984).

Recentemente, os reativos intermediários de oxigênio derivados de fagócitos têm recebido crescente reconhecimento por seu papel na defesa do hospedeiro e na injúria tecidual. Os metabólitos de oxigênio, especialmente o  $O_2^-$  e os produtos de reação dessa molécula, tem um papel importante na morte intra e extracelular de microrganismos e podem ainda servir como mediadores do sistema imune e moduladores de atividades celulares como adesão celular, fagocitose e tradução de sinais. Muitos aspectos dos processos inflamatórios parecem ser mediados por oxidantes liberados por fagócitos, através de sua capacidade de causar a produção de citocinas (NYGREN et al., 2001).

A molécula de NO pode também reagir com os ROIs. Por exemplo, pode reagir com o superóxido ( $O_2^-$ ) resultando na sua neutralização com a formação de nitrito ( $NO_3^-$ ), porém em meios ácidos, como em lisossomos, é formado o peroxinitrito, o qual por sua vez produz o radical hidroxila (OH $\cdot$ ). A rota de geração de NO pode também ser encontrada em outras células, assim como em hepatócitos, em fibroblastos e células endoteliais quando a óxido nítrico sintetase é mobilizada em resposta a certos organismos. Isso mostra a importância dos RNI para a atividade citotóxica de outros tipos celulares em adição aos macrófagos (WOOD & AUSTYN, 1993).

O  $H_2O_2$  tem muitas funções no corpo, incluindo a de molécula de sinalização, intermediário no metabolismo, agente citotóxico na defesa do hospedeiro e na patologia. O peróxido pode ser produzido direta ou indiretamente, depois da dismutação do superóxido, pela NAD(P)H oxidase da membrana plasmática ativada fisiologicamente por fatores de crescimento; pela NAD(P)H oxidase da membrana plasmática ativada na fagocitose por fatores quimiotáticos a produzir a “explosão respiratória”; por várias oxidases metabólicas, a maioria localizada em peroxissomas e ainda na cadeia respiratória mitocondrial (BORUTAITE & BROWN, 2001). Em macrófagos, a transcrição do fator NF- $\kappa$ B pode ser ativada pela geração de  $H_2O_2$  através da “explosão respiratória”. O mecanismo pode ser uma reação de redução transmembrana plasmática. A transcrição do fator NF- $\kappa$ B controla a expressão de

vários genes, particularmente aqueles envolvidos nas respostas inflamatória e imune (NYGREN et al., 2001).

Os ROIs estão envolvidos em apoptose e necrose celular, porém o mecanismo ainda não é claro. Entretanto, embora o  $H_2O_2$  possa induzir a apoptose, existem evidências que ele pode inibir o processo, sendo assim um potencial duplo regulador da apoptose (BORUTAITE & BROWN, 2001).

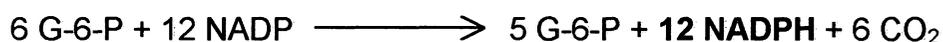
Em neutrófilos, a produção de ROIs pode ocorrer ou na membrana de grânulos intracelulares ou na membrana plasmática, dependendo do estímulo. Em contraste, não ocorre a produção intracelular em macrófagos. Nessas células, a localização da NAD(P)H oxidase é primariamente na fração da membrana plasmática, sugerindo que macrófagos são incapazes de produzir ROIs em fagossomos (NYGREN et al., 2001).

Para a proteção dos macrófagos contra esses produtos tóxicos, os ROIs são estocados em vesículas chamadas lisossomos, as quais podem ser colocadas em contato com vesículas contendo o material ingerido, os fagossomos (PLAYFAIR, 1995).

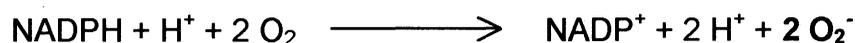
Quando a membrana de uma célula fagocítica é estimulada ocorre a chamada "explosão oxidativa" (PICK & KEISARI, 1980) onde o consumo de oxigênio molecular ( $O_2$ ) pela célula aumenta. Ocorre a produção de NADPH através do desvio da hexose monofosfato utilizando a glicose 6-fosfato, outros intermediários redutores são ativados e vários produtos de oxigênio são produzidos. Nesse caminho encontra-se em atividade uma enzima multicomponente, a NAD(P)H oxidase (WOOD & AUSTYN, 1993). O caminho bioquímico do oxigênio é iniciado pela redução eletrônica do oxigênio a anion superóxido ( $O_2^-$ ), utilizando NADPH ou NADH como doador de elétrons. O superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da superóxido desmutase - SOD (PICK & KEISARI, 1980).

Abaixo, encontram-se algumas reações que produzem intermediários reativos de hidrogênio segundo WOOD & AUSTYN, 1993.

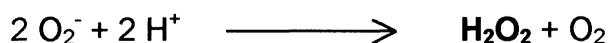
- Hexose monofosfato utiliza glicose 6-fosfato para produzir NADPH



- A enzima NADH oxidase localizada na membrana plasmática catalisa a conversão do oxigênio molecular em anion superóxido



- Duas moléculas de superóxido podem ser transformadas em peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou catalisado pela enzima superóxido desmutase



- Reação do peróxido de hidrogênio com superóxido pode gerar radical hidroxil muito reativo, provavelmente via  $\text{Fe}^{2+}$  catalisada pela reação de Harber-Weiss



A NAD(P)H oxidase é uma cadeia transportadora de elétrons encontrada na membrana plasmática de linfócitos e na parede de vacúolos fagocíticos profissionais. Essa enzima é assim chamada devido à utilização de NAD(P)H como doador de elétrons para reduzir  $\text{O}_2$  em  $\text{O}_2^-$  que é dismutado à  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Essa oxidase está normalmente dormente, mas pode ser rapidamente ativada por vários estímulos. Entre eles estão os agonistas que interagem com receptores específicos na superfície celular de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, como partículas opsonizadas e cadeias de peptídeos imaturas de microrganismos, e também agonistas de proteína quinase C como o PMA (phorbol myristate acetate). Essa enzima consiste minimamente de quatro proteínas todas necessárias para a produção de  $\text{O}_2^-$ . Sua ativação depende da interação de pelo menos quatro proteínas citosólicas diferentes com as proteínas membrana ligantes da cadeia transportadora de elétrons (SEGAL & ABO, 1993).

O mecanismo de transporte de elétrons desse sistema é muito incomum, pois possui um flavocitocromo b – o citocromo C – com duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$  altamente glicosilado). Ele se localiza na membrana plasmática (SEGAL & ABO, 1993). Durante a ativação das células, a NAD(P)H oxidase é ativada depois da fosforilação do citocromo C na presença de alta concentração de cálcio no citoplasma (NYGREN et al., 2001).

Pequenas proteínas citosólicas GTP-ligantes estão envolvidas no processo de indução da atividade da oxidase. Os mecanismos responsáveis pela formação do complexo ativado e o meio através do qual eles induzem o transporte de elétrons ainda precisa ser estabelecido. Sabe-se, porém, que a associação do complexo citosólico com o flavocitocromo induz uma mudança conformacional nesse, favorecendo a ligação do NAD(P)H ou do transporte eletrônico, ao invés da modificação enzimática (SEGAL & ABO, 1993).

### 1.3 O tratamento homeopático

O sistema da homeopatia, a ciência baseada na lei da semelhança, foi criado por Samuel Christian Hahnemann (1755-1843). O termo homeopatia significa “sofrimento semelhante” ou curar semelhante pelo semelhante. *Pathos*, vocábulo grego que corresponde a sofrimento, e *Homoios* que significa semelhante (RUIZ, 1999). Hahnemann desenvolveu essa abordagem no decorrer de um período de cinquenta anos. Era um pensador progressista, um crítico mordaz da medicina da sua 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, o método normal de tratamento (JONAS & JACOBS, 1996).

O poder curativo, segundo Hahnemann, 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).

A homeopatia é um sistema de tratamento que usa substâncias especialmente preparadas e altamente diluídas para colocar em ação os mecanismos de cura do próprio corpo, de forma abrangente. Devido à alta diluição, não apresenta efeitos tóxicos, produzindo pouco ou nenhum efeito colateral. A meta da terapia homeopática é promover e orientar a reação de autocura inata do corpo. Não é o medicamento em si que cura a doença, mas a reação dos mecanismos de cura do corpo ao medicamento que leva à melhora. Um organismo que elimina uma

doença por conta própria tem mais chance de continuar saudável, realmente curando o problema e evitando a recorrência. Esse tipo de tratamento se dá de acordo com a velocidade de reparo natural do próprio corpo, portanto, pode levar mais tempo do que os tratamentos aos quais estamos acostumados. Os tratamentos convencionais são rápidos, mas também afetam as partes saudáveis do corpo, muitas vezes produzindo efeitos colaterais indesejados (JONAS & JACOBS, 1996).

Desde suas origens a homeopatia esteve baseada em quatro pilares: a aplicação do princípio da semelhança (a experimentação patogenética no indivíduo sadio e sensível); o emprego de medicamentos diluídos e dinamizados; o uso de um único medicamento por vez (RUIZ, 1999), e a lei da individualização (ZANIN, 1999).

Hahnemann sugeriu basicamente que uma droga atua de forma terapêutica quando produz em uma pessoa saudável, sintomas semelhantes aos de uma pessoa doente. Portanto, nasceu um sistema para o desenvolvimento científico da “escola da semelhança”, que orientaria a descoberta de outros medicamentos usados na homeopatia (JONAS & JACOB, 1996).

Um grande ponto polêmico da homeopatia até hoje é o fato de se utilizar um medicamento diluído e dinamizado, até diluições teoricamente desprovidas de moléculas ativas ou de princípio ativo. A dinamização preferencial de Hahnemann era a trigésima centesimal – 30CH – ( $100^{-30}$  ou  $10^{-60}$ ), ou seja, em proporções centesimais 1:100. Porém posteriormente foi desenvolvido um novo método de dinamização, conhecido hoje de cinqüenta-milesimal ou 1:50.000.

A idéia de dinamização das substâncias medicinais associa a diluição em água e álcool e a agitação ou sucussão da solução. O objetivo desse procedimento seria o de atritar as moléculas da substância medicinal com as moléculas da solução do diluente. Esta operação, combinada de diluição (desconcentração) e atrito, promoveria a liberação dos poderes medicinais latentes no interior da substância bruta (RUIZ, 1999).

A lei da individualização foi sistematizada por Hahnemann. A prescrição homeopática baseia-se na individualização do enfermo de acordo com a totalidade dos sintomas que lhe caracterizam, em concordância com a individualização do medicamento (ZANIN, 1999).

A homeopatia utiliza uma série de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, todas em

quantidades mínimas, usando um processo de preparação especial (JONAS & JACOBS, 1996).

Paracelso (1493-1541), alquimista-médico que empregava os chamados na época “remédios químicos”, afirmava que tudo fora criado perfeito e que cada elemento da natureza guardava em si mesmo as virtudes boas e as ruins. Sua prática médica estava centrada na doutrina dos semelhantes, tendo como base à idéia de que o que causa uma enfermidade também poderá curá-la. Toda substância possui no seu interior uma parte boa e outra má (tal como o vinagre permanece adormecido no interior do vinho), a parte boa, esta curará a enfermidade. Desta forma, ele afirmava que dependendo da adequação da dose, pode-se usar venenos com finalidade terapêutica. De forma semelhante, Hahnemann com o emprego de doses diluídas e dinamizadas, utilizou diversas substâncias tóxicas e venenosas também com a finalidade terapêutica, tais como: *Lachesis muta* (veneno da cobra surucucu), *Cicuta virosa* (cicuta) e *Arsenicum album* (arsênico). Hahnemann, entretanto, valorizava a qualidade do estímulo medicamentoso e não a quantidade da substância empregada (RUIZ, 1999).

Alguns dos primeiros experimentos laboratoriais com diluições homeopáticas muito baixas foram realizados por um proeminente patologista britânico, William Boyd, que realizou uma série de experimentos laboratoriais na década de 30, demonstrando os efeitos dos preparados homeopáticos do elemento mercúrio nos padrões de crescimento do lêvedo (BOYD, 1941, 1946, 1947, 1954 *apud* JONAS & JACOBS, 1996). Os pesquisadores da farmacologia no século XIX observaram que doses baixas de medicamentos tinham um efeito paradoxal e oposto em comparação a doses altas (SCHULZ, 1987 *apud* JONAS & JACOBS, 1996).

Estudos também examinaram os efeitos de diluições agitadas em série na imunologia. Tem sido fundamental na homeopatia desde seu início sua utilização na prevenção e no tratamento de problemas do sistema imunológico, como infecções e alergias (GRIMMER, 1948; BOWEN, 1981; TAYLOR-SMITH, 1950; SHEPHERD, 1967 *apud* JONAS & JACOBS, 1996). Existem vários estudos laboratoriais sobre influência das funções imunológicas com o uso de diluições agitadas em série e da homeopatia. Madeleine Bastide e outros têm relatado que as diluições agitadas em série de uma substância química reguladora do sistema imunológico chamada interferon e os hormônios timulina e bursina podem aumentar a taxa de glóbulos

brancos e outras funções imunológicas em animais (DAURAT, 1986; BASTIDE, 1985, 1987 *apud* JONAS & JACOBS, 1996). Existem ainda minerais que influenciam o sistema imunológico, como silício, zinco e cálcio, sendo que eles também apresentam efeitos quando preparados em diluições muito baixas (HARISCH, 1988, 1989 *apud* JONAS & JACOBS, 1996).

Inúmeros outros modelos laboratoriais usam preparados homeopáticos. Entre esses, alterações na função enzimática das células (HARISCH, 1986 *apud* JONAS & JACOBS, 1996), aceleração da cicatrização (OBERBAUM, 1992 *apud* JONAS & JACOBS, 1996), redução na incidência e progressão do câncer em animais (SUKUL, 1987, 1988 *apud* JONAS & JACOBS, 1996), alterações no limiar da dor (KEYSELL, 1984 *apud* JONAS & JACOBS, 1996), efeitos comportamentais em animais (SUKUL, 1987, 1988 *apud* JONAS & JACOBS, 1996), e muitas outras áreas.

#### **1.4 Método Canova®**

As informações citadas abaixo a respeito do Método Canova® foram obtidas através do Laboratório Canova do Brasil, localizado à rua Dr. Faivre nº 93, Centro, Curitiba – PR.

O Método Canova® é um complexo de medicamentos derivados de tinturas homeopáticas conhecidas na farmacopéia mundial: derivados do *Aconitum napellus*, *Bryonia alba*, *Thuya occidentalis*, *Lachesis trigonocephalus* e *Arsenicum album* diluídos em água destilada e 0,01% de álcool neutro. Originário da Argentina foi trazido ao Brasil, aonde vem sendo manipulado pela farmácia A Homeoterápica em Curitiba – PR e envasado pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

Nosso laboratório tomou conhecimento do Método Canova® em 1997, através de informações provenientes de médicos e pacientes que o estavam utilizando, com resultados clínicos que sugeriam uma possível atuação em macrófagos. Desde então, vários experimentos foram e vêm sendo desenvolvidos, no intuito de obter esclarecimentos sobre suas propriedades e mecanismos de ação.

O segredo da formulação é o que caracteriza este produto não como um medicamento, mas como um método. A questão não é misturar os componentes da formulação tal como aparece descrito, e sim, extrair cada um dos componentes de

forma particular e misturá-los no momento certo - nem antes, nem depois - em uma seqüência especial.

Estudos com animais de experimentação mostraram que o produto obtido pelo Método Canova<sup>®</sup> é totalmente inócuo e a dose letal média (DL 50) não foi detectada com doses 100 vezes maior que a dose habitual. Outros estudos em animais mostraram que o Método Canova<sup>®</sup> é eficaz para controlar infecções virais, bacterianas, parasitas e inclusive para controlar tumores experimentais em camundongos (LAGUENS, M. - Médico anátomo-patologista - dados não publicados). 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 como um todo, aumentando as defesas, evitando as infecções de diversos tipos e atuando através de um mecanismo imunomodulador. Não apresenta genotoxicidade, nem mutagenicidade identificável a nível cromossômico (SELIGMAM, 2000). SASAKI et al., 2001, em pesquisa realizada no Hospital de Clínicas, UFPR, com pacientes HIV/AIDS sugerem que este produto tem ação imunomoduladora. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com o Método Canova<sup>®</sup> em macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vivo* e *in vitro* resultava no aumento significativo da relação macrófagos ativados/residentes em comparação ao grupo controle, alterava a expressão e distribuição de alguns receptores, diminuía a produção da citocina TNF $\alpha$  (PIEMONTE, 2000) além de que estimulava a produção de óxido nítrico pelos macrófagos evidenciando um processo de ativação celular (GODOY, 2002).

## 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 Método Canova<sup>®</sup> é um composto medicamentoso homeopático que está sendo utilizado no tratamento de câncer e AIDS e vem apresentando resultados clínicos positivos, aumentando a qualidade de vida dos pacientes.

Devido a esses fatores tem-se a necessidade de um estudo mais detalhado sobre a atuação desse medicamento no organismo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo ampliar os conhecimentos sobre a ação do composto medicamentoso Método Canova<sup>®</sup> no organismo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Estudar *in vitro* e *in vivo* macrófagos peritoneais de camundongos tratados com Método Canova<sup>®</sup> através de técnicas de morfologia e colorimetria.

- Detectar, através de marcações eletrondensas, a atividade da enzima NAD(P)H oxidase, em macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vitro* com Método Canova<sup>®</sup>.
- Verificar a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vivo* com o composto medicamentoso Método Canova<sup>®</sup>.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Detecção da atividade enzimática da NAD(P)H oxidase

#### 4.1.1 Coleta

Para cada experimento foram utilizados doze camundongos machos da espécie *Mus musculus* de aproximadamente três meses de idade. Estes foram sacrificados por depressão do sistema respiratório utilizando éter etílico. O camundongo retirado da câmara foi colocado em um suporte de isopor, onde foi crucificado. Com duas pinças dente de rato segurou-se a pele ventral do animal levantando-a e puxando-as em direções contrárias até que essa rompesse. Foram administrados 10 ml de “Phosphate Buffer Solution” (PBS) gelado e estéril, intraperitonealmente com o cuidado para não romper nenhuma víscera. Agitou-se o líquido no interior do peritônio dando leves batidas nas laterais do corpo para que as células se soltassem. Com o auxílio de uma seringa foi retirado aproximadamente 8 ml de lavado peritoneal. O lavado foi então transferido a uma garrafa de cultivo estéril e acondicionado no gelo para impedir a aderência das células à parede da garrafa. As garrafas com o pool de lavado foram então levadas ao fluxo laminar para o plaqueamento.

#### 4.1.2 Plaqueamento

Foram utilizadas garrafas de cultivo pequenas (25 cm<sup>3</sup>). Com o auxílio de um pipetaide foi colocado aproximadamente 5 ml de lavado em cada garrafa. O lavado foi distribuído em 10 garrafas e essas foram levadas a estufa 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 15 minutos para aderência das células. Após esse tempo, o sobrenadante foi jogado e lavou-se o cultivo com PBS a 37°C, o qual foi substituído por meio de cultura “Dubecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l.

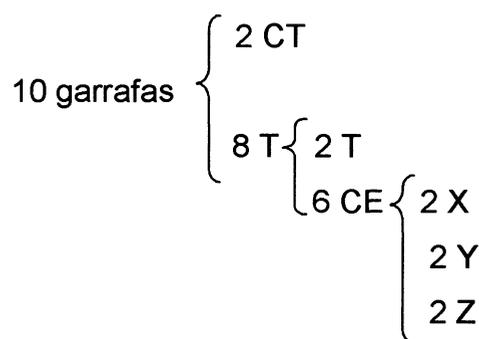
Foram separados dois grupos, o tratado e o controle do tratamento. Nas duas garrafas do controle do tratamento foram adicionados 5 ml de meio e nas oito garrafas do tratado 4,5 ml. Passadas 2 horas foram adicionados 0,5 ml de Método

Canova<sup>®</sup>. Sendo assim, as garrafas do tratado estavam com 10% de medicação em relação à quantidade de meio. Passadas mais 24 horas adicionou-se mais 0,1ml de Método Canova<sup>®</sup> no grupo tratado. O cultivo foi realizado em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas.

#### 4.1.3 Incubação da NAD(P)H oxidase (com cloreto de cério)

Após o cultivo as células foram lavadas com tampão Tris Maleato 0,1M pH 7,5 contendo 7% de sacarose a 4°C, sendo que esse foi despejado cuidadosamente dentro das garrafas, com o auxílio de pipetas Pasteur, para que as células não fossem arrancadas.

As garrafas estavam divididas em grupos de controle do tratamento e tratado. O grupo tratado foi subdividido em tratado (duas garrafas) e tratado controle da enzima (seis garrafas).



**Figura 1:** organograma mostrando a divisão dos grupos. CT – grupo controle do tratamento (sem a adição de Método Canova<sup>®</sup>); T – grupo tratado; CE – grupo controle da enzima; X – com 3-amino-1, 2,4 triazol (AT), inibidor da catalase celular e sem NAD(P)H (substrato da enzima); Y – sem AT; Z – sem AT, com NAD(P)H e com catalase 0,01%. Temos então três controles da enzima sem NADH ou NADPH, sem AT, com catalase e sem AT.

Os grupos CT, T e CE-X foram pré-incubados em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose e 1 mM de AT. Os grupos CE-Y e CE-Z foram pré-incubados em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5

com 7% de sacarose sem AT. Após dez minutos em temperatura ambiente o meio de pré-incubação foi desprezado.

Todas as garrafas foram então lavadas com tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose.

As células foram incubadas durante vinte minutos à 37°C. Os grupos CT e T foram incubados em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose, 10 mM de AT, 1 mM  $\text{CeCl}_3$ , 0,71 mM de NAD(P)H. O grupo CE-X foi incubado em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose, 10 mM de AT, 1 mM  $\text{CeCl}_3$ , sem a adição de NAD(P)H. O grupo CE-Y foi incubado em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose, 1 mM  $\text{CeCl}_3$ , 0,71 mM NAD(P)H. O grupo CE-Z foi incubado em solução contendo tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose, 1 mM  $\text{CeCl}_3$ , 0,71 mM NAD(P)H e catalase 0,01%.

Todas as garrafinhas foram lavadas duas vezes com tampão Tris Maleato 0,1M, pH 7,5 com 7% de sacarose.

As células foram então fixadas com glutaraldeído 1%, paraformaldeído 4% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M, pH 7,2 contendo 5% de sacarose durante uma hora a 4°C. Nesse ponto do processamento pode parar, armazenando as células em geladeira, certificando-se que o líquido fixador esteja cobrindo todo o fundo da garrafa, por tempo indeterminado.

Após a fixação as células foram lavadas em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo 5% de sacarose, para retirar o precipitado inespecífico do cloreto de cério. Foram lavadas em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 mM pH 7,2 e deixado overnight.

As células foram processadas segundo o protocolo rotineiro de microscopia eletrônica de transmissão.

#### **4.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As células foram raspadas das garrafas de cultivo e centrifugadas, sempre respeitando os grupos, sem misturá-los. Fez-se então a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, durante aproximadamente uma hora no escuro. Foi feita a desidratação em acetona (70, 90 e 100%), infiltração

em mistura de epon:acetona em série decrescente e a emblocagem feita em epon. Após a polimerização em estufa à 60°C, os blocos dos grupos tratado, controle do tratamento e controle da enzima foram cortados em ultramicrótomo e observados sem contrastação no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica 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 0,5µ.

## 4.2 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### 4.2.1 Tratamento

Os animais utilizados para esses ensaios foram tratados *in vivo* e mantidos durante sete dias.

Por experimento foram utilizados dezoito camundongos da espécie *Mus musculus*, machos com idade de três meses aproximadamente, foram divididos em três grupos de seis animais cada:

- grupo Canova (C): foram administrados injeções subcutâneas de 0,2 ml de Método Canova<sup>®</sup> a cada 24horas;
- grupo diluente (D): foram administrados injeções subcutâneas de 0,2 mL de diluente estéril (água destilada mais 0,01% de álcool neutro) do Método Canova<sup>®</sup> a cada 24horas;
- grupo normal (N): não foi administrada nenhuma substância nestes animais.

Foram realizados dois experimentos com quadruplicatas para cada grupo em ambos os tempos.

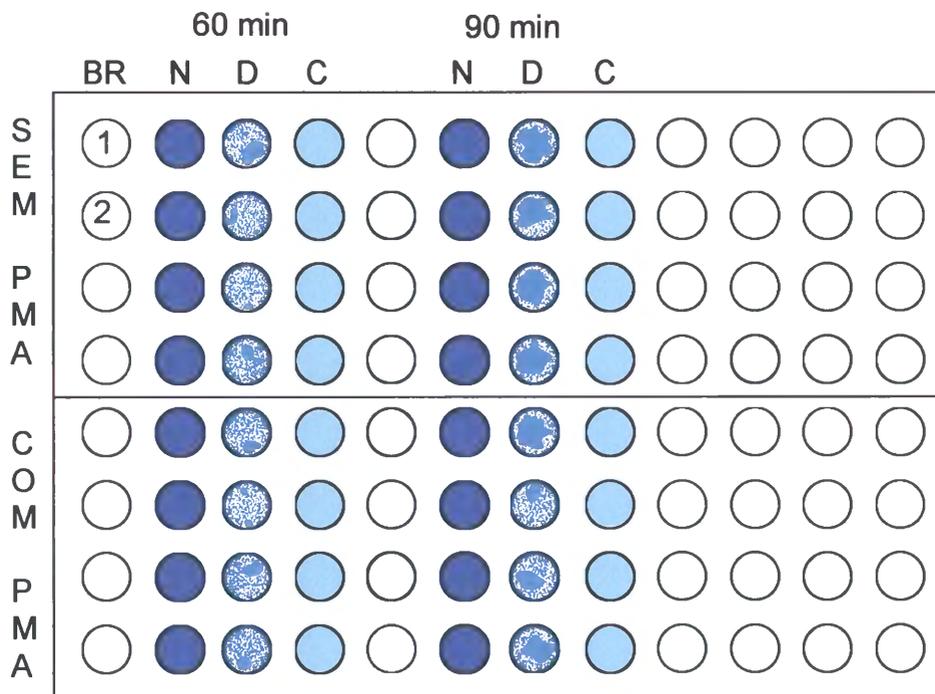
### 4.2.2 Coleta

A coleta do lavado foi realizada como descrito acima no item 4.1.1. O pool de lavado foi centrifugado em tubos fechados estéreis durante quatro minutos a 3200 rpm. O pelet obtido foi ressuspenso em 1 ml de "Hank's Buffered Salt Solution" (HBSS). Foi preparada uma solução diluída de células na concentração de 1:20 (uma parte da solução contendo as células para dezenove partes de HBSS) de cada

grupo para contagem das células em câmara de Neubauer. A concentração de células de cada grupo foi ajustada para  $3,5 \times 10^6$  macrófagos/ml.

#### 4.2.3 Plaqueamento

O plaqueamento foi realizado em duas placas de cultura com noventa e seis poços, dezesseis para cada grupo. Foram adicionados  $100 \mu\text{ml}$  da solução ajustada de células em cada poço, tendo uma concentração final de  $3,5 \times 10^5$  macrófagos por poço. As células foram incubadas por um período de quinze minutos em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  para a adesão nas placas.



**Figura 2:** esquema de montagem de um experimento na placa de noventa e seis furos. BR – branco; N – normal; D – diluente; C – Canova.

#### 4.2.4 Dosagem de $\text{H}_2\text{O}_2$

A produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por macrófagos tratados com o Método Canova<sup>®</sup> em camundongos (*in vivo*) foi quantificada pelo método baseado na oxidação do vermelho de fenol pela  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dependente de peroxidase, segundo o método de PICK & MIZEL, 1981.

Após os quinze minutos de plaqueamento, as células foram lavadas duas vezes com HBSS morno (37°C) para a remoção das células que não aderiram na placa.

A placa foi dividida conforme mostra a figura 2. Foi adicionado 100µl de meio de incubação contendo vermelho de fenol a 1M e 15 U/ml de peroxidase dissolvidos em HBSS em todos os poços. Posteriormente, nos poços inferiores, foi ainda adicionado "phorbol myristate acetate" (PMA) na concentração de 1µl/ml. O PMA foi utilizado como controle positivo, uma vez que é conhecido como potencializador da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos. Foram ainda preparados dois brancos, um para cada tempo, contendo 100µl do meio de incubação, sem a adição de PMA. Cada grupo foi então analisado com e sem a presença de PMA. As placas de cultivo foram levadas a estufa a 37°C.

Para que fosse possível medir a variação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcional ao tempo de incubação, primeiramente foram retirados os 100µl do poço branco 1 e de todos os poços referentes ao experimento de 60 minutos, sendo transferidos para outra placa contendo 10µl de solução aquosa de NaOH 1N em cada poço correspondente. Logo após a retirada do meio de incubação, a placa foi recolocada na estufa a 37°C, onde permaneceu por mais trinta minutos. Ao final desses, o procedimento do experimento de sessenta minutos foi repetido.

A oxidação do vermelho de fenol foi quantificada através de leitura da absorbância em leitor de ELISA (SLT Lab Instruments 340 ATC) utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica e estão apresentados em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /10<sup>6</sup> células.

#### **4.2.5 Curva de concentração padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Pra a obtenção de um padrão, foi feita uma curva de concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando peroxidase (HRPO tipo VI-A, 1310U/ml – Sigma) com a concentração final de 15U/ml.

Foram feitas três soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. A concentração dessas soluções foi determinada através de sua absorbância em 240 nm, sendo o resultado utilizado em um coeficiente de 39,58 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Diluições apropriadas da solução estoque foram usadas para a determinação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

produzida pelos macrófagos em cultura, segundo o método de PICK & KEISARI, 1980. A absorbância dessas diluições foi lida em leitor de ELISA (SLT Lab Instruments 340 ATC) utilizando filtro de comprimento de onda de 620 nm e o resultado foi utilizado para confeccionar a curva padrão.

#### 4.2.6 Análise estatística

Os valores utilizados no cálculo estatístico foram obtidos através da correlação dos resultados da leitura da absorbância de cada experimento com os valores da curva padrão da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A análise estatística foi realizada a partir da análise de variância (ANOVA: fator duplo sem repetição) dos valores obtidos nos dois tempos. O valor de  $p < 0,05$  nas linhas foi considerado como existindo diferença estatisticamente significativa, e com um valor de  $p > 0,05$  nas colunas considerou-se que os dados obtidos foram homogêneos, ou seja, as repetições eram reproduzíveis. Foi utilizado também o teste de Tukey. Esse teste é realizado visando encontrar a diferença mínima entre as médias para que exista diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Para isso, aplicou-se a seguinte fórmula:

$$T_o = q \sqrt{QME / R}$$

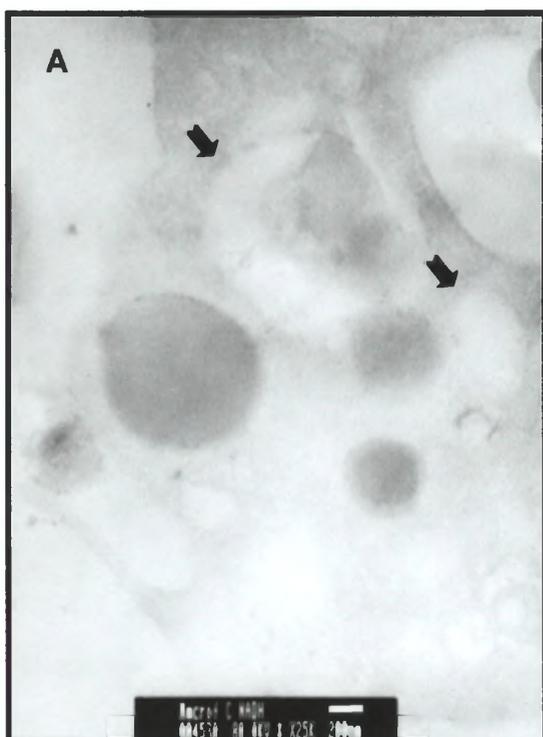
Onde  $q$  é o valor encontrado na tabela de valores da amplitude total estudentizada ( $q$ ) para  $\alpha = 5\%$ , segundo o número de tratamento ( $k$ ) e os graus de liberdade do resíduo a partir do grau de liberdade do erro com o número de tratamentos; QME é o MQ do erro e  $R$  é o número de repetições (VIEIRA, 1980).

## 5 RESULTADOS

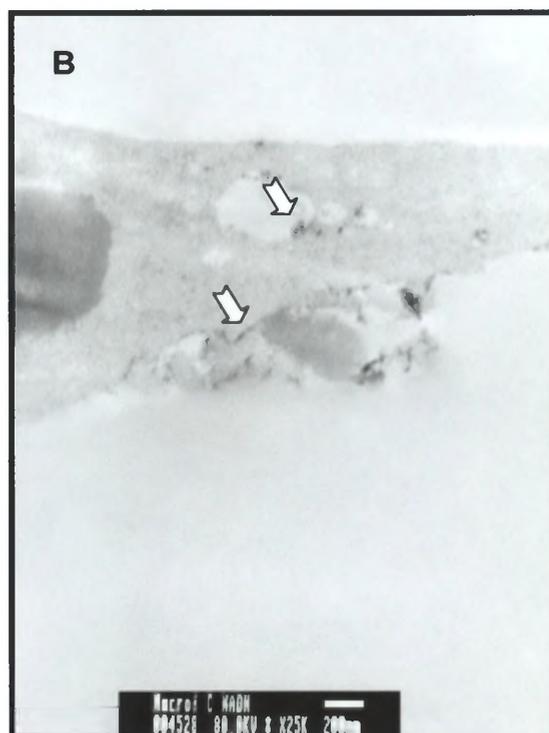
### 5.1 Atividade enzimática da NAD(P)H oxidase

Foi observada marcação eletrondensa positiva para a enzima NAD(P)H oxidase tanto no grupo tratado quanto no grupo controle.

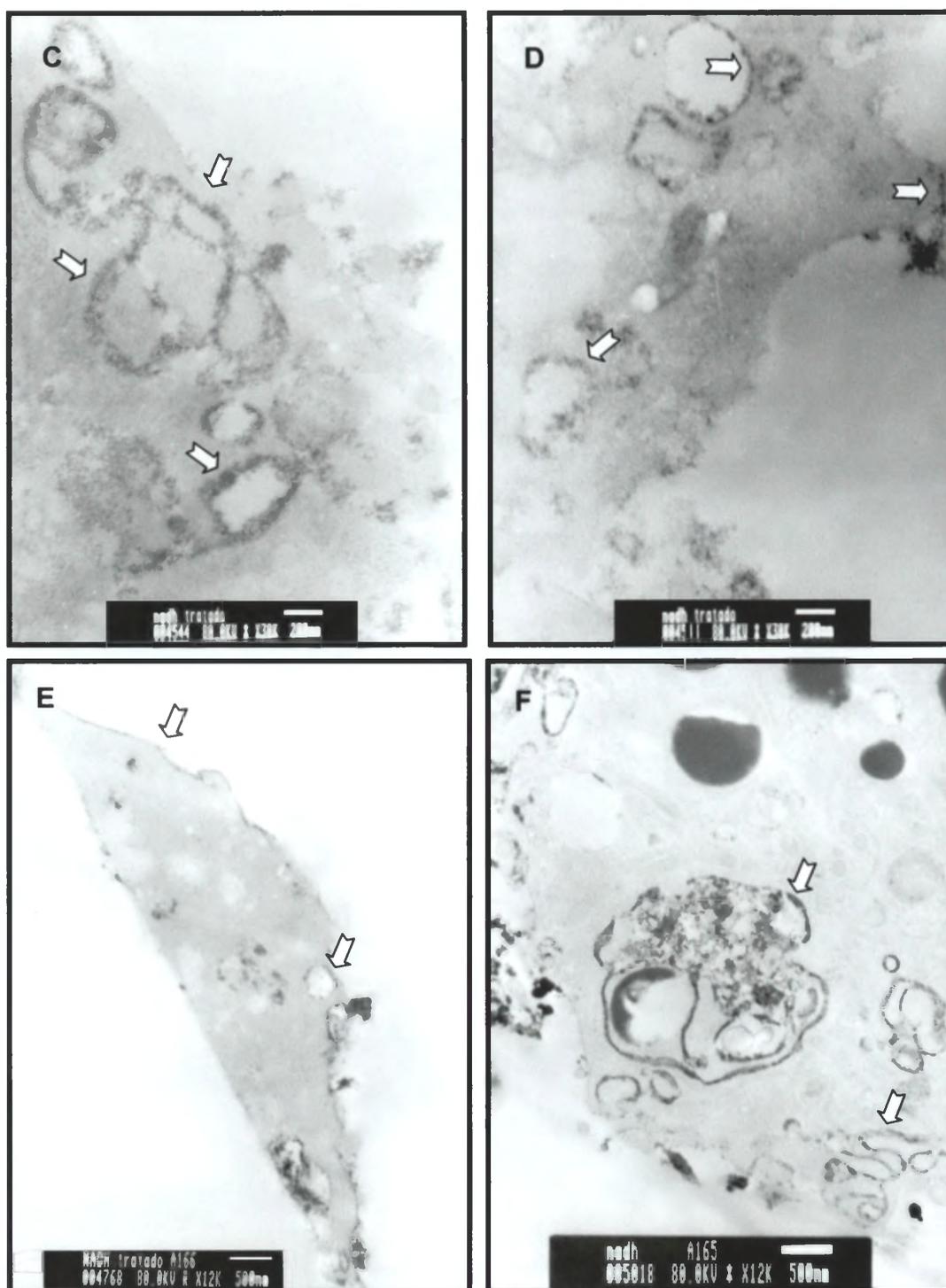
#### Eletromicrografias de macrófagos peritoneais de camundongos.



**Figura A:** macrófago do grupo **controle** da **enzima** sem marcação eletrondensa positiva para a enzima NADH oxidase, aumento 25.000x.



**Figura B:** macrófago do grupo **controle do tratamento** com fraca marcação eletrondensa, aumento 25.000x.



**Figuras C à F:** macrófagos do grupo **tratado** apresentando forte marcação eletrondensa. Fig C e D aumento 30.000x, barra 200 nm. Fig E e F aumento 12.000x, barra 500nm. Seta ➔ ausência de marcação; ⇨ reação positiva da atividade da enzima NAD(P)H oxidase.

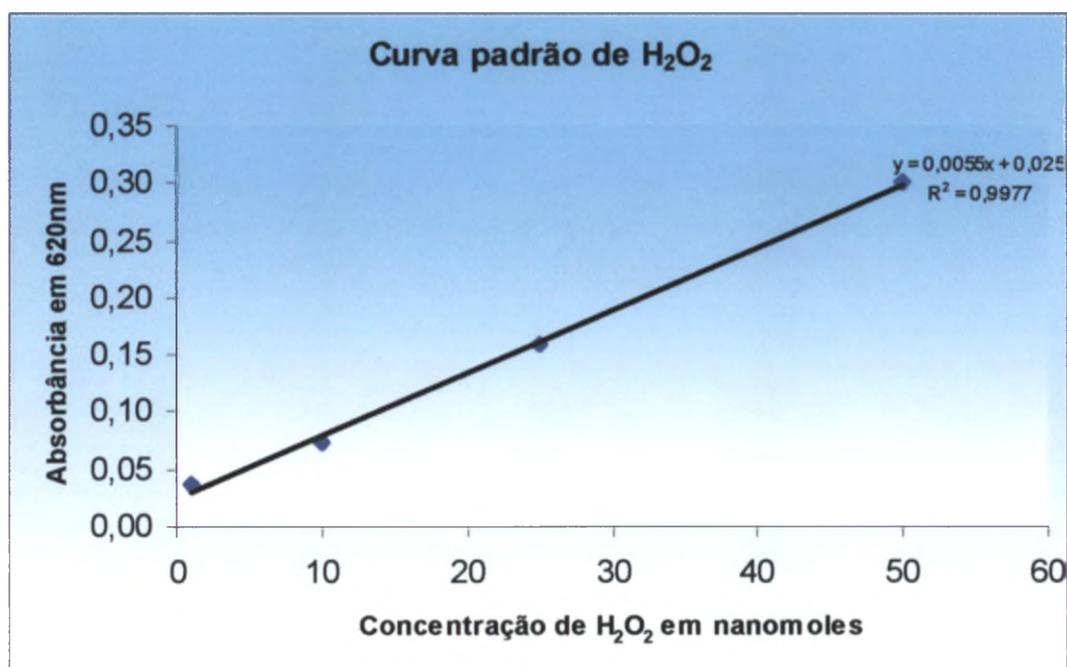
## 5.2 Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 5.2.1 Curva de concentração padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A partir dos resultados obtidos na leitura das diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tabela 1) foi obtido o gráfico da curva de concentração padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o qual está sendo mostrado no gráfico 1.

Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em nmoles	Absorbância
1	0,037
10	0,073
<b>25</b>	<b>0,159</b>
50	0,300

**Tabela 1:** valores encontrados na leitura. O valor em negrito foi utilizado para os testes estatísticos por ser o mais representativo da tendência.



**Gráfico 1:** curva padrão da absorbância de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando peroxidase tipo IV-A.

## 5.2.2 Dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e análise estatística

### Experimento de 60 minutos:

O resultado obtido a partir da análise de variância (ANOVA: fator duplo sem repetição) dos valores obtidos nos experimentos de 60 minutos mostrou que existe diferença estatisticamente significativa e que as repetições estão homogêneas (tabela 2).

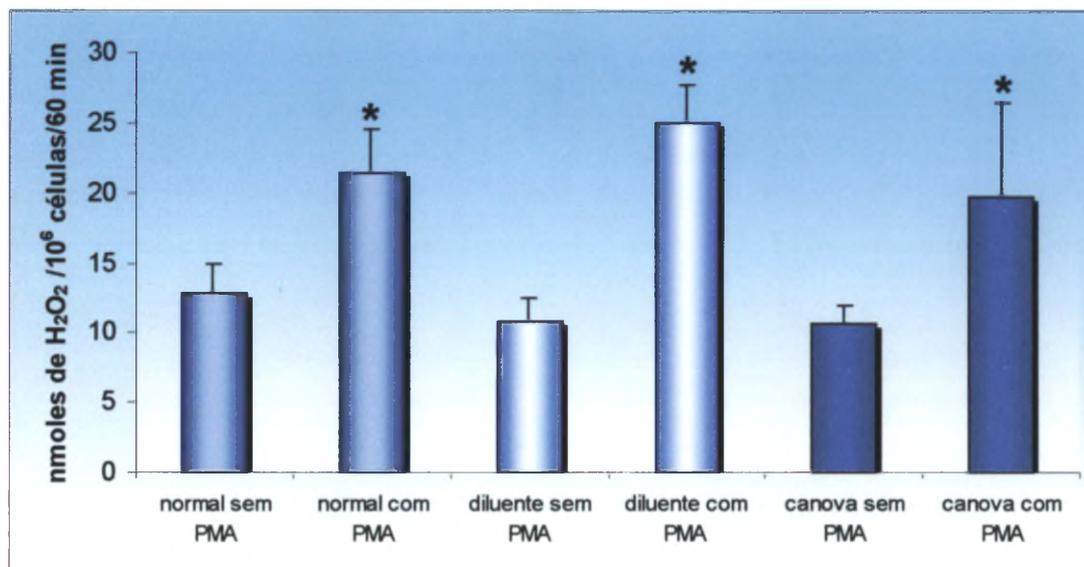
A partir das médias das repetições de cada grupo (tabela 3) foi obtido um gráfico de comparação entre os grupos (gráfico 2). O teste de Tukey foi realizado, apresentando como resultado  $T_0 = 6,33$ , significando que essa deve ser a diferença mínima entre as medias para que exista diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

ANOVA – EXPERIMENTO 60 MINUTOS						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	1126,68	5	225,34	17,80	<b>1,58E-07</b>	2,60
Colunas	43,15	5	8,63	0,68	<b>0,641351</b>	2,60
Erro	316,38	25	12,65			
Total	1486,21	35				

**Tabela 2:** análise da variância mostrando que nas linhas o  $p < 0,05$  e que nas colunas o  $p > 0,05$ .

Grupos	Média	Desvio padrão
Normal sem PMA	12,80	2,16
Normal com PMA	21,41*	3,11
Diluyente sem PMA	10,71	1,74
Diluyente com PMA	24,93*	2,75
Canova sem PMA	10,56	1,29
Canova com PMA	19,69*	6,73

**Tabela 3:** valores das médias entre as repetições de cada grupo e o desvio padrão respectivo. \*apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparados com o controle sem PMA.



**Gráfico 2:** Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em nmoles/10<sup>6</sup> células em 60 minutos. \*possui diferença significativa em relação ao controle sem PMA.

### Experimento de 90 minutos:

O resultado obtido a partir da análise de variância (ANOVA: fator duplo sem repetição) dos valores obtidos nos experimentos de 90 minutos mostrou que existe diferença estatisticamente significativa e que as repetições estão homogêneas (tabela 4).

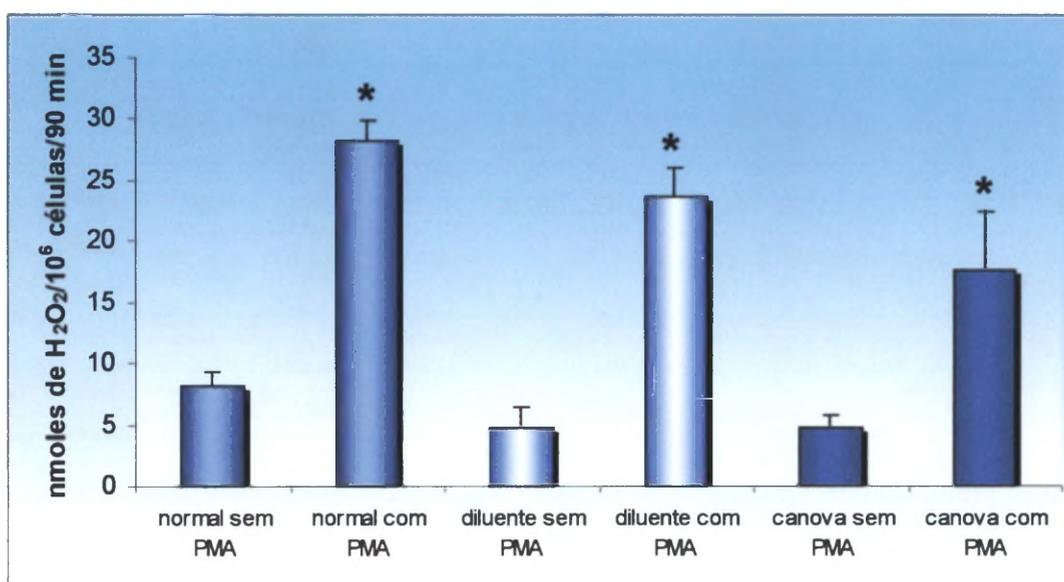
A partir das médias das repetições de cada grupo (tabela 5) foi obtido um gráfico de comparação entre os grupos (gráfico 3). O teste de Tukey foi realizado, apresentando como resultado  $T_0 = 4,61$ , significando que essa deve ser a diferença mínima entre as medias para que exista diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

ANOVA – EXPERIMENTO 90 MINUTOS						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	3077,70	5	615,54	91,66	<b>2,9741E-15</b>	2,60
Colunas	14,24	5	2,85	0,42	<b>0,82737395</b>	2,60
Erro	167,89	25	6,71			
Total	3259,84	35				

**Tabela 4:** análise da variância mostrando que nas linhas o  $p < 0,05$  e que nas colunas o  $p > 0,05$ .

Grupos	Média	Desvio padrão
Normal sem PMA	8,16	1,12
Normal com PMA	28,15*	1,72
Diluyente sem PMA	4,79	1,67
Diluyente com PMA	23,66*	2,30
Canova sem PMA	4,72	1,09
Canova com PMA	17,60*	4,83

**Tabela 5:** valores das médias entre as repetições de cada grupo e o desvio padrão respectivo. \*apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparados com o controle sem PMA.



**Gráfico 3:** Produção de  $H_2O_2$  em  $nmoles/10^6$  células em 90 minutos. \*possui diferença significativa em relação ao controle sem PMA.

## 6 DISCUSSÃO

A observação ultraestrutural dos cortes das células processadas para a detecção da enzima NAD(P)H oxidase, permitiu a identificação dos diversos grupos experimentais. A enzima foi observada tanto na membrana plasmática quanto em estruturas que podem ser vesículas ou cortes de invaginações das células. Não se pode afirmar com certeza que estruturas são devido ao fato de que não foram feitas marcações específicas para essas. Porém, pode-se inferir que são realmente invaginações de membrana, pois, segundo NYGREN et al., 2001, a localização da NAD(P)H oxidase é primariamente na fração da membrana plasmática. Experimentos realizados por CARVALHO e DE SOUZA, 1987 durante o processo de internalização de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos ativados, resultaram na observação do produto da reação dessa enzima tanto na membrana plasmática quanto em vacúolos parasitóforos. Essa observação levou a conclusão que a enzima é internalizada durante o processo de endocitose.

No grupo controle a maioria das células possui morfologia de macrófagos residentes, com núcleo pequeno, escuro, oval ou reniforme, citoplasma escasso, muito pouco vacuolizado e ausência de grânulos citoplasmáticos densos (PIEMONTE, 2000). Alguns macrófagos deste grupo apresentaram marcação eletrondensa positiva para a enzima NAD(P)H oxidase, pois é esperado que em um animal sadio encontre-se alguns macrófagos ativados. Porém, a marcação observada nesse grupo não foi tão intensa quanto no grupo tratado.

No grupo tratado a maioria das células apresentou morfologia de células ativadas, isto é macrófagos maiores, com núcleo grande, lobulado, claro com muita eucromatina e nucléolo evidente, citoplasma bastante claro e vacuolizado, apresentando várias projeções citoplasmáticas (PIEMONTE, 2000). Estas células apresentaram intensa marcação eletrondensa positiva, sugerindo uma maior atividade desta enzima neste grupo. Os grupos controles da enzima não apresentaram marcação, demonstrando a especificidade dessa. Esses resultados confirmam que o tratamento com o medicamento homeopático Método Canova® ativa os macrófagos, uma vez que, apenas macrófagos ativados requerem a atividade aumentada da NAD(P)H oxidase.

A marcação eletrondensa referente ao produto da NAD(P)H oxidase presente na membrana plasmática e nas invaginações foi obtida através do tratamento *in vitro*.

O resultado da produção de  $H_2O_2$  baseia-se na oxidação dependente de peroxidase do vermelho de fenol pela  $H_2O_2$  (PICK & MIZEL, 1981). Esses foram obtidos a partir do tratamento *in vivo*, portanto da interação dos macrófagos com linfócitos, citocinas, entre outras células e moléculas. Os macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova<sup>®</sup> não sofreram alteração estatisticamente significativa na produção de peróxido de hidrogênio na ausência de moléculas patogênicas. A não diferença significativa entre o controle e o tratado é coerente com os resultados encontrados em nosso laboratório quanto à produção de óxido nítrico (NO). A avaliação da produção de NO baseia-se na determinação da concentração de nitrito ( $NO_3^-$ ), o qual é um produto estável da reação de produção do NO no sobrenadante das culturas. Os experimentos em nosso laboratório mostraram um aumento estatisticamente significativo na produção de NO pelos macrófagos tratados com o Método Canova<sup>®</sup> (GODOY, 2002). Segundo WOOD e AUSTYN, 1993, a molécula de NO pode reagir com o superóxido ( $O_2^-$ ) resultando na sua neutralização com a formação de nitrito ( $NO_3^-$ ). Sendo assim, o fato da presença de maior atividade da NAD(P)H oxidase não implica necessariamente na detecção do  $H_2O_2$ , uma vez que o  $O_2^-$  é uma molécula tóxica, instável e altamente reativa, que antes de ser dismutado em  $H_2O_2$  pode se combinar com o NO, formando  $NO_3^-$ . Sendo assim, os níveis detectados de produção de  $H_2O_2$  por macrófagos tratados com o Método Canova<sup>®</sup> não estão aumentados em relação ao controle provavelmente devido a essa interação.

Portanto, os diversos experimentos da produção de  $H_2O_2$  realizados, em quadruplicatas, com repetições e com resultados estatisticamente homogêneos e  $H_2O_2$  significativos, mostram resultados harmônicos, complementares e corroboram os resultados de nossa equipe. No grupo do diluente também não foi observada diferença estatisticamente significativa, uma vez que, esse é apenas o meio de veiculação do medicamento Método Canova<sup>®</sup>. Os experimentos de 60 e 90 minutos apresentaram um perfil semelhante, mostrando que o aumento do tempo não acarreta o aumento da produção de  $H_2O_2$  pelos macrófagos.

## 7 CONCLUSÃO

A marcação para a enzima NAD(P)H oxidase encontra-se mais intensa nos macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova® *in vitro*, sugerindo uma maior atividade desta enzima neste grupo.

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não sofreu alteração estatisticamente significativa pelos macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova® *in vivo*, nem pelo grupo tratado com o diluente do Método Canova®.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular & molecular**, 3ª ed., Revinter, Rio de Janeiro, 2000.

BORUTAITE, V.; BROWN, G. C. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. **FEBS letters**. v. 500, p. 114-118, 2001.

CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Cytochemical localization of NADH and NAD(P)H oxidase during interaction of *Trypanosoma cruzi* with activated macrophages. **Parasitol Res.**, v. 73:, p. 213-217, 1987.

GODOY, L. **Efeitos do medicamento Método Canova® sobre a funcionalidade de macrófagos**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Morfologia), Universidade Federal do Paraná.

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

MARSH, J. A., KENDALL, M. D. **The physiology of immunity**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1996.

NYGREN, H. et al. The respiratory burst response of surface-adhering leukocytes. A key to tissue engineering. **Colloids and surfaces B : biointerfaces**. v.22, p. 87-97, 2001.

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

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

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

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

ROITT, I, BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**, 3ª ed., São Paulo, 1999.

RUIZ, R. **A montagem da teoria da dinamização dos medicamentos homeopáticos de Samuel Hahnemann**. São Paulo, 1999. Tese (Doutorado em comunicação e semiótica), Pontifícia Universidade Católica.

SAMPAIO, S. C.; **Influências do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a funcionalidade e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos**. São Paulo, 2000. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

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

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **TIBS**, v. 18, p. 43-47, 1993.

SELIGMANN, I. C. et al. Absence of genotoxic effects of Método Canova® in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. **Gen. Mol. Biol.**, v. 23, n. 3, supplement P. 677, 2000.

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

TSUNAWAKI, S.; NATHAN, C. F. Enzymatic basis of macrophage activation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 259, nº 7, p. 4305-4312, 1984.

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.

VIEIRA, S. **Introdução a bioestatística**. 5ª ed, Ed. Campos, Rio de Janeiro, 1980.

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

ZANIN, S. M. **Curso de especialização em ciências farmacêuticas (área de produtos naturais)**. Apostila de homeopatia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.