

BEATRIZ CESAR

**Avaliação do medicamento homeopático imunomodulador
em células de medula óssea de camundongos tratados *in
vitro e in vivo***

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Dorly de Freitas Buchi
Co-orientador: Prof. Dr Waldemiro Gremski

**CURITIBA
2008**

Aos meus familiares sempre presentes em
minha vida.

“Quando se busca harmonia na vida, jamais se pode esquecer que nós próprios somos, ao mesmo tempo, atores e expectadores.”

Pierre Weil

AGRADECIMENTOS

Ao universo e suas sincronicidades, sempre proporcionando desafios certos nos momentos oportunos para o meu crescimento.

A Dorly, orientadora e amiga de longa data, presente em mais esta etapa de aprendizado em minha vida.

Ao Waldemiro, professor e amigo também de longa data, oferecendo boas idéias e incentivo em horas especiais.

Ao Francisco Canova, *in memoriam*, pela sua inteligência e coragem.

Ao Professor Radovan e Márcia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que nos receberam, e junto com sua equipe, compartilharam suas experiências.

Ao Juarez, um grande obrigado, por ter disponibilizado seu conhecimento em estatística para meu crescimento e de meu trabalho.

A coordenação da pós-graduação e Marlene, sempre prestativos e presentes.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná, TECPAR, um agradecimento especial ao Dr. Mariano de Matos Macedo, Júlio Salomão, Dr. Milton Pires Ramos, Dr. Bill Jorge Costa, Ana Cristina Francisco, Kelen C. Sboli, Denise Grossi, Aurora Pedroso, Marta Amaral e Carmem Etsuko.

Ao Francolino Cardoso, companheiro, amigo e profissional de grande qualidade, fundamental presença neste processo.

A Ana Paula e Carolina, companheiras desta jornada de trabalho, sempre presentes e dedicadas, enriquecendo ainda mais meus relacionamentos.

A Luciana Lopes, boas experiências, lembrando a beleza da análise morfológica.

A Denise Vilarinho, doutora na habilidade de “ver com olhos de ver” dividindo suas experiências, proporcionando crescimento e evolução.

Aos companheiros iluminados do laboratório, Simone, Rafalelo, Fernando, Karine, Karoline, Lucas, Ediely, Eric e Juliano que proporcionam bons momentos durante a jornada de trabalho e me permitem perceber a riqueza em aprender com eles.

A todos os amigos do Departamento de Biologia Celular que tive oportunidade de reencontrar.

Aos meus mestres que tem estado cada dia mais presente em minha vida, contribuindo no meu aprendizado, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	14
1.1 Tratamento Homeopático.....	14
1.2 Medicamento Imunomodulador Homeopático.....	15
1.3 Medula Óssea	16
1.3.1 Células-tronco.....	16
1.3.2 Células Diferenciadas.....	20
1.3.2.1 Linfócitos.....	20
1.3.2.2 Monócitos/Macrófagos.....	21
1.3.2.3 Células Dendríticas.....	24
1.3.2.4 Granulócitos.....	25
1.3.2.5 Eritrócitos.....	26
1.3.2.6 Células com núcleo em anel.....	27
1.3.3 Microambiente ou estroma medular.....	28
1.3.4 Fatores de crescimento e interleucinas.....	29
1.3.4.1 Fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos - M-CSF.....	31
1.4 Resultados de estudos anteriores com o medicamento.....	32
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Medicamento Imunomodulador.....	35
4.2. Animais.....	35
4.3 Obtenção do fator de diferenciação para monócitos e macrófagos (M-CSF).....	36
4.4. Preparação celular.....	36
4.4.1 Coleta das células de medula.....	36

4.4.2 Separação por Ficoll-Hypaque.....	37
4.4.3 Cultura Celular.....	38
4.5 Tratamentos.....	38
4.5.1 Tratamento <i>in vitro</i>	38
4.5.2 Tratamento <i>in vivo</i>	39
4.5.3 Tratamento <i>ex-vivo</i>	39
4.6 Análises do tratamento <i>in vitro</i>	39
4.6.1 Contagem das células nucleadas do sobrenadante da cultura <i>in vitro</i>	39
4.6.2 Análise morfológica.....	40
4.6.3 Análise de citocinas.....	41
4.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	41
4.7 Análises do tratamento <i>in vivo</i>	42
4.7.1 Análise morfológica.....	42
4.7.2 Imunofenotipagem.....	42
4.8 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Experimento Piloto.....	44
5.2 Resultados do tratamento <i>in vitro</i>	44
5.2.1 Contagem das células mononucleares do sobrenadante.....	44
5.2.2 Análise morfológica.....	46
5.2.3 Análise de citocinas.....	52
5.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	53
5.3 Tratamento <i>in vivo</i>	58
5.3.1 Análise morfológica.....	58
5.3.2 Imunofenotipagem.....	63
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÃO.....	77
8 CONCLUSÃO GERAL.....	78
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
10 ANEXOS.....	89

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Visão esquemática da hematopoiese adulta.....	19
TABELA 1 - Citocinas importantes na hematopoiese	30
FIGURA 2 - Separação das mononucleares por Ficoll-Hypaque.....	37
TABELA 2 -Classificação morfológica das células mononucleares	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3 – Experimento piloto.....	45
FIGURA 4 – Cultura de células mononucleares com aumento da densidade celular.....	48
FIGURA 5 – MET em células aderentes de do sobrenadante.....	54
FIGURA 6 – MET detalhe das células aderentes.....	55
FIGURA 7 – MET detalhe das células do sobrenadante.....	56
FIGURA 8– MET detalhe das regiões de adesão entre células aderentes.....	57
FIGURA 9 – Cultura de células mononucleares <i>in vivo</i>	60

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Contagem de células do sobrenadante das culturas <i>in vitro</i>	46
GRÁFICO 2 - Contagem do número de linfócitos <i>in vitro</i>	47
GRÁFICO 3 - Contagem do número de macrófagos residentes <i>in vitro</i>	50
GRÁFICO 4 - Contagem do número de macrófagos ativados <i>in vitro</i>	50
GRÁFICO 5 - Contagem do número de nichos celulares <i>in vitro</i>	51
GRÁFICO 6 - Contagem do número de núcleos em anel <i>in vitro</i>	51
GRÁFICO 7 - Análise de citocinas do sobrenadante das culturas <i>in vitro</i>	52
GRÁFICO 8 - Contagem do número de linfócitos, macrófagos residentes e macrófagos ativados <i>in vivo</i>	61
GRÁFICO 9 - Contagem do número de nichos celulares <i>in vivo</i>	62
GRÁFICO10 - Contagem do número de núcleos em anel <i>in vivo</i>	62
GRÁFICO 11 – Imunofenotipagem <i>in vivo</i>	64
GRÁFICO 12 – Detalhe da imunofenotipagem <i>in vivo</i>	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 3 – Contagem das células aderentes e análise estatística após o tratamento <i>in vitro</i>	89
TABELA 4 - Contagem de células e análise de variância (ANOVA) após tratamento <i>in vivo</i>	90
TABELA 5 – Análise com médias percentuais de linfócitos, macrófagos residentes e macrófagos ativados, comparando tratamento x tempo.....	91
TABELA 6 - Análise estatística dos nichos celulares e células com núcleo em anel.....	92
TABELA 7 - Análise com médias percentuais de nichos celulares e núcleo em anel, comparando tratamento x tempo.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - células apresentadoras de antígeno
BFU-E - unidades formadoras de blastos de eritrócitos
CFU-E - unidades formadoras de colônias de eritrócitos
CFU-B unidades formadoras de blastos
CSFs - fatores estimuladores de colônia
DH - escala decimal Hahnemanniana
EPO - eritropoetina
Flt3/FLk2L - ligante do receptor Flt3
GM-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos/monócitos/(macrófagos)
G-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos
CLP - progenitora linfóide
CMP- progenitora mielóide
DL50 - dose letal média
DMEM – meio Eagles Dulbeccos modificado
EB - eritroblasto basófilo
EPC- eritroblasto policromatófilo
EOC eritroblasto ortocromático
ROS - espécies reativas de oxigênio
NO - óxido nítrico
HSC - células tronco hematopoiéticas
INF γ - interferon γ
Ils - interleucinas
IL1 - interleucina 1
IL- interleucina 2
IL-3 - interleucina 3
IL-4 - interleucina 4
IL-8 - interleucina 8
IL-11 - interleucina 11

LPS - lipopolissacarídeo
MEC - moléculas de matrix extracelular
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
M-CSF – fator de diferenciação de monócitos/macrófagos
M-CFUs –unidades formadoras de colônias de macrófagos
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
Linfócitos T- linfócitos do timo
Linfócitos B – linfócitos da bursa de Fabrícus
NK- natural killers
iNOS - óxido nítrico sintetase indutível
OsO4 –tetróxido de ósmio
PE - proeritroblasto
PBS – solução salina tamponada
RER – retículo endoplasmático granular
Rt - reticulócito
SCF - stem cell factor ou ligante do c-kit
SCF - stem cell factor
SFB - soro fetal bovino
SDF-1- quimiocina stromal
Th1 - linfócito T helper 1
Th2 - linfócito T helper 2
TNF α - Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

O microambiente da medula óssea é composto de fatores de crescimento, células estromais, matriz extracelular e células progenitoras, que se diferenciam em células sanguíneas. Estudos prévios demonstraram que o medicamento imunomodulador homeopático complexo Canova (IH) aumentou o número de leucócitos. Nesse trabalho relatamos o efeito do tratamento sobre as células mononucleares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Quatro grupos foram realizados: a) tratado com o medicamento IH; b) tratado com IH e M-CSF; c) apenas com M-CSF como controle positivo; d) e sem nenhum tratamento. Os fêmures de camundongos suíços foram dissecados, limpos e as células da medula óssea foram lavadas. Foram então plaqueadas, tratadas ou não, incubadas em diferentes tempos e processadas para microscopia de luz e eletrônica de transmissão. A imunofenotipagem e as citocinas foram analisadas por citometria de fluxo. O medicamento aumentou o número de nichos e de células com núcleo em anel (precursoras). Microscopia de luz e eletrônica de transmissão mostraram diferentes estágios de maturação com células residentes e ativadas. Com o tratamento houve um acentuado aumento no volume celular, número de mitocôndrias, do retículo endoplasmático granular e do complexo de Golgi. Todas as técnicas de microscopia mostraram que a linhagem monocítica (CD11b+) e as células estromais (aderentes) foram ativadas com o tratamento. O medicamento aumentou os “clusters” (nichos celulares) sobre as células aderentes, sugerindo áreas de proliferação. As análises *ex vivo* mostraram que o número de núcleos em anel, nichos celulares e macrófagos ativados aumentaram nas culturas tratadas. O tratamento permitiu a sobrevivência e diferenciação dessas células, provavelmente produzindo citocinas e fatores de diferenciação. Esses resultados podem ser de fundamental importância para tratamentos clínicos em medicina regenerativa e terapias celulares.

Palavras-chave: Medula óssea. Células mononucleares. Células do estroma. Ativação celular. Medicação homeopática.

ABSTRACT

The bone marrow microenvironment is composed of growth factors, stromal cells, extracellular matrix and progenitor cells which differentiate into mature blood cells. Previous studies demonstrated that an immunomodulator complex homeopathic drug called Canova (IH) induced up-regulation in leukocytes count. We now report the effect of the “in vitro” and “in vivo” IH treatment on the mononuclear cells lineage of the bone marrow. Four groups were performed: a) treated with the IH drug; b) with IH plus M-CSF; c) with M-CSF only, as positive control; d) and without any treatment. Swiss mice femurs were dissected, cleaned and the cells of the marrow were flushed. The cells were plated, treated or not, incubated for different periods and processed for light and transmission electron microscopy analysis. Immunophenotyping and cytokines were analyzed by flow cytometer. An increase in the numbers of the cell niches and ring-shaped nuclei cells (progenitors) was observed in treated group. Light and transmission electron microscopy showed the stages of monocyte maturation, with resting and activated cells. A marked increase in cell volume was observed under treatment as well as, an increase in the number of mitochondria, expansion of the RER and an enlargement were observed in Golgi apparatus. All microscopy techniques showed that a monocytic lineage (CD11b⁺) and stromal cells (adherent cells) were activated by treatment. IH also increased cell clusters over adherent cells, suggesting the presence of proliferation areas. The *ex vivo* analysis showed that the number of ring nuclei, niches cells, as well as activated macrophages increased in culture. The treatment allowed the survival and differentiation of these cells, probably inducing cytokines and growth factors production. These results may be of fundamental interest in clinical treatments, regenerative medicine and cellular therapies.

Key Words: Mononuclear bone marrow. Stromal cells. Cell activation. Homeopathic medication.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 TRATAMENTO HOMEOPÁTICO

Grandes avanços ocorreram na área da medicina com a produção e pesquisa de novos medicamentos e, com isso, inúmeras doenças têm sido controladas e eliminadas. O avanço nos estudos da imunologia, parasitologia, bem como a descoberta de antibióticos e vitaminas, têm contribuído neste processo. Dessa forma a medicina convencional, ou alopátia, alcançou importantes avanços e pode auxiliar na preservação da saúde, aumento da longevidade e melhora da qualidade de vida de pacientes. No entanto, embora em muitos casos os sintomas sejam aliviados, curados, ou impedidos de se manifestar, muitos medicamentos alopáticos podem causar uma série de prejuízos para o organismo.

A medicina homeopática tem por objetivo a tentativa de cura abordando de forma integrada os binômios saúde-doença e doença-doente. A homeopatia é uma terapêutica médica que consiste em curar os doentes valendo-se de remédios preparados em altas diluições e capazes de produzir no homem, aparentemente sadio, sintomas semelhantes aos da doença que devem curar. Com esta conceituação da homeopatia, pode-se distinguir os seus três fundamentos básicos: princípio da semelhança, experimentação no homem sadio e ação de diluições infinitesimais (DANTAS. 1987). Em contraste, os medicamentos utilizados pela a medicina convencional por vezes funcionam suprimindo a reação natural do organismo. Fato este que não ocorre com a homeopatia, pois o sistema imunológico é estimulado a apoiar o sistema de cura.

O princípio da semelhança (*Similia similibus curentur*), preconiza que os semelhantes sejam curados pelos semelhantes. Toda substância capaz de provocar determinados sintomas (físicos ou psíquicos) numa pessoa sadia é também capaz de curar uma pessoa doente que apresente estes mesmos sintomas, e essa teoria foi comprovada por Hahnemann com a experimentação no indivíduo sadio (DANTAS. 1987). Para a farmacologia clássica é condição necessária que todo medicamento ou fármaco seja um agente químico, portanto contendo princípio ativo. O princípio da homeopatia consiste em diluições sucessivas seguidas de dinamização (agitação

vigorosa). Na homeopatia, como se dilui sucessivamente a substância de base, pode-se chegar a altas diluições, onde teoricamente não deveriam existir moléculas da substância original, ou seja, o medicamento homeopático passaria a não ser mais um agente puramente químico e sim físico. Se tudo no universo é matéria e energia, se a matéria e a energia se interconvertem, se não há vida humana sem energia, é válida e oportuna a pesquisa de recursos energéticos (físicos) para reequilibrar um organismo doente, que por sua vez é também constituído por células e moléculas (matéria) e, inevitavelmente, mantém-se vivo à custa de reações metabólicas (físico-químicas) que geram a energia necessária à vida (DANTAS. 1987). Esta prática pretende, desta forma, proporcionar o equilíbrio ou homeostase do organismo.

1.2 MEDICAMENTO IMUNOMODULADOR HOMEOPÁTICO

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

Este composto imunomodulador homeopático (IH) é um medicamento homeopático brasileiro produzido a partir de *Aconitum napellus*, *Thuya occidentalis*, *Bryonia alba*, *Lachesis muta* e *Arsenicum álbum*. É manipulado na farmácia homeopática Homeoterápica e resultados clínicos mostram uma grande melhora dos pacientes, confirmando o sucesso do tratamento (DI BERNARDI, R.P, 2005; STROPARO, E. 2005). Como apresenta ação imunomoduladora, este medicamento é indicado em patologias em que o sistema imunológico do indivíduo encontra-se comprometido, tais como hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e neoplasias, podendo ser utilizado sozinho ou em associação a outros medicamentos. Resultados clínicos mostram que o indivíduo responde melhor ao tratamento

convencional se utilizar simultaneamente esse medicamento, que diminui os efeitos colaterais, como as infecções oportunistas e anemia. Na verdade o paciente melhora por ativar uma determinada resposta imunológica, protegendo o organismo contra a citotoxicidade dos medicamentos convencionais (OLIVEIRA et al, 2008).

1.3 MEDULA ÓSSEA

O tecido conhecido como medula óssea é encontrado na cavidade medular dos ossos longos e nos interstícios dos ossos esponjosos, altamente vascularizados. Este tecido tem uma estrutura anatômica que permite a sobrevivência, multiplicação e diferenciação de células progenitoras. O microambiente medular é constituído, portanto, de células do estroma, matriz extracelular, fatores de crescimento e células progenitoras. (KONDO et al., 2003). Este ambiente permite uma interação entre as células do estroma e as hematopoiéticas (HAYLOCK et al., 1994). Esta interação é dependente, pelo menos em parte do contato por adesão célula/célula às proteínas da matriz extracelular. (PAUL et al., 1991; JARVIS et al., 1997).

O microambiente medular murino é constituído de uma extensa rede de colágeno, glicoproteínas, fibronectina e laminina, bem como células do estroma, endoteliais, macrófagos, fibroblastos, adipócitos e células reticulares (ZUCKERMAN e WICHA, 1983). As células do estroma favorecem, neste ambiente, uma rápida expansão das células progenitoras, estimulando ou inibindo processos apoptóticos (KAMEOKA et al., 1995).

1.3.1 CÉLULAS -TRONCO

São células indiferenciadas, capazes de se proliferar e originar outras células-tronco (o que é denominado auto-regulação) e também de se diferenciar, originando células em condições de funcionalidade normal. Para realizar a dupla tarefa de se auto-regenerar e ao mesmo tempo produzir células diferenciadas, a célula-tronco pode seguir dois modelos básicos de divisão celular. O determinístico onde a divisão de uma célula-tronco gera invariavelmente uma nova célula-tronco e uma que irá se diferenciar;

ou o aleatório ou estocástico, onde algumas células-tronco geram apenas células com potencial para sofrer diferenciação (WOLPERT et al., 2000; KONDO et al., 2003).

As células-tronco presentes na medula óssea de organismos adultos originam as células sanguíneas, além de células que formam e mantêm o estroma medular. As células-tronco hematopoiéticas apresentam extensivo potencial de auto-renovação e proliferação associado à capacidade de se diferenciar em progenitoras e manter todas as células sanguíneas (eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, monócitos, macrófagos, linfócitos T, B e NK, células dendríticas, megacariócitos e plaquetas). Essas características são demonstradas pela capacidade de reconstituir a hematopoiese completa, após transplante, em um recipiente cuja medula óssea foi destruída completamente (QUESEMBERRY & COLVIN). As células-tronco hematopoiéticas (HSCs –hematopoietic stem cells) representam uma pequena fração celular da medula óssea, cerca de 0,5% das células nucleadas (LORD. 1997). Na presença de determinadas citocinas na cultura podem se diferenciar em linhagens celulares específicas (BARRY & MURPHY. 2004).

A célula-tronco hematopoiética apresenta capacidade de multiplicação e de diferenciação como qualquer célula-tronco. As de camundongos podem ser subdivididas em três subpopulações: HSCs de longa duração (0,005 – 0,01%), que são as mais primitivas e apresentam a capacidade de se auto-renovar por toda a vida do organismo; HSCs de curta duração, que apresentam uma capacidade limitada de auto-renovação; células multipotentes, as quais não apresentam capacidade de auto-renovação (KONDO et al. 1997; WHETTON & GRAHAM. 1999). Enquanto estão aderidas algumas células mantêm-se indiferenciadas, mas outras já se apresentam comprometidas com alguma linhagem celular e, após esse comprometimento, essas células já poderão se desligar das células estromais e se mobilizar para o sangue periférico (KONDO et al. 2003; FUCHS et al. 2004).

A adesão das HSCs ao estroma é ativada por citocinas como SCF (*stem cell factor - c-kit ligand, steel factor, mast cell growth factor*), GM-CSF (*granulocyte monocyte colony stimulating factor*) e IL-3 (*interleucina 3*) que poderão atuar, por exemplo, através da ativação de integrinas, como, VLA-4 e VLA-5 (*very late antigen group*) (WHETTON & GRAHAM. 1999). Como as células do sangue periférico

apresentam tempo de vida limitado e precisam ser substituídas regularmente, as células-tronco hematopoiéticas estão continuamente se proliferando para atender essa demanda fisiológica. Em caso de dano em algum outro tecido do organismo, poderá ocorrer mobilização dessas células, sendo o dano um estímulo para que esse tipo celular se diferencie e promova o reparo da estrutura danificada (KONDO et al. 2003; FUCHS et al. 2004). Muitas citocinas estão envolvidas neste fenômeno, como G-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos), GM-CSF, IL-11, IL-3, IL-8, SCF e Flt-3 ligante.

Outra característica das HSCs é o *homing* que corresponde ao caminho contrário, ou seja, capacidade que essas células possuem de migrar do sangue periférico para a medula óssea (KONDO et al. 2003). Esse fenômeno foi conservado durante a evolução e tem a finalidade de repopular a medula óssea, se necessário. Nesse mecanismo estão envolvidos receptores, substâncias quimiotáteis e proteínas adesivas (WHETTON & GRAHAM. 1999). A ação combinatória e compensatória dos heterodímeros de $\alpha\beta$ integrina está envolvida no *homing* das células tronco e suas progenitoras (KONDO et al. 2003). Outra molécula importante neste fenômeno é a quimiocina *stromal cell-derived factor -1* (SDF-1), a qual regula a migração das HSCs durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta. O receptor dessa quimiocina é a molécula CXCR4 – receptor de quimioatração (WHETTON & GRAHAM. 1999). Um importante exemplo da ocorrência desse mecanismo é o retorno das células tronco para a medula óssea, após um transplante (KONDO et al. 2003).

Existem dois tipos de células-tronco hematopoiéticas, a progenitora mielóide que dará origem aos granulócitos, monócitos/macrófagos, células dendríticas, eritrócitos e megacariócitos e a progenitora linfóide que resultará nos linfócitos T, B, natural killers e células dendríticas (ABBAS et al. 2000).

A linhagem mielóide inclui a série dos monócitos/macrófagos e a série dos granulócitos ou células polimorfonucleadas (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). Essas populações correspondem à maioria das células medulares nos humanos (LORENZI. 1999). Os macrófagos são considerados os fagócitos mais eficientes apresentando também uma importante função na imunidade adaptativa, cooperando com as células T e B como apresentadoras de antígenos e como produtoras de citocinas. Os macrófagos

e as células dendríticas apresentam origem comum (KATSURA. 2002). Essa linhagem também inclui a série eritróide que é composta pelos eritrócitos (células vermelhas do sangue) e seus precursores. Os eritrócitos apresentam a função de transportar o oxigênio através dos vasos sanguíneos (KATSURA. 2002). A série megacariocitóide também se origina dessa linhagem e inclui as plaquetas derivadas dos megacariócitos. As plaquetas operam na homeostasia do sistema vascular (KATSURA. 2002).

A linhagem linfóide produz as respostas imunes específicas são mediadas pelos linfócitos, células do organismo capazes de reconhecer e distinguir especificamente determinantes antigênicos diferentes (ABBAS. 2000).

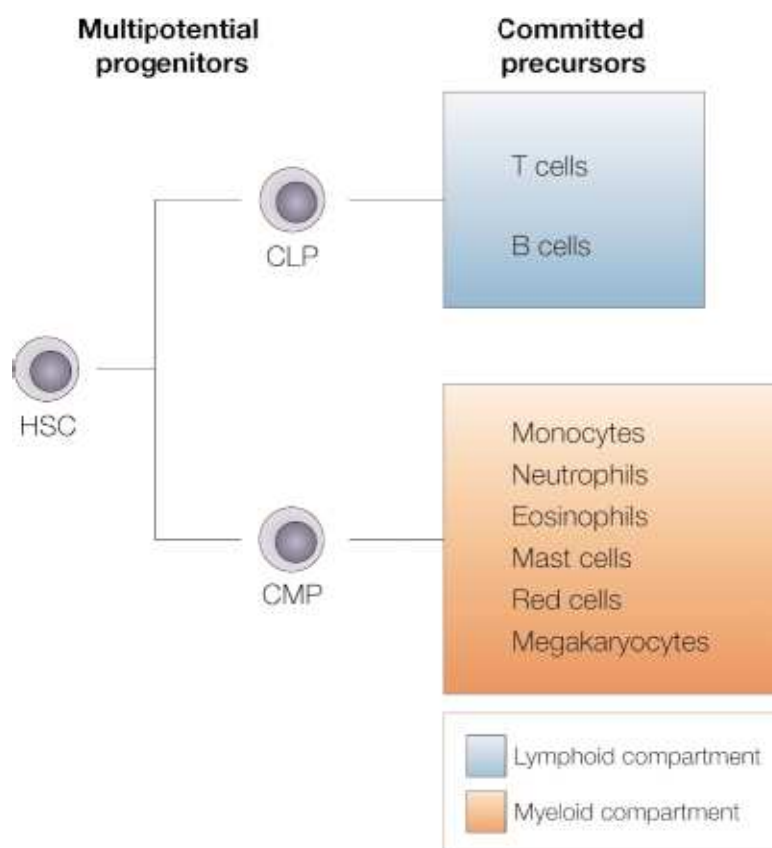


Figura 1 - Visão esquemática da hematopoiese adulta. HSC – célula tronco hematopoiética; CLP, progenitora linfóide; CMP, progenitora mielóide. O compartimento mielóide inclui os tipos celulares indicados, mas o termo “célula mielóide” é usado para se referir aos monócitos/macrófagos e granulócitos. ORKIN S. H. Diversification of Haematopoietic Stem Cells to specific lineages. **Nature Reviews** vol. 1 p. 57-64, 2000

Após a diferenciação demonstrada na figura 1 e migração celular, o sangue periférico apresentará as seguintes células: eritrócitos ou hemácias; granulócitos; monócitos (os quais migram para os tecidos onde se transformarão em macrófagos ou células dendríticas); linfócitos e plaquetas.

Estudos *in vitro* das células medulares de camundongos demonstraram que, na presença de GM-CSF, predominam os neutrófilos na população sobrenadante, enquanto os macrófagos encontram-se altamente aderidos aumentando seu número após uma semana e, as células dendríticas encontram-se em agregados fixados ao estroma medular as quais se soltam facilmente. Na presença de M-CSF (fator de diferenciação para monócitos/macrófagos – **macrophage cell stimulating factor**) um grande número de macrófagos prolifera e se encontra firmemente aderido à superfície. Células dendríticas ou agregados desse tipo celular não aparecem. Se for realizada uma cultura misturando o GM-CSF e o M-CSF, células aderentes e agregados de granulócitos e células dendríticas se desenvolvem (INABA et al. 1992).

A seguir serão descritas as principais células diferenciadas, derivadas das células-tronco hematopoiéticas.

1.3.2 CÉLULAS DIFERENCIADAS

1.3.2.1 LINFÓCITOS

Os linfócitos se originam na medula óssea, migram e se desenvolvem nos órgãos linfóides primários – os linfócitos T no timo e os linfócitos B na bursa de Fabrícus, nas aves, ou no fígado fetal e medula óssea em mamíferos. Após seu desenvolvimento essas células migram para os tecidos linfóides secundários onde poderão responder aos antígenos (ROITT. 1999). Os linfócitos B, ao se encontrarem com antígenos, transformam-se em plasmócitos, células que secretam anticorpos capazes de reagir com antígenos solúveis. Os linfócitos T, expressam peptídeos protéicos associados a molécula apresentadora de antígeno que se expressam na superfície do outras células (COOPER. 2002).

Os linfócitos, quando fixados e corados, apresentam-se como células pequenas, com núcleo grande em relação ao tamanho da célula (LORENZI. 1999), sendo que os subgrupos T e B são indistintos morfológicamente.

Muitos linfócitos maduros possuem uma vida média longa e podem persistir como células de memória por muitos anos (ROITT. 1999).

A via de maturação das células T pode ocorrer nas culturas de medula óssea durante 48 horas (DEJBAKSHSH-JONES & STROBER. 1999).

O timo é o principal local de maturação das células T. No entanto, a ausência congênita do timo, que ocorre na síndrome de DiGeorge no homem ou na raça de camundongos *nude*, é caracterizada pelo baixo número de células T maduras na circulação e nos tecidos linfóides periféricos, mas não ausência dessas células funcionais. Esses dados sugerem que podem existir locais extratímicos de amadurecimento destas células (ABBAS. 2000). Com isso, muitos locais têm sido propostos como detentores dessa capacidade como, por exemplo, a medula óssea, os linfonodos mesentéricos e do intestino. A habilidade das culturas de medula óssea de apresentarem elementos que promovam a maturação de células T tímicas indica que o microambiente do timo não é o único que apresenta capacidade de promover a maturação das células T. Entretanto, a via alternativa de desenvolvimento de células T na medula parece estar sob um rigoroso controle regulatório e é quase completamente inibida *in vitro* quando estão presentes células T maduras (DEJBAKSHSH - JONES & STROBER. 1999).

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos. Seus receptores antigênicos são imunoglobulinas ligadas à membrana e a interação dos antígenos com estas moléculas de anticorpos darão início à seqüência de ativação das células B, e culmina com o desenvolvimento de células efetoras que secretam ativamente moléculas de anticorpo (ABBAS. 2000). O CD45R (B220) está presente em todas as células B, desde as pré B até as maduras e ativadas (www.bdbiosciences.com).

1.3.2.2 MONÓCITOS / MACRÓFAGOS

O monócito é o progenitor imediato do macrófago. Apresenta atividade fagocítica, mas, o promonócito apresenta uma capacidade fagocítica e um sistema

lisossomal ainda mais desenvolvido. Normalmente o monócito perde sua capacidade proliferativa, embora em certas condições, possa chegar a dividir-se. Desta forma a população basal de monócitos na medula óssea é um processo regulado pelo balanço entre os fatores de crescimento (M-CSF, GM-CSF e IL-3), produzidos pelas próprias células durante a diferenciação e por células do estroma medular (VILA. 2002). O monócito é capaz de deixar a medula óssea, passar pela corrente sanguínea e chegar aos tecidos graças a uma interação entre moléculas de adesão (adesinas e integrinas) existente na superfície dos monócitos e células do endotélio vascular. Esse processo pode ser regulado de acordo com as necessidades do organismo (inflamação, isquemia, necrose, apoptose, etc) produzindo uma diminuição do fluxo sanguíneo assegurando que os monócitos e as células endoteliais se inter-relacionem mais facilmente, favorecendo assim o extravasamento dos monócitos para os tecidos. Uma vez nos tecidos, o monócito finaliza a sua maturação e se converte em macrófago. Esse processo culmina em um elevado tamanho celular e em um maior desenvolvimento do sistema lisossomal e conteúdo das enzimas hidrolíticas. Ocorre também um aumento no número de mitocôndrias e, conseqüentemente, do metabolismo energético. A vida dos macrófagos nos tecidos pode ser muito grande (meses/anos), embora muitos macrófagos maduros acabem desaparecendo por morte celular. Nos tecidos, um pequeno número de macrófagos se diferencia por influência de citocinas, e se convertem em células com atividades específicas para aquele microambiente. Citamos as micróglia do sistema nervoso central, os osteoclastos do tecido ósseo, os histiócitos do conjuntivo, as células de Kupfer do fígado, nas células de classe A do tecido sinovial, em células de Langerhans da derme e em células dendríticas. Todas estas células pertencem à linhagem macrofágica. Estes macrófagos tissulares são capazes de proliferar e permanecer em condições basais (não ativados), graças à presença de M-CSF (produção autócrina), assim como a presença de citocinas e outros fatores de crescimento não específicos como GM-CSF e IL-3 (CELADA, A., e MAKI, R.A. 1992). Quando estas células são estimuladas por mediadores produzidos em focos de inflamação, deixam de proliferar e passam a ativar-se aumentando desta forma, a capacidade de atuar em suas funções específicas. Em condições fisiológicas o IFN- γ é um agente ativador dos macrófagos. O lipopolissacarídeo (LPS), principal produto da

parede das bactérias Gram-negativas, também pode ativar muitas funções dos macrófagos. Em caso contrário, quando ocorre ausência de estímulos nos tecidos, os macrófagos morrerão por apoptose. Desta forma se estabelece um balanço entre a produção de células da medula óssea e a eliminação da maioria em nível tissular (XAUS. 2000). Uma vez nos tecidos, os macrófagos desempenham um papel crítico no desenvolvimento da resposta imunológica. Estas células atuam como mediadoras de inúmeros caminhos diferentes dentro da resposta imunológica, não apenas participando da imunidade natural, como também estão adaptados para desempenhar funções especiais na imunidade adquirida, tanto humoral quanto mediada por células. Na forma basal, os macrófagos se encontram em condições de realizar uma série de funções sem a necessidade de nenhum tipo de estímulo, mesmo que muitas destas atividades possam ser realizadas de forma mais eficaz após ativação celular. Algumas reações são realizadas devido à interação célula-célula, ou indiretamente mediante a liberação de substâncias capazes de afetar outras células. Neste nível o macrófago possui um repertório muito extenso de fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos que englobam agentes mitogênicos, quimiotáticos e indutores de apoptose (NATHAN. 1987). No contexto da imunidade natural, os macrófagos fagocitam e eliminam partículas estranhas, tais como bactérias, vírus, parasitas, macromoléculas, incluindo as próprias células danificadas ou mortas, como no caso dos eritrócitos velhos e de células apoptóticas. Assim impedem que estas possam extravasar seu conteúdo para o meio extracelular e evitando o desencadeamento de processos inflamatórios.

Durante a resposta imunológica mediada por células, os macrófagos funcionam como células apresentadoras de antígeno (APC), ou seja, processam antígenos estranhos e os apresentam na sua superfície para que possam ser reconhecidos pelos linfócitos T. Também produzem uma série de proteínas que uma vez expressas ou secretadas, promovem a ativação dos linfócitos T. Finalmente, os macrófagos também participam da eliminação de antígenos estranhos durante a resposta imunológica humoral. Por outro lado, estas células liberam proteínas do complemento, que, juntamente com os anticorpos, recobrem a superfície de um grande número de antígenos, processo conhecido como opsonização. Desta forma os macrófagos expressam em, sua superfície, receptores específicos, tanto para a fração constante

das imunoglobulinas como para as proteínas do complemento. Assim, este processo de reconhecimento e fagocitose de antígenos estranhos opsonizados torna-se amplificado (BUCHI & SOUZA. 1992). O CD11b/Mac-1 é o principal receptor dessas células, sendo caracterizado como uma importante molécula de adesão e está envolvido na migração celular transendotelial até a região da inflamação. A expressão desse marcador está intimamente relacionada com a capacidade de polimerização da actina, principal componente do citoesqueleto envolvido na fagocitose (BROM et al. 1995).

1.3.2.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas apresentam papel importante na regulação de respostas imunológicas contra vários antígenos incluindo alergênicos, agentes infecciosos e tumores (CITTERIO et al. 1999). São apresentadoras de antígenos profissionais e quando ativadas por um estímulo inflamatório, migram para os órgãos linfóides e regulam as respostas mediadas pelas células T. Durante a migração, aumenta em sua superfície, a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimulatórias além de tornarem-se competentes para ativar células B e T (CITTERIO et al. 1999). As células imaturas apresentam uma aderência fraca e quando maduras encontram-se em suspensão. Como apresentam capacidade de aderência, expressam altos níveis de moléculas de adesão (CITTERIO et al. 1999). Estas células podem estar comprometidas com as linhagens mielóide e linfóide (KATSURA. 2002).

Culturas de tecidos hematopoiéticos de camundongos, como baço e medula óssea, podem dar origem a esse tipo celular. As células imaturas expressam grandes quantidades de moléculas MHC de classe I e baixas quantidades de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias, além de apresentarem alta capacidade fagocítica. No estágio maduro, perdem sua capacidade fagocítica, adquirem alta atividade coestimulatória de células T, altos níveis de moléculas MHCII e de moléculas coestimulatórias (CITTERIO et al. 1999).

O fator estimulador de colônia de granulócitos/monócitos/macrófagos (GM-CSF) apresenta um profundo efeito na viabilidade, função e crescimento das células dendríticas, sendo considerado um fator estimulante de granulócitos,

monócitos/macrófagos e células dendríticas (INABA et al. 1992). Outras citocinas também apresentam ação sobre esse tipo celular, como IL-4, TNF α e *stem cell factor* (SCF) (CITTERIO et al. 1999).

As células dendríticas, na presença dos fatores de crescimento, precisam de duas semanas em cultura para se tornarem maduras e, na ausência destes fatores aderem-se novamente, perdendo seu fenótipo estimulatório (CITTERIO et al. 1999).

O sangue humano apresenta, aproximadamente, 1% deste tipo celular e estas células expressam níveis significantes de molécula CD4 (CITTERIO et al. 1999).

Essas células se desenvolvem a partir de um agregado em proliferação, formado a partir de um precursor. Esse agregado se adere às células do estroma ou à superfície da cultura. Durante a diferenciação das células dendríticas, ocorre um aumento progressivo dos processos celulares, como aumento da expressão de moléculas MHCII, aparecimento de antígenos de superfície e intracelulares e uma progressiva diminuição da aderência ao plástico (INABA et al. 1992).

A capacidade que a medula óssea apresenta, de gerar células dendríticas em cultura é grande. *In situ* este fenômeno acontece em menor freqüência já que não se encontram esses tipos celulares maduros, em grande quantidade, na medula e sangue periférico de camundongos (INABA et al. 1992).

As referidas células podem ser consideradas como versáteis adjuvantes, com capacidade de apresentar antígenos tumorais em diferentes vias, induzindo uma terapêutica imunidade antitumoral (CITTERIO et al. 1999).

O principal marcador desse tipo celular é o CD11c (www.bdbiosciences.com).

1.3.2.4 GRANULÓCITOS

Os granulócitos apresentam este nome porque contêm abundantes grânulos citoplasmáticos. São conhecidos também como leucócitos polimorfonucleares (núcleos multilobados). Esses leucócitos podem ser chamados de células inflamatórias porque desempenham papéis importantes na inflamação e imunidade inata, eliminando microorganismos e tecidos mortos. Do mesmo modo que os macrófagos, os granulócitos são estimulados pelas citocinas derivadas das células T e fagocitam partículas opsonizadas, dessa maneira também servem a importantes funções efetoras

nas respostas imunes específicas (ABBAS. 2000). São três os tipos dos granulócitos, classificados de acordo com o conteúdo dos seus grânulos predominantes, os quais podem ser distinguidos após fixação e coloração:

- Neutrófilos: perfazem cerca de 95% dos granulócitos circulantes, possuem núcleo multilobado característico e compõem a principal população celular na resposta inflamatória aguda.
- Eosinófilos: perfazem 2 a 5% dos leucócitos sanguíneos, em indivíduos saudáveis, agindo na defesa contra certos tipos de agentes infecciosos. São também abundantes nos sítios de reações de hipersensibilidade imediata (alérgica), contribuindo para a lesão e inflamação teciduais.
- Basófilos: correspondem a menos de 0,2% dos leucócitos da circulação, apresentando funções semelhantes à dos mastócitos teciduais. Quando estimulados, secretam seu conteúdo granular, que contém os mediadores químicos da hipersensibilidade imediata. Portanto, são células efetoras da hipersensibilidade imediata (ROITT. 1999; ABBAS. 2000).

Da população granulocítica, quem está presente em grande quantidade na medula óssea são os neutrófilos, sendo que eosinófilos e basófilos são raros (INABA et al. 1992).

O marcador característico dessas células de camundongos é o Ly-6G (www.bdbiosciences.com).

1.3.2.5 ERITRÓCITOS

As células eritrocíticas precursoras se encontram em pequena quantidade na medula óssea, sendo que, aproximadamente, 0,1% corresponde a unidades formadoras de colônias de células vermelhas e 0,5% equivale ao total de proeritroblastos (ZHANG et al. 2001).

O marcador TER-119 é altamente específico de células eritróides maduras e está presente desde o estágio de proeritroblasto até o eritrócito maduro, não estando presente nas unidades formadoras de blastos (BFU-E) e de colônias (CFU-E) (KINA et al. 2000). Em camundongos adultos, células TER-119⁺ correspondem a 20-25% das

células da medula óssea (KINA et al. 2000). Essas células também expressam um nível significativo de CD45, mas não apresentam CD11b, Ly-6G ou CD45R em sua superfície. Como o marcador CD45 exerce um papel na regulação da sinalização das células hematopoiéticas, sugere-se que o CD45 está funcionalmente envolvido na regulação dos estágios posteriores de diferenciação das células eritróides da medula óssea adulta (KINA et al. 2000).

As células eritróides passam por vários estágios de diferenciação, desde a precursora até a formação da hemácia. Estes estágios são os seguintes: proeritroblasto (PE) – apresenta núcleo redondo e grande capacidade de multiplicação; eritroblasto basófilo (EB) – apresenta-se pouco menor que o PE e tem capacidade de divisão celular. O núcleo já está menor que na célula anterior; eritroblasto policromatófilo (EPC) – é o precursor encontrado em maior proporção nos esfregaços da medula óssea. Tamanho menor e núcleo ainda menor que na célula anterior. Neste estágio, já ocorre síntese de hemoglobina; eritroblasto ortocromático (EOC) – célula menor, citoplasma já repleto de hemoglobina. Estas células perdem os núcleos no parênquima medular, que são fagocitados pelos macrófagos medulares, podendo então atravessar as paredes dos capilares sinusóides e entrar na corrente sanguínea; reticulócito (Rt) – apresenta diâmetro pouco maior que o da hemácia e não tem núcleo, está presente no sangue em torno de 1 a 1,5% do total de hemácias e corresponde às células recém-lançadas na circulação; eritrócitos (hemácias) – possui cerca de 7 μ de diâmetro e a forma de disco bicôncavo. Apresenta excesso de membrana citoplasmática, com a finalidade de suportar o conteúdo hemoglobínico que transporta (LORENZI. 1999).

1.3.2.6 CÉLULAS COM NÚCLEO EM ANEL

BIERMANN e colaboradores, 1999, citam que leucócitos com núcleo em anel, são encontrados na medula, sangue periférico, infiltrado inflamatório, mas também em alterações mieloproliferativas. São usualmente referidos como polimorfonuclear, mas foi demonstrado que podem estar envolvidos em diferentes tipos de células mononucleares. São classificados em 3 subgrupos: o primeiro contém monócitos/macrófagos de acordo com a ultraestrutura, imunofenotipagem, atividade

esterase não específica, e fagocitose da *Leishmania major*, o segundo apresenta precursor de células mielóides e mostram na ultraestrutura um modelo de peroxidase ativa compatível com mielócitos, promielócitos ou promonócitos; o terceiro grupo apresenta um núcleo largo e lobulado, marcado por c-kit+ and sca-1+, e assim pertencendo muito próximo de célula-tronco hematopoiética murino. No sangue periférico compreendem polimorfonuclear e linhagem monocítica. Assim, células com núcleo em anel compreendem formas precursoras e maduras dentre as mielóides

1.3.3 MICROAMBIENTE OU ESTROMA MEDULAR

Como já foi citado, para que ocorra a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células-tronco, é necessário que exista um local em que possam se fixar. Esse parênquima de sustentação que inclui várias moléculas de matrix extracelular (MEC), apresenta grande vascularização e é composta por células - tronco mesenquimais e células originadas desse tipo celular (CROFT & PRZYBORSKI. 2004), que darão origem a células ósseas e cartilaginosas. Apresenta também adipócitos, células reticulares, fibroblastos e células endoteliais. Contém também macrófagos e linfócitos (HAYLOCK et al. 1994). Os adipócitos aparecem após algumas semanas, em culturas de longa duração (cultura de Dexter) (DEXTER et al. 1976), e apresentam um papel positivo no suporte e na proliferação das unidades formadoras de colônias de granulócitos/monócitos (GM-CSF) de camundongos, mas não apresentam a mesma função para essas células humanas (TOUW & LOWENBERG. 1983).

Existem estudos indicando que o compartimento estromal é altamente adaptativo e apresenta a capacidade de alterar sua função em resposta a estímulos externos, com isso se especula o papel do estroma na tradução de sinais da periferia para as células-tronco (MÜLLER-SIEBURG & DERYUGINA. 1995).

O microambiente medular apresenta então distintos moduladores que atuam sinergicamente para influenciar a sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento das células hematopoiéticas em todos os seus níveis de diferenciação.

Após o devido comprometimento com alguma linhagem celular, essas células já poderão se desligar do estroma medular e se dirigir para os diferentes tecidos (FUCHS et al. 2004).

1.3.4 FATORES DE CRESCIMENTO E INTERLEUCINAS

São glicoproteínas que agem em pequenas concentrações sobre moléculas receptoras regulando a sobrevivência, morte, proliferação e diferenciação celular (QUESEMBERRY & COLVIN. 2001). Aqui o enfoque será sobre as citocinas envolvidas na hematopoiese. Essas substâncias são os fatores de crescimento ou fatores estimuladores de colônia (CSFs) e as interleucinas (ILs) (ABBAS, 2000). Estão presentes em quantidades mínimas no microambiente medular, atuando sobre células-alvo através de receptores celulares de membrana, capazes de reconhecê-las. Uma vez fixadas à superfície da membrana das células indiferenciadas, iniciam sua ação por meio de receptores específicos presentes no citoplasma e núcleo da célula-alvo (ABBAS, 2000). Existe uma ação conjunta dos fatores de crescimento sobre as células e a ligação dessas células ao estroma medular através das moléculas de adesão ali presentes, propiciando então a proliferação e/ou a diferenciação celular (ABBAS, 2000).

Os CSFs demonstraram efeitos benéficos quando utilizados na terapia do câncer. Por exemplo, administração de G-CSF reduz a incidência de neutropenia febril e diminui o tempo de hospitalização do paciente que recebe apenas quimioterapia ou está conjugada ao transplante de medula óssea autólogo (MOORE. 1991; OTTMANN & HOLZER. 1998).

Já se sabe da existência de inúmeras citocinas envolvidas no desenvolvimento das células hematopoiéticas, sendo que as principais estão apresentadas na Tabela 1 a seguir.

TABELA 1: CITOCINAS IMPORTANTES NA HEMATOPOIESE E NO DESENVOLVIMENTO CELULAR.

NOME	FONTES (células)	CÉLULAS-ALVO	EFEITOS BIOLÓGICOS
G-CSF	células do estroma medular	células granulocíticas jovens	estimula a diferenciação e formação de colônias de granulócitos
GM-CSF	células do estroma medular	células granulocíticas/ monocíticas jovens	estimula a diferenciação e formação de colônias de granulócitos e monócitos
M-CSF	células do estroma medular (fibroblastos)	células monocíticas jovens	estimula a diferenciação e formação de colônias de monócitos
IL-2	células T	células T, B e NK	crescimento e produção de citocinas; crescimento e síntese de anticorpos; crescimento e ativação, respectivamente
IL-3	linfócitos T e NK, células mielóides e macrófagos	células tronco	estimula a hematopoiese como um todo (todas as linhagens derivadas das células tronco)
IL-4	células T CD4 ⁺ , mastócitos	células B, T e endotelial	troca de isótipo para IgE; crescimento e diferenciação; ativação respectivamente
IL-5	células T	Eosinófilos	ativação e produção
IL-6	vários tipos celulares	células B, T e CFU-B	estimula a megacariopoiese e age em sinergismo com IL-1, 2, 3, 4 e GM-CSF
Trombo-Poetina	células endoteliais	megacariócitos e plaquetas	proliferação e diferenciação dos megacariócitos
IL-7	células do estroma medular (fibroblastos)	linfócitos B	estimula o crescimento e diferenciação dos linfócitos B na medula óssea
Ligante do c-kit	células do estroma da medula óssea	células tronco	aderência das células tronco ao estroma medular
INFγ	Células T e NK	fagócitos mononucleares, células endoteliais, todas do sistema imune	ativação; ativação; aumento das moléculas do MHC de classe I e II, respectivamente
Eritropoetina (EPO)	células intersticiais do córtex renal externo e macrófagos	células eritrocíticas jovens	estimula a diferenciação dos eritroblastos e a produção de hemoglobina no citoplasma
MIP-1α	células mononucleares	células progenitoras	inibe a formação de colônias de células multipotentes mas, concomitantemente, estimula as colônias precursoras
INF-α, β e γ	células mononucleares	células progenitoras	inibem CFU-MIX, CFU-GM, BFU-E e inibem ou estimulam a produção de citocinas
TGF-β	células mononucleares	células progenitoras	suprime as células progenitoras iniciais mas estimula as progenitoras tardias
TNFα	Fagócitos, mononucleares e células T	células progenitoras	similar ao TGF- β mas com efeito mais pronunciado sobre BFU-E e CFU-E

Fonte: ABUD, A.P.R. 2005

1.3.4.1 FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS - M-CSF

Essa citocina corresponde ao principal fator para crescimento, proliferação, diferenciação e maturação de macrófagos e seus precursores. É encontrada em extratos de tecidos, bem como no sobrenadante de culturas de células e de órgãos (BARREDA et al. 2004).

O M-CSF é sintetizado por uma variedade de tipos celulares, incluindo células endoteliais e fibroblastos que compõem as células estromais da medula óssea, osteoclastos, células epiteliais do timo, queratinócitos, astrócitos, mieloblastos e células mesoteliais. Sabe-se também que algumas citocinas como GM-CSF, TNF- α , IL-1 e INF- γ podem colaborar no aumento da expressão de M-CSF pelos fagócitos mononucleares (BARREDA et al. 2004).

O receptor do M-CSF (CD115) é uma proteína tirosino-quinase que se expressa nas células da série monocítica, sendo utilizado também, para separar essas células da série granulocítica (GUILBERT et al. 1980). A ativação desse receptor desencadeia, intracelularmente, uma cascata de fosforilação e desfosforilação que culmina no desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular (BARREDA et al. 2004). No tecido hematopoiético, esse receptor é encontrado somente nas células da série monocítica. A produção desse fator pelas células estromais da medula óssea facilita o desenvolvimento dessas células progenitoras em nichos especializados (BYRNE et al. 1981). A ação desse fator pode ser visualizada *in vivo* pelo aumento do número de macrófagos no fígado e na cavidade peritoneal de camundongos (HUME et al. 1988). Em experimentos realizados em camundongos *knock out*, onde foi inibida a produção do M-CSF, os animais apresentaram deficiência de osteoclastos, ausência de dentes, desenvolvimento anormal dos ossos, diminuição do peso corporal, da fertilidade e do período de vida. Muitos desses efeitos podem ser revertidos com a administração de M-CSF recombinante em camundongos recém-nascidos. Esse fator está envolvido também na atividade quimiotática e fagocítica dos macrófagos (BARREDA et al. 2004).

A ação estimulatória do M-CSF resulta em aumento da produção de diversas citocinas como G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, TNF α e interferons. Está envolvida

também na produção de prostaglandina E, reativos de oxigênio e nitrogênio, que são indicativos de ativação celular (MOORE et al. 1980).

O M-CSF também apresenta ação terapêutica no tratamento do câncer e doenças infecciosas. Por exemplo, administração desse fator em pacientes com leucemia mielóide aguda, depois da quimioterapia, mostrou benefícios, como a diminuição do período de neutropenia. Também mostrou eficácia no controle de infecções em pacientes que receberam transplante de medula óssea (MOTOYOSHI et al. 1998).

1.4 RESULTADOS DE ESTUDOS ANTERIORES COM O MEDICAMENTO

Resultados diversos com o medicamento imunomodulador homeopático (IH), com animais de experimentação demonstraram que este, é totalmente inócuo, não sendo detectada dose letal média (DL50), mesmo quando uma dose injetável 100 vezes maior que a dose habitual foi utilizada. Esse medicamento também não apresenta genotoxicidade nem mutagenicidade identificável em nível cromossômico (SELIGMANN et al. 2002). Estudos anteriores demonstraram que o medicamento ativa macrófagos tanto *in vivo* e *in vitro* (LOPES et al. 2006). Foi observado que a produção *in vitro* do Factor de Necrose Tumoral - (TNF α) por macrófagos peritoneais é significativamente reduzida quando o medicamento é administrado (PIEMONTE & BUCHI. 2002). NADPH oxidase atividade foi aumentado, assim como a de óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), conseqüentemente produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), respectivamente (De OLIVEIRA et al. 2006). O medicamento estimula o aumento do sistema endosomal / lisossômico bem como a atividade fagocítica dos macrófagos quando interagiram com *Saccharomyces cerevisiae* e *Trypanosoma cruzi* epimastigotas (LOPES et al. 2006). Os efeitos imunomodulatórios foram observados *in vivo* e *in vitro* em experimentos com *Leishmania amazonensis* e com *Paracoccidioides brasiliensis*, controlando progressão infecção e limitando a sua disseminação (PEREIRA et al. 2005). Estudos clínicos fundamentam a ação imunomoduladora desse medicamento, pois demonstraram diminuição da carga viral e de doenças oportunistas de pacientes portadores de HIV/AIDS (DI BERNARDI, R.P,

2005; STROPARO, E. 2005). Do mesmo modo, a melhoria da resposta imunitária de ratos tratados foi demonstrada em estudos com Sarcoma 180. A redução do volume tumoral foi significativa, assim como a infiltração de células linfóides, granulação tecidual e fibrose ao redor do tumor. Todos os animais do grupo tratado sobreviveram e em 30% deles houve total regressão tumoral. O tratamento aumentou número absoluto de leucócitos no sangue periférico, e entre os linfócitos, as células T CD4, B e NK aumentaram (SATO et al. 2005)).

Estes resultados sugeriam uma ação direta ou indireta do medicamento sobre hematopoiese. Portanto células mononucleares retiradas da medula óssea foram tratadas com este medicamento, tanto *in vitro* como *in vivo*, e analisadas por microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia confocal e citometria de fluxo. Todas as técnicas de microscopia mostraram que o tratamento ativou as linhagens monocíticas (CD11b) bem como as células do estroma medular (aderentes) assim como o aumento da densidade celular sugerindo maior proliferação de células e diferenciação (ABUD et al. 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Resultados anteriores do laboratório já publicados, e resultados clínicos após o tratamento, sugerem ação do medicamento imunomodulador homeopático na medula óssea. Esta contém grande quantidade de monócitos, bem como macrófagos diferenciados no estroma, sendo um órgão crítico para o sistema imune, já que é a fonte de todas as células sanguíneas. Portanto, é necessário o estudo da ação deste medicamento sobre esse sistema, bem como sobre as células que aí se diferenciam.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar, *in vitro* e *in vivo*, os efeitos do tratamento com o medicamento imunomodulador homeopático na população de células mononucleares da medula óssea de camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do HI através da morfologia das células mononucleares de medula óssea de camundongos após o tratamento *in vivo* e *in vitro*, tanto da população sobrenadante, como aderente, utilizando microscopia de luz e eletrônica;
- Avaliar o efeito do HI na diferenciação e proliferação através da imunofenotipagem resultante do tratamento *in vivo* das células da medula óssea, utilizando citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito do HI, utilizando citometria de fluxo, para detectar e quantificar a liberação de citocinas pelas células monucleares no sobrenadante das culturas após o tratamento;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MEDICAMENTO IMUNOMODULADOR

O medicamento Imunomodulador homeopático (IH) é produzido e vendido na forma de gotas, inalante e flaconetes e vendido em farmácias autorizadas. Devido à sua formulação, é classificado como medicamento homeopático complexo e está registrado pelo ministério da saúde de acordo com Lei N. 5.991 / 73. Representa uma nova forma de imunoterapia e segue a farmacotécnica homeopática de Hahnemann na sua manipulação. As tinturas mãe são adquiridas a partir de fornecedores autorizadas indicados pelo Ministério da Saúde brasileiro. Estudos com animais de experimentação demonstraram que o medicamento é totalmente inócuo, não sendo detectada dose letal média (DL50), mesmo quando uma dose injetável 100 vezes maior que a dose habitual foi utilizada. Esse medicamento também não apresenta genotoxicidade, nem mutagenicidade identificável em nível cromossômico (SELIGMANN et al. 2002). O produto final contém 11DH *Aconitum napellus* (Ranunculaceae), 19DH *Thuja occidentalis* (Cupresaceae), 18DH *Bryonia alba* (Curcubitaceae), 18DH *Lachesis muta* (Viperidae), e 19DH *Arsenicum album* (trióxido de arsênio) diluídos em água e menos de 1% de álcool neutro. O produto final é uma solução aquosa, incolor e inodoro.

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos, adultos, machos albinos suíços da linhagem Rockefeller, com peso de 25 e 30 gramas, que tiveram livre acesso à ração e água. Os animais foram doados pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Todas as recomendações da Lei Nacional no. 6.638 de 5 de novembro de 1979 para manuseio científico de animais foi respeitada. A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA N° 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N° 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, certificou que os procedimentos utilizados neste trabalho estão

de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)”. Os experimentos de cultivo celular foram todos realizados no Laboratório de Cultivo de Células do TECPAR, o qual possui um programa de gestão de resíduos produzidos. As técnicas para microscopia eletrônica, microscopia de luz e imunofenotipagem, foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Células Neoplásicas e Inflamatórias da UFPR, o qual também possui um programa de gestão de resíduos produzidos.

4.3 OBTENÇÃO DO FATOR DE DIFERENCIAÇÃO PARA MONÓCITOS E MACRÓFAGOS (M-CSF)

As células da linhagem L929 (Anexo 1) foram cultivadas em garrafas (150 cm²), a uma concentração de 1×10^6 células por garrafa, em DMEM (Dulbeccos Modified Eagle's Medium) rico em glicose (Sigma Chem Co. St Louis, MO, U.S.A.), complementadas com 5% de SFB (soro fetal bovino) (Sigma Chem Co, St Louis, MO, U.S.A). O meio condicionado foi colhido após 7 dias, período em que as células chegaram a total confluência. O sobrenadante das culturas contendo M – CSF, foi centrifugado, filtrado e conservado a - 20°C até o momento da sua utilização. Pode ser conservado nestas condições por mais de seis meses. Depois de descongeladas, as alíquotas foram preservadas a 0°C, até o momento da utilização, para evitar a degradação do M – CSF.

4.4. PREPARAÇÃO CELULAR

4.4.1 COLETA DAS CÉLULAS DE MEDULA

Para cada experimento realizado foram utilizados, 20 camundongos por grupo, 5 para cada tipo de tratamento, para que se obtivesse um *pool* celular, os quais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Os fêmures foram dissecados e limpos no fluxo laminar. As epífises foram removidas e as células medulares retiradas com meio (Anexo 2) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), contendo 10% de

soro bovino fetal e suplementado com 1 $\mu\text{g/ml}$ ciprofloxacina (Sigma Pharma) and 4 mM L-glutamina (Sigma Chemical).

4.4.2 SEPARAÇÃO POR FICOLL

Após a coleta das células foi realizada a separação das células mononucleares em gradiente de FICOLL-HYPAQUE - densidade de 1,077 (Sigma Chem Co, St Louis, MO, U.S.A) (Anexo 3). Este método consiste numa mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa. O nome "Ficoll" é uma marca registrada atualmente de propriedade da [GE Healthcare Bio-Sciences](http://www.gehealthcare.com). Os gradientes de Ficoll-Hypaque são utilizados em laboratórios clínicos para separar os componentes celulares do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos, etc.). A mistura Ficoll-Hypaque é colocada no fundo de um tubo e as células da medula coletadas são vagarosamente colocadas sobre a fase de Ficoll. Após ser centrifugado, as duas fases tornam-se bem visíveis e a separação ocorre da seguinte maneira: na fase superior ficam o plasma e seus constituintes solúveis, na interface as células mononucleares, em seguida o Ficoll e então os eritrócitos e granulócitos, que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo, conforme pode ser visto na figura 2.

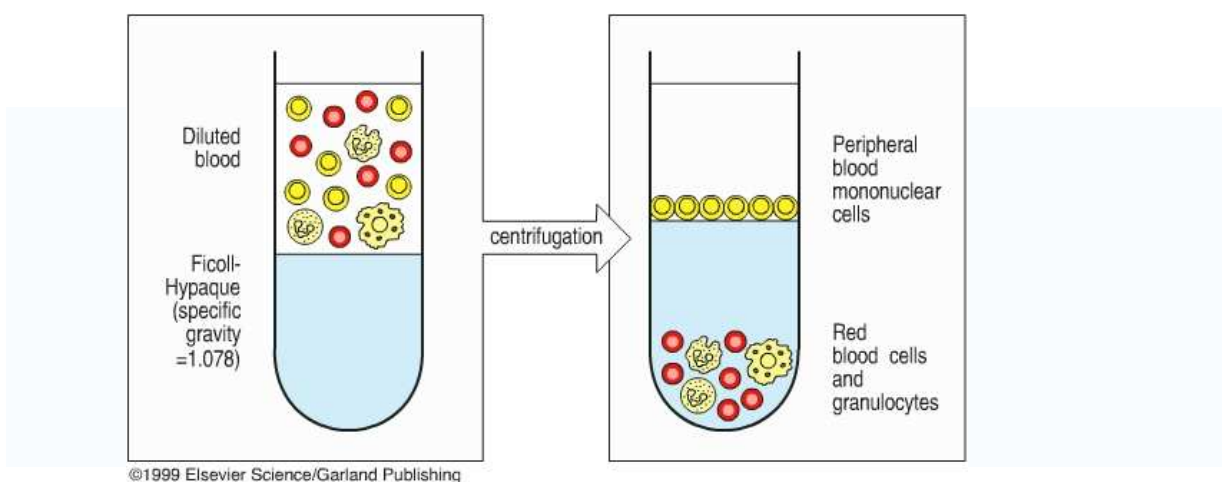


Figura 2: Esquema demonstrando o processo de separação das células mononucleares com auxílio do Ficoll-Hypaque. Disponível em: <http://www.lvapli.ufsc.br>

A camada de células mononucleares foi removida assepticamente e transferida para um tubo estéril 15 ml de centrífuga. As células foram lavadas com PBS, devido à toxicidade do Ficoll. Após esta etapa, as células foram contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em DMEM acrescido de 10% soro fetal bovino e 1 µg/ml ciprofloxacina (Sigma Pharma) e 4 mM L-glutamina (Sigma Chemical) e cultivadas em garrafas ou placas, conforme o experimento, e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

4.4.3 CULTURA CELULAR

As células foram mantidas em cultura por 24, 48, 72 e 96 horas, dependendo do experimento a ser realizado. Após a contagem celular, as células foram distribuídas e acondicionadas por uma hora. Ao término deste período, o tratamento era iniciado. Foram realizados quatro grupos: Controle, IH, IH+M-CSF e M-CSF. O controle não recebeu qualquer tratamento, o grupo IH recebeu 20% do medicamento em relação ao meio de cultura; o grupo M-CSF recebeu 30% desse fator de diferenciação e foi utilizado como controle positivo; o grupo IH 20% + M-CSF 30%. Os grupos que foram tratados com o medicamento receberam uma dose reforço diária de 1% em relação ao meio de cultura, até o término do experimento. Importante salientar que imediatamente antes de cada tratamento o IH deve ser vigorosamente agitado, processo este denominado de sucussão. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes com pelo menos três repetições cada.

Grupos de tratamento:

Grupo 1: Controle com meio de cultura, soro fetal e L-Glutamina;

Grupo 2: IH com 20% do medicamento em meio de cultura, soro fetal e L-Glutamina;

Grupo 3: IH com 20% do medicamento, 30% de M-CSF em meio de cultura, soro fetal e L-Glutamina;

Grupo 4: 30% do M-CSF em meio de cultura, soro fetal e L-Glutamina.

4.5 TRATAMENTOS

4.5.1 TRATAMENTO *in vitro*

O medicamento foi esterilizado por filtração e aplicado na concentração de 20% em relação ao meio de cultura. Após 24 horas, foi realizado o reforço do tratamento, adicionando-se 1% do medicamento em relação ao meio de cultura. Estas doses de reforço foram adicionadas diariamente até o término do experimento.

4.5.2 TRATAMENTO *in vivo*

Os animais utilizados para os ensaios *in vivo* foram tratados durante sete dias. Foram utilizados 5 animais por grupo, já que esse número foi suficiente para fornecer a quantidade de células necessária. Nos animais tratados foram administradas injeções subcutâneas de 7µl/g do peso do animal. Esse tratamento foi realizado a cada 24 horas até o término do experimento. Esses animais foram divididos em grupos, conforme descrito acima. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e analisadas. Todo experimento foi realizado com quadruplicata para cada tratamento e três repetições consecutivas.

4.5.3 TRATAMENTO *ex-vivo*

As células da medula óssea foram obtidas de camundongos submetidos ao tratamento *in vivo*. A coleta, separação e as condições de cultura foram realizadas da mesma maneira que os experimentos anteriores. As células do grupo controle foram obtidas de animais que não receberam nenhum tratamento.

4.6 ANÁLISES DO TRATAMENTO *in vitro*

4.6.1 CONTAGEM DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SOBRENADANTE DA CULTURA *in vitro*

Ao final de cada tempo de cultura, 48, 72 e 96 horas, uma alíquota do sobrenadante foi retirada da placa de 24 poços e contada em câmara de Neubauer. Em microscópio de contraste de fase foram contadas as células redondas e brilhantes; as que não apresentavam essa característica foram desprezadas. A concentração inicial de $2,5 \times 10^5$ células/poço foi comparada ao número encontrado para cada tratamento. Esta etapa foi sempre realizada antes da Análise Morfológica. Esta análise tem por

objetivo observar se o medicamento estaria atuando na proliferação das células do sobrenadante e/ou diminuindo as mesmas, tornando-as aderentes com o avançar do tratamento. Dessa forma alterando o número de células em relação ao número do plaqueamento inicial.

4.6.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As culturas foram estabelecidas em placas de 24 poços e as células foram plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células por poço. Como o objetivo desse experimento foi analisar as células tanto presentes no sobrenadante, quanto aderidas, lamínulas estéreis foram colocadas nos poços, no início do experimento, o que permitiu a análise das células aderentes (BUCHI E DE SOUZA, 1992). As células foram mantidas em cultura, como já foi descrito. Após 24, 48, 72 e 96 horas foram lavadas com PBS, fixadas em Bouin, coradas com Giemsa (Newprov), desidratadas e montadas com resina Entellan® como foi descrito no Anexo 4. As células aderentes foram observadas por microscopia de luz utilizando microscópio Nikon Eclipse E200, de acordo com o critério morfológico apresentado na tabela abaixo. Foi feita uma contagem de 100 células em campos aleatórios por lamínula, a qual era discriminatória de acordo com morfologia descrita na tabela 2. Foram realizados três experimentos em triplicata, resultando num total de 72 lamínulas contendo as células contadas para a análise estatística.

Célula	Núcleo	Citoplasma
Linfócitos	Pequeno arredondado com cromatina condensada	Muito pouco
Macrófagos residentes	Pequeno, condensado, central em forma de "rim"	Com poucas extensões e distribuído de forma alongada
Macrófagos ativados	Grande com eucromatina	Extenso e membrana com grandes prolongamentos
Nichos	Pequenos e ligeiramente arredondados, em anel ou em forma de "rim"	Dispostos em grumos é de difícil percepção
Núcleo em anel	Em forma de um anel podendo apresentar algumas constrições	Estreito e pode ser visto pelo anel nuclear

4.6.3 ANÁLISE DE CITOCINAS

Para esse experimento utilizou-se placa de 24 poços e a análise do sobrenadante aconteceu após 96 horas de cultura. As citocinas analisadas foram: interleucinas-2, 4 e 5 (IL-2, IL-4 e IL-5), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ). A incubação foi realizada de acordo com o protocolo do kit *Mouse Th1/Th2 cytokine CBA* (BD/Pharmingen), da BD Biosciences (Anexo 5) e as amostras foram analisadas com o citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o laser de íon argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho (FSC – *forward scatter*) e complexidade interna (SSC – *side scatter*), detectores de emissão de fluorescência FL1 (515-545 nm), FL2 (564-606 nm) e FL3 (>670 nm). Os dados foram analisados pelo *software Cell Quest* e adquiridos na forma linear para o parâmetro dispersão e na forma logarítmica para o parâmetro de fluorescência.

4.6.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Após 96 horas de cultura em garrafas, as células aderentes e não aderentes foram analisadas para microscopia eletrônica de transmissão (Anexo 6). As células não aderentes foram coletadas e centrifugadas para a formação de um pellet e então fixadas. As células aderentes foram fixadas na própria garrafa, por 60 minutos. Após esse período, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio e as aderentes foram cuidadosamente retiradas, com auxílio de um raspador borracha e coletadas. Foram então pós - fixadas em 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄), ferrocianeto e cloreto de cálcio, desidratadas em acetona e emblocadas em Epon. Os cortes ultrafinos foram contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila. Esse material foi então analisado com auxílio do microscópio eletrônico de transmissão JEOL - JEM 1200 EX II localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Imagens digitais foram obtidas com auxílio da câmera e do software GATAN CCD.

4.7 ANÁLISES DO TRATAMENTO *in vivo*

4.7.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

O procedimento utilizado para avaliação morfológica dos experimentos onde o tratamento foi administrado aos camundongos foi semelhante ao já descrito para os experimentos *in vitro*, exceto que apenas as células aderidas foram analisadas após 24, 48 e 72 horas de cultivo. Também foram observadas por microscopia de luz de acordo com o critério morfológico apresentado na tabela 2.

4.7.2 IMUNOFENOTIPAGEM

Após o término do tratamento, as células da medula óssea foram coletadas de acordo com o item 4.4.1, e foi realizada, então, a imunofenotipagem pelo Citômetro de Fluxo FACSCalibur. Este aparelho é equipado com o laser de íon argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho (FSC – *forward scatter*) e complexidade interna (SSC – *side scatter*), detectores de emissão de fluorescência FL1 (515-545 nm), FL2 (564-606 nm) e FL3 (>670 nm). Um total de 10.000 eventos foi verificado pelo aparelho e foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima de 1% da linha limite. Os dados foram analisados pelo *software Cell Quest* e adquiridos na forma linear para o parâmetro dispersão e na forma logarítmica para o parâmetro de fluorescência (Anexo 7). Nesse ensaio foram utilizados cinco anticorpos do sistema *Mouse Lineage Panel* (BD/Pharmingen) e o anti-CD11c, marcador de células dendríticas (BD/Pharmingen). Os anticorpos que compõem o sistema são: anti-CD3e, marcador de linfócitos T - o anticorpo CD3e é específico para a cadeia epsilon do complexo CD3; anti-CD45R (B220), marcador de linfócitos B; anti-CD11b (Mac-1), marcador de monócitos/macrófagos; anti-Ly-6G (Gr-1), marcador da série granulocítica; anti-TER-119 (Ly-76), marcador da série eritrocítica. Todos os anticorpos primários são biotinizados. Como marcador secundário usou-se estreptavidina conjugada ao

fluorocromo ficoeritrina. A estreptavidina apresenta afinidade pela biotina presente nos anticorpos primários, funcionando como um revelador.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com ANOVA (análise de variância), segundo delineamento inteiramente ao acaso. São dois fatores que constituem o tratamento e, portanto foi elaborado um esquema fatorial, com um fator tendo quatro níveis, a saber: controle, IH, IH+M-CSF e M-CSF. As análises foram feitas em três tempos (ex.: 24 horas, 48 e 72 horas), e compõe o outro fator, ou seja, um fatorial 4x3 (4 níveis do primeiro e 3 níveis do segundo), com um grau de liberdade igual a 12. Caso a diferença nos valores tenha dado significância, foram completados as análises com o teste de Tukey, onde se relacionam as médias duas a duas. Estes dois testes quando utilizados requerem que os dados tenham distribuição normal. Devido ao fato dos dados brutos apresentarem uma grande quantidade de zeros, houve necessidade de restaurar os dados e então foi utilizada a técnica de transformação dos dados e a fórmula $\sqrt{x+0.5}$. Foram feitas avaliações de cinco variantes, conforme a tabela x: linfócitos, macrófagos residentes, macrófagos ativados, presença de nichos e núcleos em anel. O nível de significância obtido foi para *p < 0.05, **p < 0.01.

5-RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO PILOTO

Um cultivo piloto foi efetuado para padronizar o número de animais necessários a fim de se obter o número adequado de células após a separação por Ficoll. Este cultivo das mononucleares foi efetuado em garrafas e placas de 24 poços e o acompanhamento registrado em microscópio de contraste de fase e microscopia de luz. A figura 3 destaca o aumento da densidade celular como resposta do tratamento.

5.2 RESULTADOS DO TRATAMENTO *in vitro*

5.2 .1 CONTAGEM DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SOBRENADANTE

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células e ao final de cada tempo de tratamento, de acordo com o item 4.6.1, o sobrenadante da cultura (células não aderentes) foi homogeneizado e contado em câmara de Neubauer. Destacamos neste experimento que os grupos 1 (controle) e 2 (IH) mostram uma tendência de diminuição do número de células do sobrenadante durante todo o tempo de cultura. Nos grupos 3 (IH+MCSF) e 4 (MCSF) o número de células do sobrenadante também diminuiu, mas parece ter havido uma retomada na multiplicação celular, provavelmente pela presença do fator de diferenciação. Mesmo não apresentando diferença significativa podemos perceber no gráfico 1 que todos os grupos apresentaram tendência a diminuir o número de células na população do sobrenadante e portanto a aumentar o número de células aderidas.

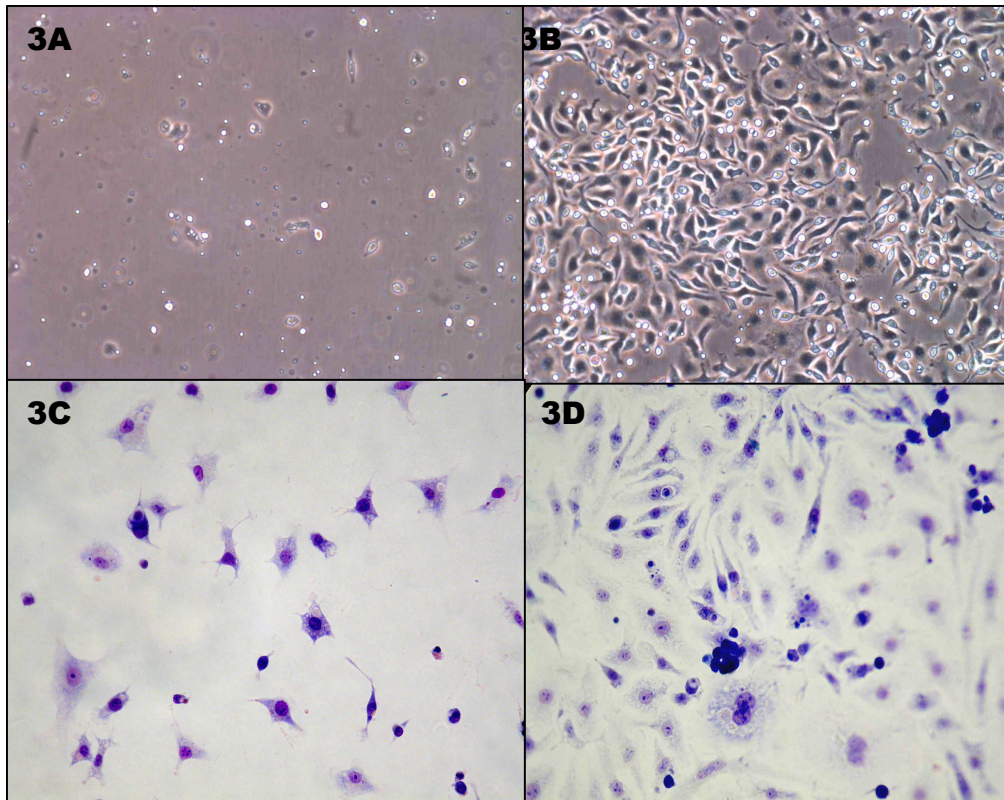


Figura 3. Imagens de culturas obtidas por microscopia de contraste de fase e microscopia de luz. Em 3A (Grupo 1) e 3B (Grupo 2) foram plaqueadas 3×10^6 células retiradas da medula óssea de camundongo, e a população de mononucleares foi plaqueada em garrafa de cultura para execução do experimento piloto. As fotos foram obtidas do cultivo de 72 horas mostrando um aumento de na densidade celular. Fotos obtidas com a objetiva de 100x. Em 3C (Grupo1) e 3D (Grupo 2), as células foram cultivada em placas de 24 poços com lamínulas, por 96 horas, fixadas e coradas para observação por microscopia de luz. Estas imagens observadas mostram no Grupo 2 (IH) um aumento na densidade celular e células espreiadas quando comparadas com o Grupo 1 (controle). Imagens obtidas por objetiva de 40x.

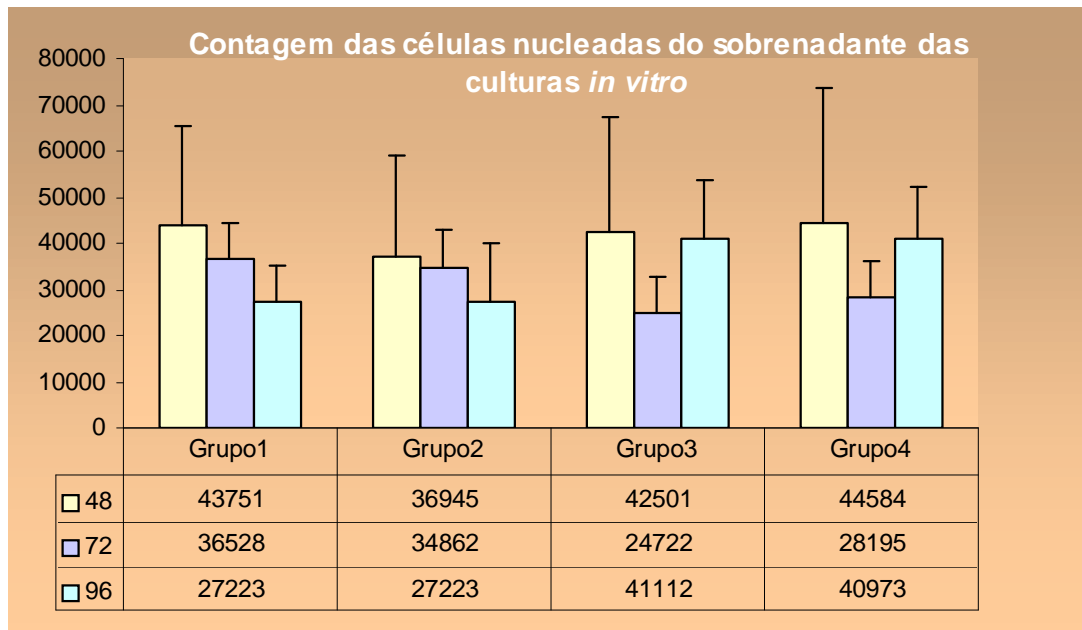


Gráfico 1 – Ao final de cada tratamento células nucleadas foram contadas para determinar se permaneciam no sobrenadante na cultura em resposta ao tratamento. Destacamos a tendência de aumento no número de células para os grupos 3 e 4 no tempo de 96 horas, quando comparado com o grupo controle (Grupo 1). Os números obtidos expressam a quantidade de células contadas dentro dos padrões de repetições estabelecidos no item 2.4

5.2.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS ADERIDAS

As células mononucleares foram caracterizadas de acordo com a tabela 2 do item 4.6.2 e o resultado avaliado estatisticamente. O resumo dos resultados está contido na Tabela 3 (ANEXO 1).

Linfócitos

Observou-se uma redução no número deste tipo celular, a qual foi constante em relação ao tempo da cultura. No gráfico 2, destacamos os grupos IH+M-CSF e M-CSF onde essa diminuição foi mais evidente.

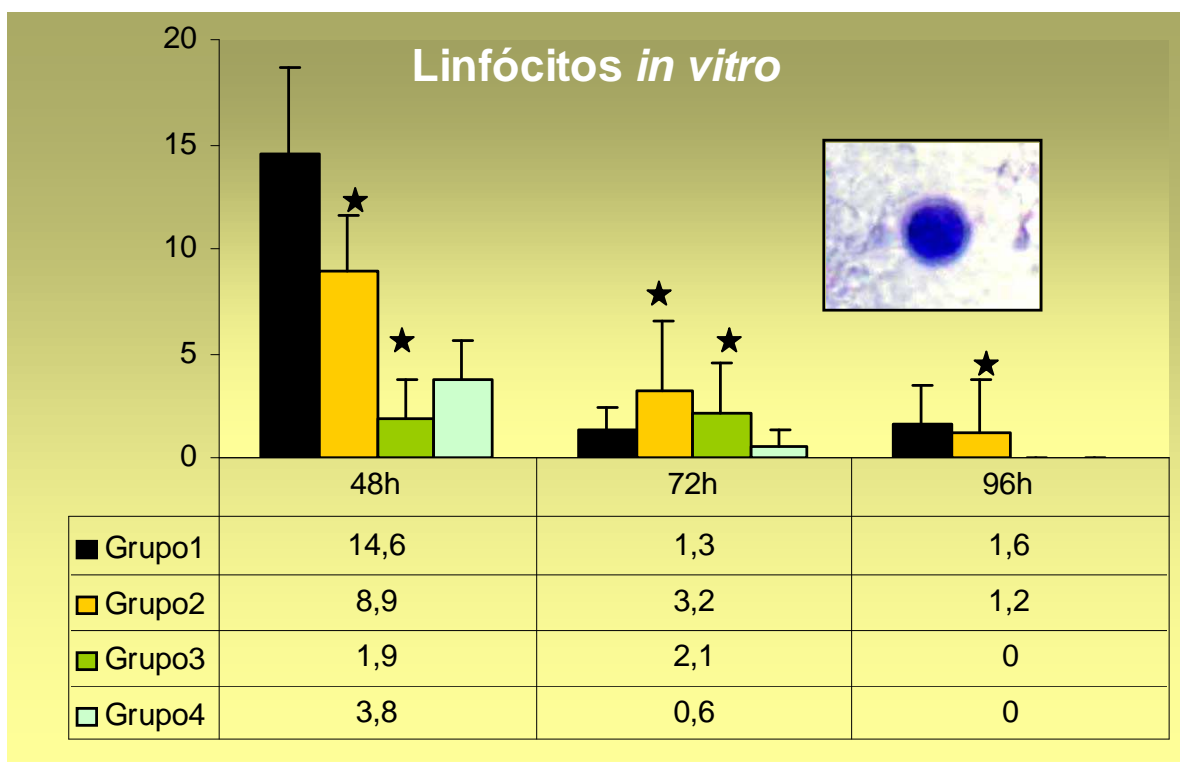


Gráfico 2 – Contagem percentual de linfócitos em cultivo primário de células mononucleares, após o tratamento com o medicamento IH mostrando a diminuição e permanência deste tipo celular quando comparado com o grupo que recebeu o M-CSF. Grupo 1 (Controle), Grupo2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF, *p < 0.05 .

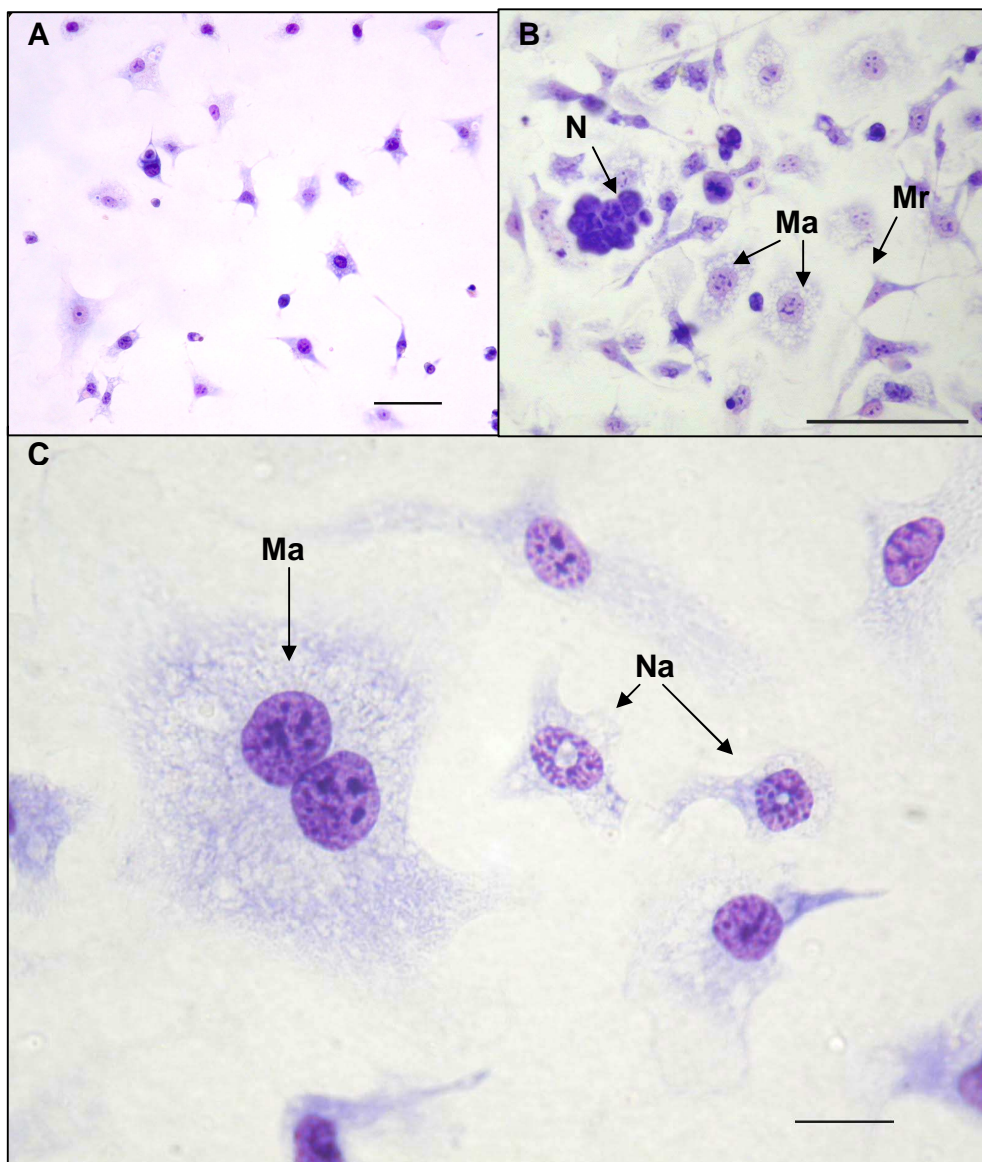


Figura 4 – Imagens de microscopia de luz de culturas controle e tratadas, após 96 horas. As células mononucleares foram fixadas em Bouin e coradas com Giemsa. Observamos nas figuras 4B e 4C, Grupos 2 e 3 respectivamente, células com morfologia de macrófagos residentes (Mr), macrófagos ativados (Ma), nichos celulares (N), e células com núcleo em anel (Na) em maior quantidade quando comparado com o Grupo 1, figura 4A. Em 4A e 4B imagens obtidas com objetiva de 40x. Em 4C objetiva de 100x. Barrinha = 10 μ

Macrófagos Residentes

Mesmo na ausência de fatores de crescimento, para os grupos 1 e 2, mostramos no gráfico 3 que o número de macrófagos residentes permanece presente nas culturas ao longo do tratamento, destacando uma diminuição para o grupo 2 no tempo de 96 horas, aproximando-se dos grupos 3 e 4 onde foi adicionado o M-CSF.

Macrófagos Ativados

Mesmo na ausência de fatores de crescimento, o número de macrófagos ativados presentes no grupo IH aumentou com o tempo de cultura, demonstrando gradual ativação dos mesmos. Isto era esperado nos grupos 3 e 4 onde foi adicionado o M-CSF, mas podemos observar no gráfico 4 que, com 96 horas de cultura e tratamento, o grupo que recebeu apenas o medicamento homeopático, se iguala aos que receberam o fator de diferenciação.

Nichos Celulares

Pequenos grumos associados a uma camada de células aderentes foram classificados como nichos. Estes grumos de células tornaram-se evidentes com o passar do tempo de cultura e essa diferença foi mais acentuada nos grupos 2 e 3 (IH e IH+ M-CSF), como pode ser observado no gráfico 5.

Células com núcleo em Anel

As células que apresentam um núcleo em forma de anel são consideradas células precursoras de monócitos e/ou granulócitos, e podemos perceber no gráfico 6 que o número destas células é significativamente menor no grupo tratado com IH, ao longo do tempo de cultura.

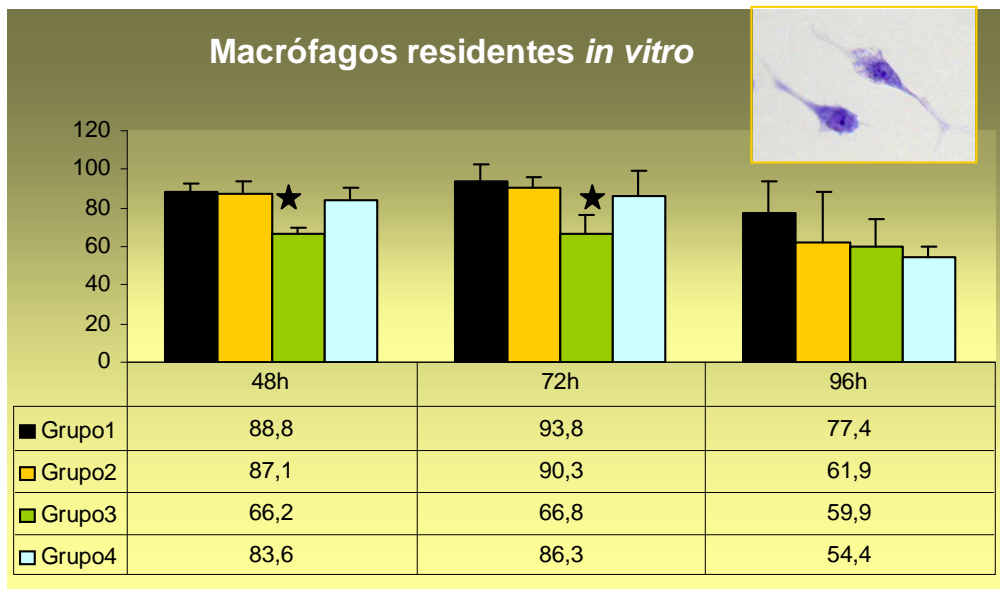


Gráfico 3 - Contagem percentual de macrófagos residentes em cultivo primário de células mononucleares, após o tratamento com o medicamento IH. Destacamos o Grupo 3 apresentando diminuição neste tipo celular nos tempos de 48 e 72 horas e do Grupo 2 no tempo de 96 horas. Grupo 1 (Controle), Grupo2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF, * $p < 0.05$.

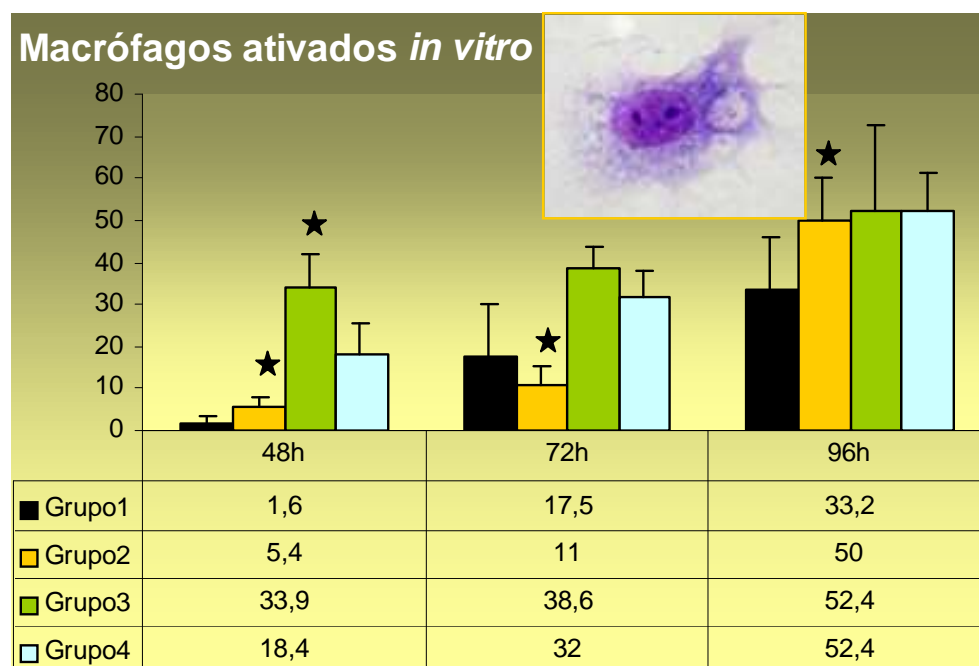


Gráfico 4 - Contagem percentual de macrófagos ativados em cultivo primário de células mononucleares, após o tratamento com o medicamento IH. Destacamos o aumento destas células nos grupos 2 e 3 com o tempo de tratamento. Grupo 1 (Controle), Grupo2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF, * $p < 0.05$.

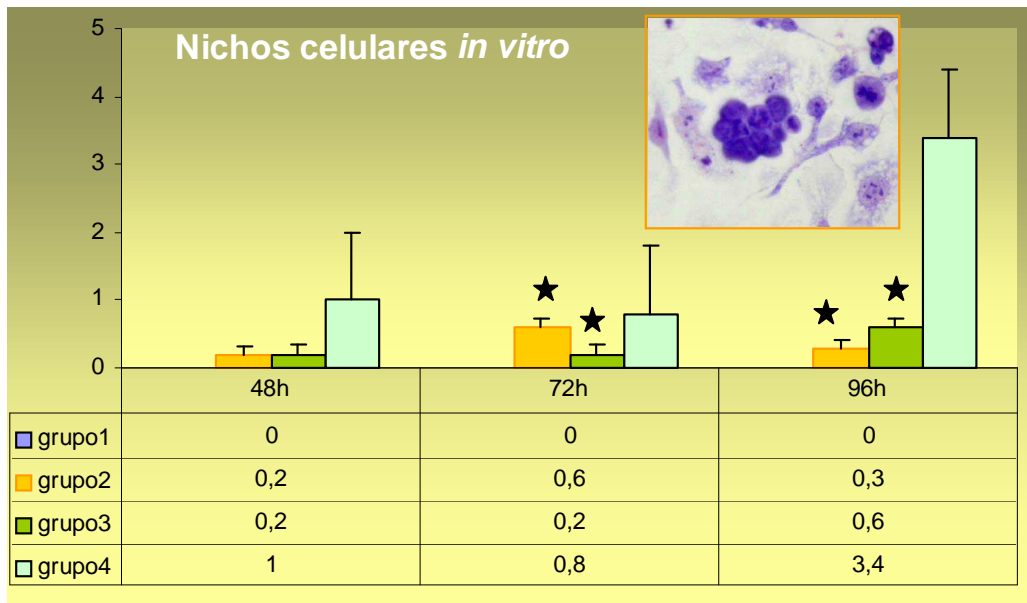


Gráfico 5 - Contagem percentual de nichos celulares em cultivo primário de células mononucleares, após o tratamento com o medicamento IH. Destacamos a permanência desses arranjos celulares nos grupos 2 e 3 ao longo do tratamento. Grupo 1 (Controle), Grupo 2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF, *p < 0.05.

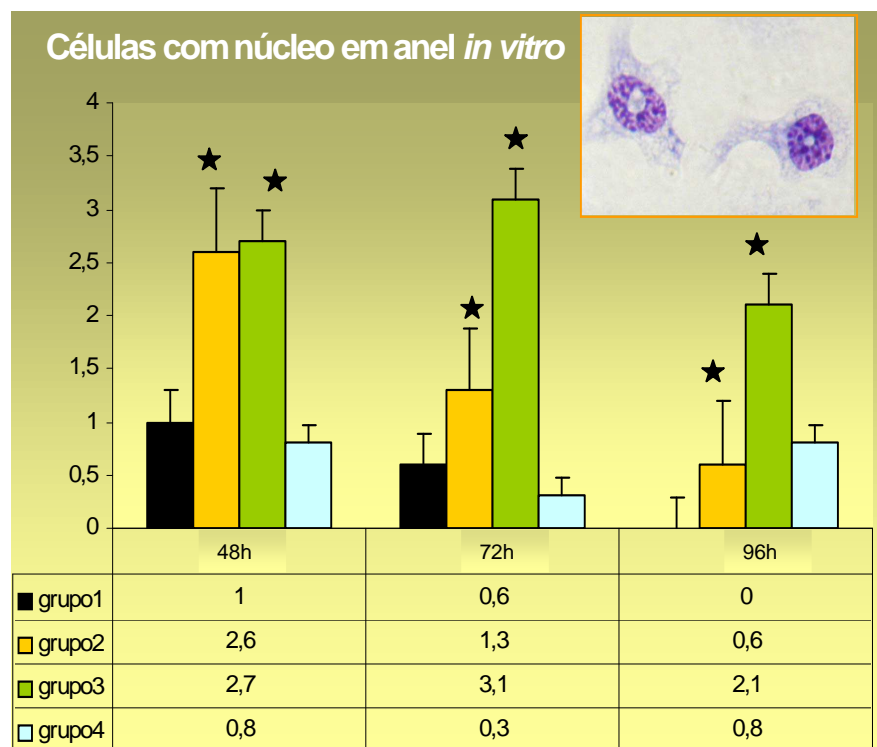


Gráfico 6 - Contagem percentual de células com núcleo em anel em cultivo primário de células mononucleares, após o tratamento com o medicamento IH. Destacamos a presença deste tipo celular durante o período de tratamento para os Grupos 2 e 3. Grupo 1 (Controle), Grupo 2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF, *p < 0.05.

5.2.3 ANÁLISE DE CITOCINAS

As citocinas liberadas no sobrenadante das culturas e analisadas no citômetro de fluxo (IFN γ , IL-4, IL-4 e IL-2) não mostraram diferença entre os diversos tratamentos, exceto o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), que se encontrou elevado com os três tipos de tratamento (gráfico 7).

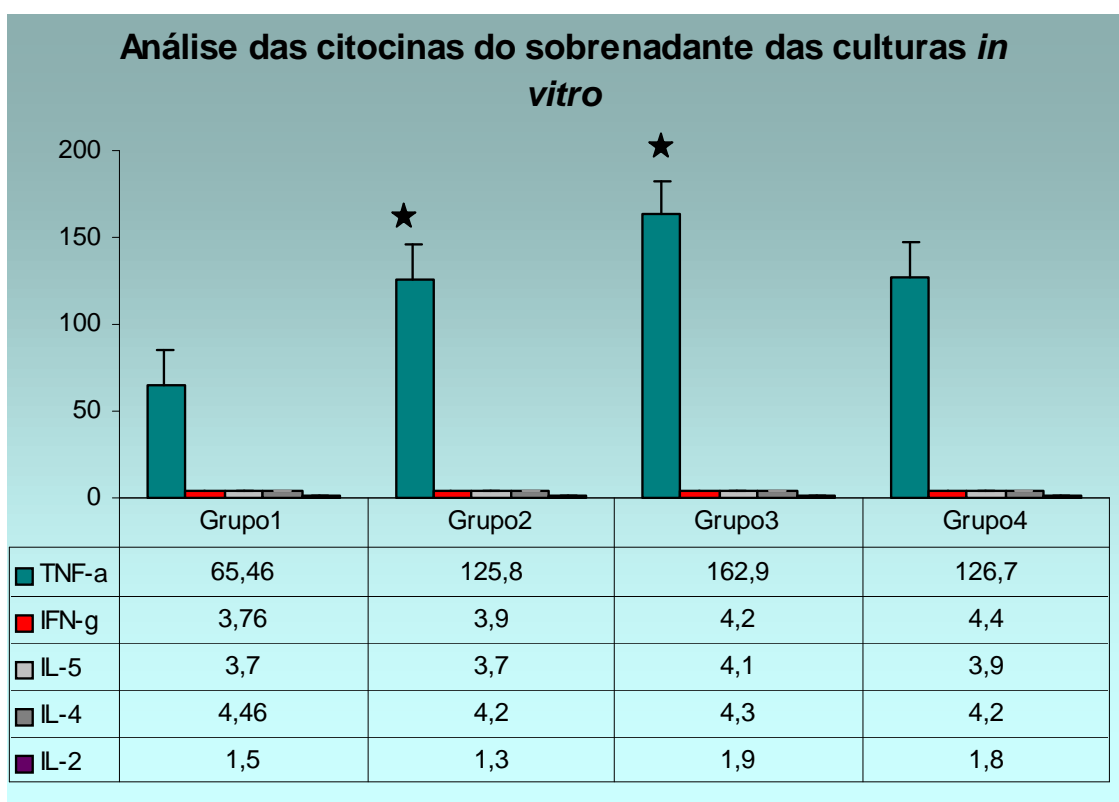


Gráfico 7- Células mononucleares retiradas de medula de camundongo, foram plaqueadas e cultivadas de acordo com o item 4.6.2 e após o período de 96 horas, uma alíquota do sobrenadante das culturas foi retirado para análise e quantificação das citocinas liberadas. Destacamos que a citocina TNF α é a única do painel analisado que apresenta-se elevada nos grupos 2 e 3. Os valores numéricos da tabela são as médias dos três experimentos. Grupo 1 (Controle), Grupo2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF, *p < 0.05.

5.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Células não aderentes

Estas células se caracterizam por pertencerem à população de mononucleares e apresentar diferentes estágios de diferenciação. Estes resultados foram obtidos de culturas de 96 horas. As células menos diferenciadas apresentam o citoplasma se reduzido e com poucas organelas e mitocôndrias esparsas, núcleo arredondado com cromatina condensada e pouca eucromatina. As mais diferenciadas apresentaram um núcleo com eucromatina abundante, agregados de ribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias alongadas dispersas no citoplasma. Também verificamos a presença de longas projeções citoplasmáticas na superfície celular, fazendo contato com células adjacentes. O Aparelho de Golgi apresentou-se bem desenvolvido, com um grande número de cisternas. Todas estas características morfológicas caracterizam um intenso metabolismo celular. (Figuras 5 e 7).

Células Aderentes

As células aderentes foram caracterizadas por um grande espriamento acompanhado de um aumento do citoplasma. As células do grupo controle apresentaram um Complexo de Golgi composto por poucas cisternas. Nos grupos 2 e 3 a região que continha o Complexo de Golgi apresentou-se maior. Nessa avaliação tornou-se evidente que as projeções citoplasmáticas faziam contato com as células adjacentes, principalmente nos grupos 2 e 3. Nesses locais de adesão entre as células, no espaço extracelular, observou-se a presença de partículas eletrondensas distribuídas regularmente, lembrando septos (Figura 5, 6 e 8).

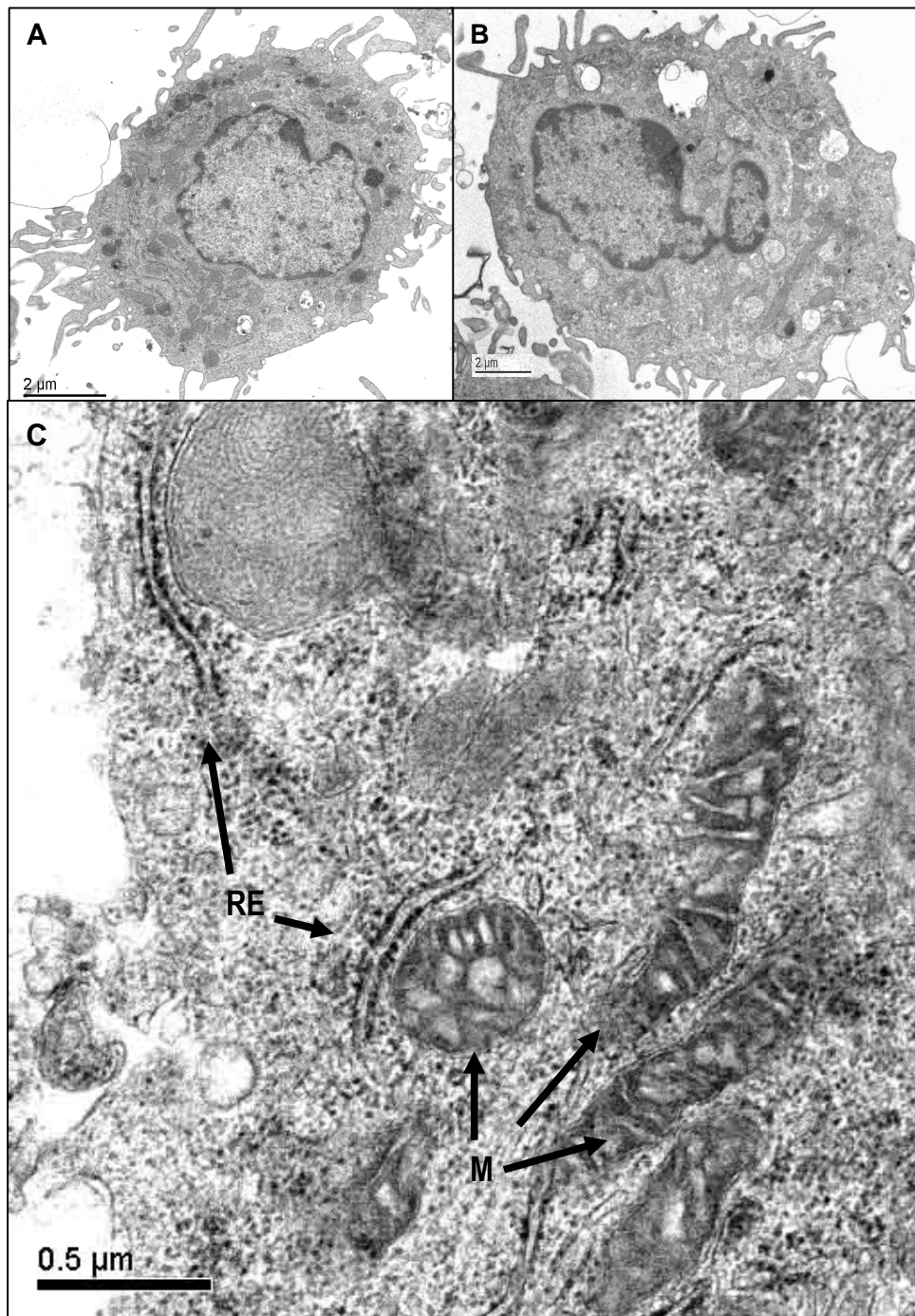


Figura 5: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão: mostrando células mononucleares aderentes e do sobrenadante de culturas tratadas com o medicamento imunomodulador. Destaque para mitocôndrias, retículo endoplasmático granular e núcleo com poro nuclear, caracterizando aumento do metabolismo 5A e 5B - células não aderentes e 5C - célula aderente; **M** - mitocôndria; **RE** - retículo endoplasmático granular; **PN** - poro nuclear.

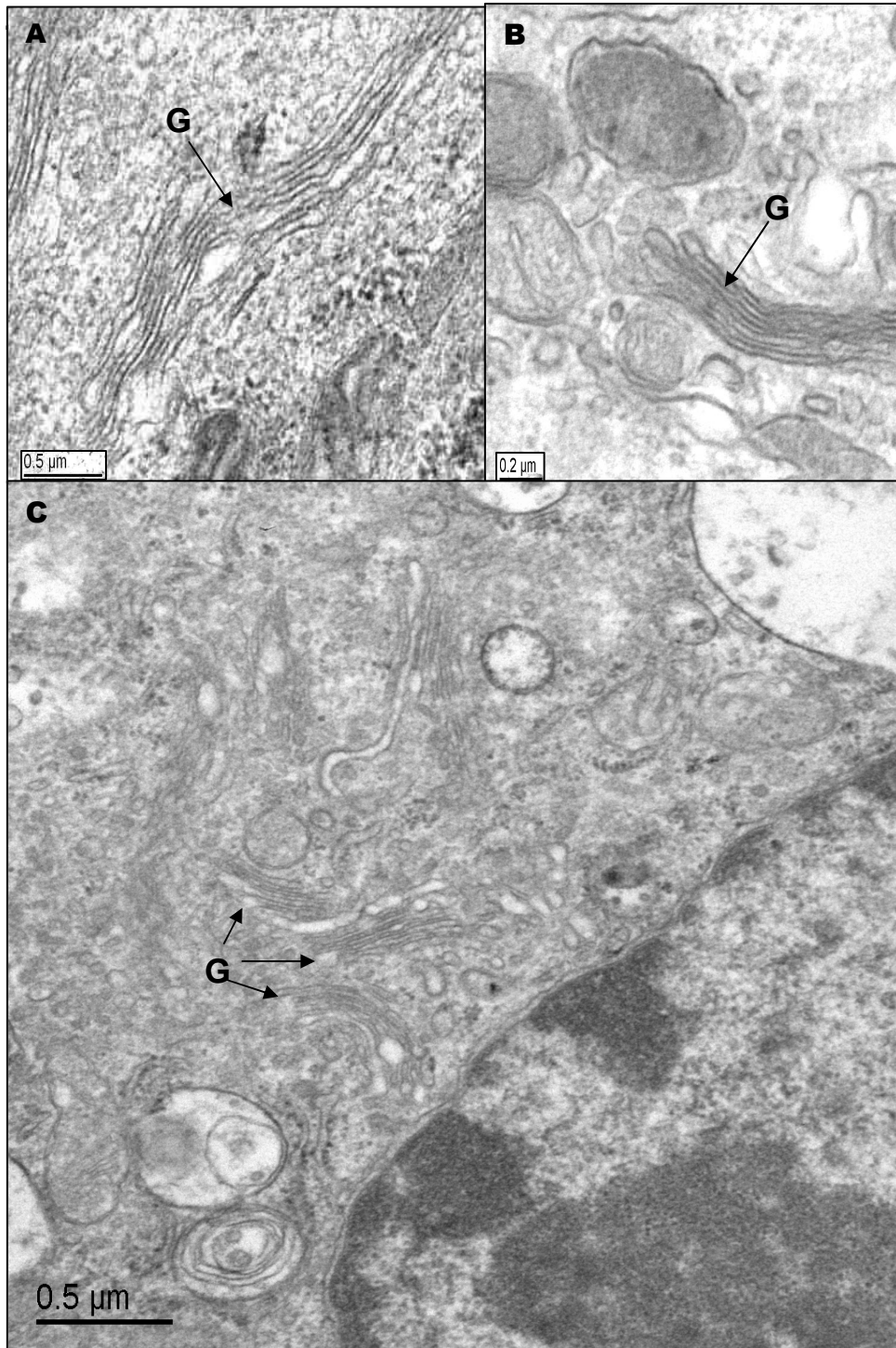


Figura 6 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão: mostrando células mononucleares aderentes e em destaque, várias cisternas do complexo de golgi; **6A e 6C** - Golgi característico de célula com alto metabolismo; **6B** - Golgi característico de baixo metabolismo; G - Complexo de Golgi.

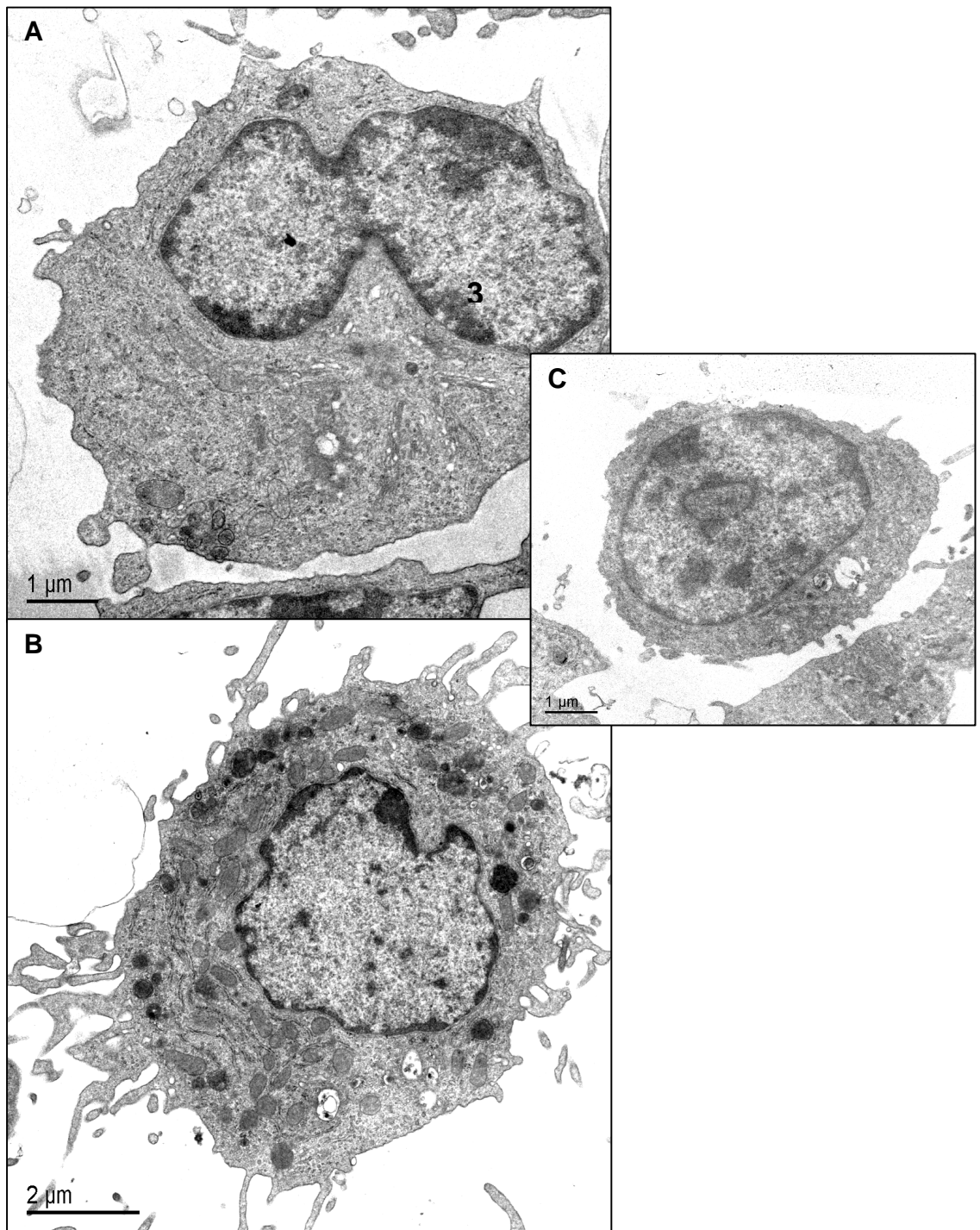


Figura 7 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão: células mononucleares presentes no sobrenadante da cultura; 7A e 7B células apresentando característica alto metabolismo e mais diferenciadas e em 7C célula com núcleo em anel e morfologia característica de pouca atividade metabólica e menos diferenciada.

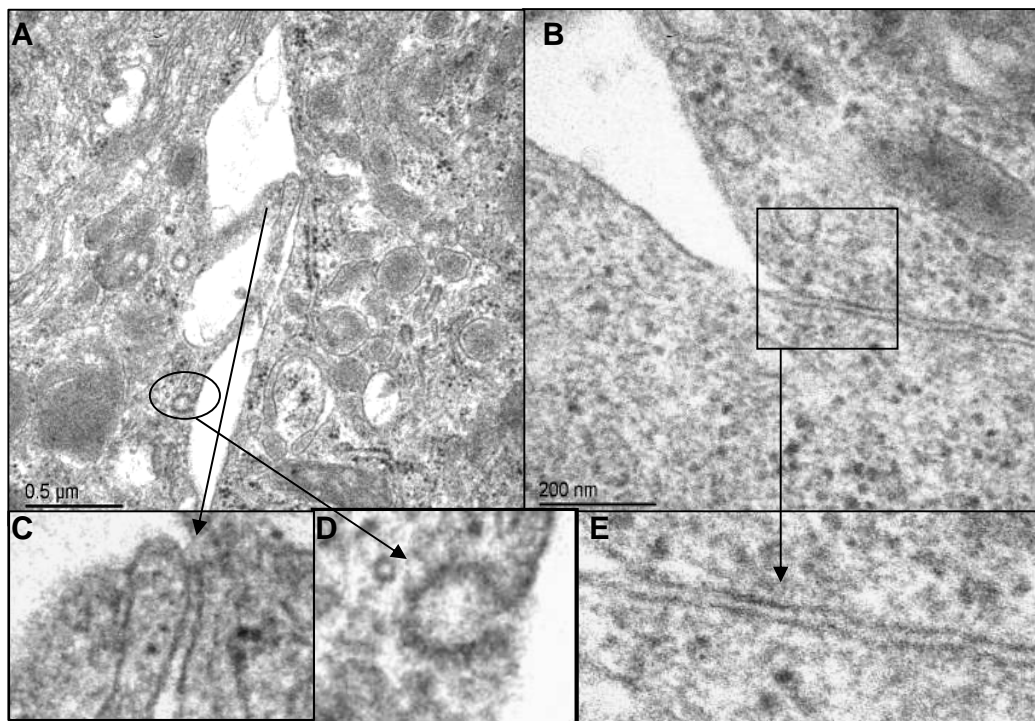


Figura 8 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão: Em 8A e 8B mostram áreas de adesão entre as duas células. Em 8B e 8E destaque para partículas eletrondensas na porção extracelular. Em 8A e 8C projeções celulares, em 8D um detalhe de uma vesícula pinocítica localizada na foto 8A.

5.3 TRATAMENTO *in vivo*

5.3.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As células mononucleares obtidas da medula óssea de animais tratados *in vivo*, foram observadas por microscopia de luz e caracterizadas pela sua morfologia de acordo com a tabela 2, especificada no item 4.6.2. Foram então contadas as diferentes células e a contagem final submetida à análise estatística.

Linfócitos, macrófagos residentes e macrófagos ativados

A análise estatística das células acima mencionadas apresentada na Tabela 4 (Anexo 2), cruzando tempo de cultura e tipo de tratamento não mostraram diferença estaticamente significativa, mas quando analisados em separado, os tratamentos entre si apresentaram diferenças e o tempo de permanência na cultura também. Médias percentuais agrupadas no gráfico 8.

Linfócitos, macrófagos residentes e ativados, apresentaram diferenças apenas quando as variáveis “tempo” e “tratamento” foram analisadas separadamente. Dados apresentados na tabela 5 do Anexo 3. O grupo 1 apresentou tendência de apresentar um número maior de macrófagos residentes. O grupo 2 (IH), mesmo sem receber fatores de crescimento, apresentou tendência de acompanhar os resultados observados nos grupos onde o fator de diferenciação foi adicionado às culturas.

A análise estatística dos macrófagos ativados mostrou resultado semelhante ao dos encontrados para os linfócitos e macrófagos ativados, isto é, só mostrou diferença significativa na análise das variáveis em separado (Tabela 5).

Em destaque na figura 9, as células de acordo com os critérios morfológicos da tabela 2.

Nichos celulares

Os nichos são grupos celulares associados às células aderentes, locais mais corados quando observados em microscopia de luz. Observando com a objetiva de maior aumento vemos um arranjo de células justapostas com formas bem arredondadas, pequenas, núcleos pequenos e condensados (Figura 9). A análise

estatística mostrou que todas as interações (tempo x tratamento) foram significantes mostrados na tabela 4 (anexo 2) e tabela 6 (anexo 4). Os grupos 3 e 4 mostraram grande número destes arranjos celulares nas 24 horas e 48 horas, diminuindo com o tempo de cultura (Gráfico 9).

Núcleo em anel

De acordo com a tabela 2, foram encontrados dois tipos de células com núcleo em anel. As polimorfonucleares (PMN) mostrando um núcleo com início de constrição em lóbulos (Figura 9) e as mononucleares (MNC) com um núcleo em anel com contorno mais uniforme e citoplasma com grânulos brancos. A análise estatística mostrou que todas as interações foram significantes mostrados na tabela 4 (Anexo 2) e tabela 6 (Anexo 4). Depois de 72 horas o número destas células diminuiu em todos os grupos (Gráfico 10).

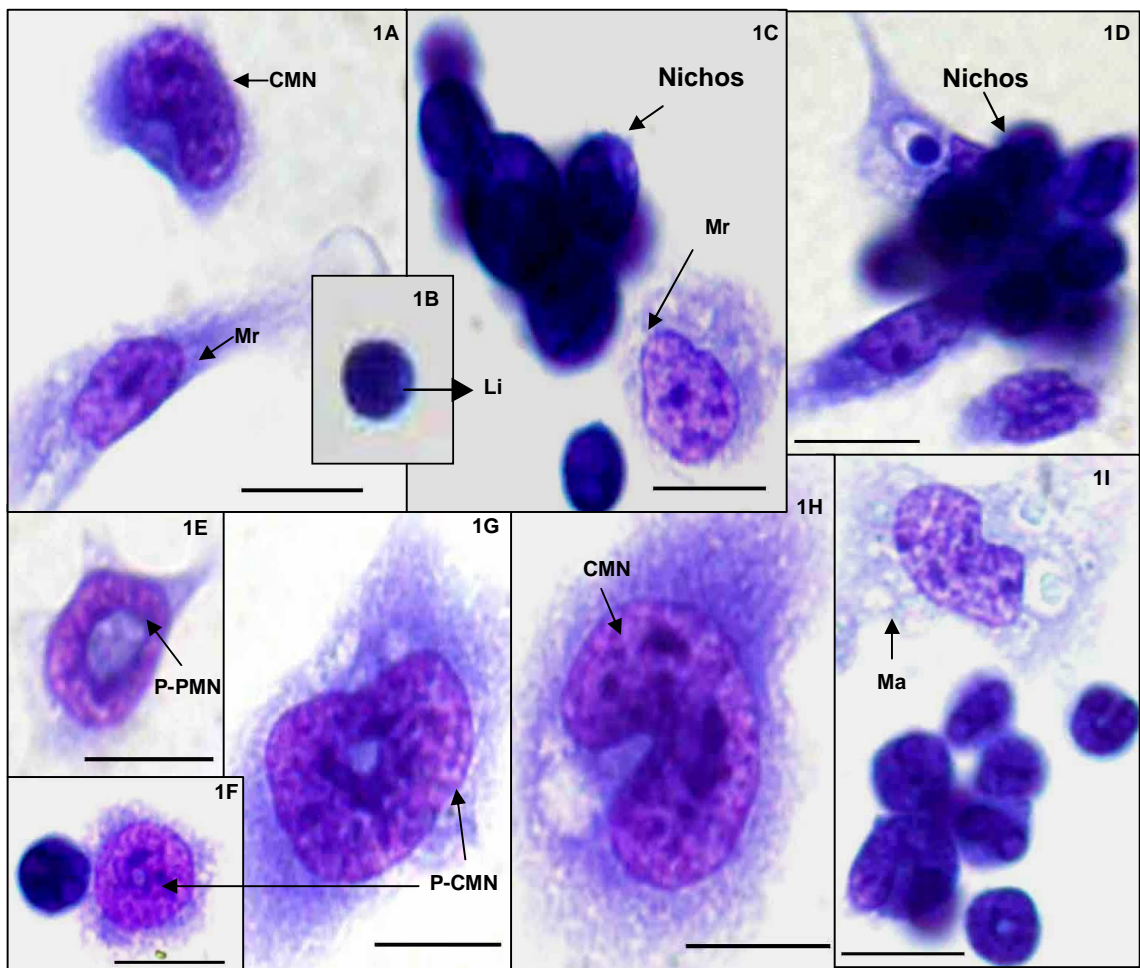


Figure 9: Imagens de microscopia de luz de células mononucleares de medula óssea. Essas células foram coradas com Giemsa. Objetiva de 100x. CMN, célula mononuclear, 1A e 1H; Mr: Macrófago residente, 1A; Li: Linfócito, 1B; Ma: Macrófago ativado, 1I; P-PMN precursor de polimorfonuclear, 1E; P-CMN precursor de mononuclear, 1F e 1G; Nichos, 1C e 1D. (Barrinha = 10 μ m)

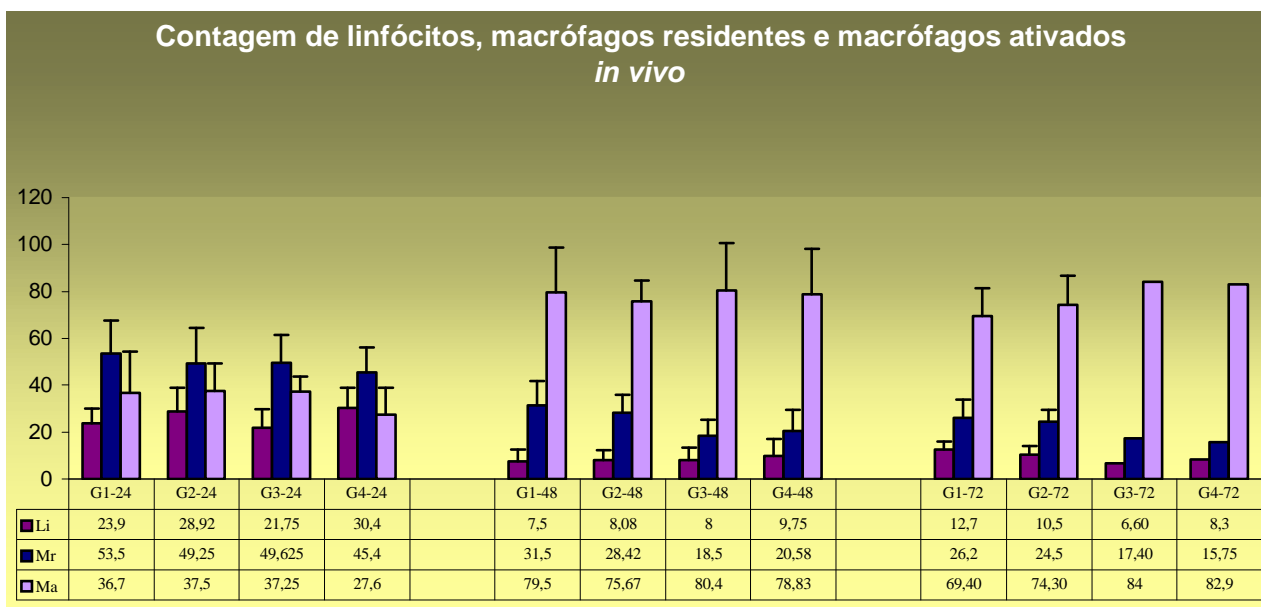


Gráfico 8 – Número de linfócitos (Li), macrófagos residentes (Mr) e macrófagos ativados (Ma) dentre as células aderentes. Destacamos a diminuição de Li e Mr ao longo do tratamento acompanhada do aumento do Ma. Os dados expressam as médias percentuais.

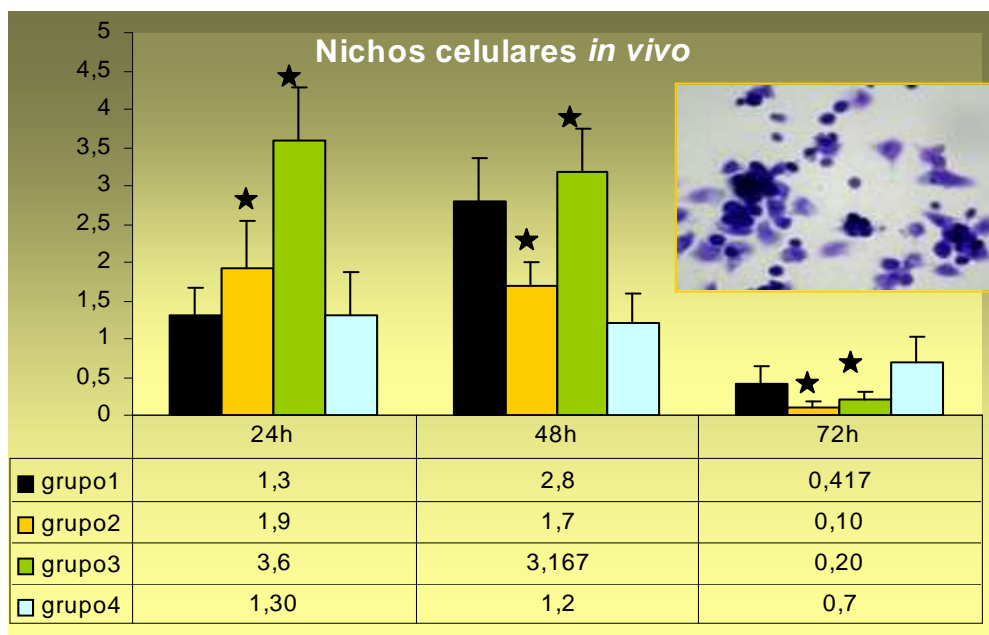


Gráfico 9 – Contagem percentual de nichos celulares em cultivo primário de células mononucleares, após o tratamento com o medicamento IH. Destacamos a presença desses arranjos celulares nos grupos 2 e 3 nas primeiras 24 horas, bem como a permanência no tempo de 48 horas. Grupo 1 (Controle), Grupo2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF, *p < 0.05.

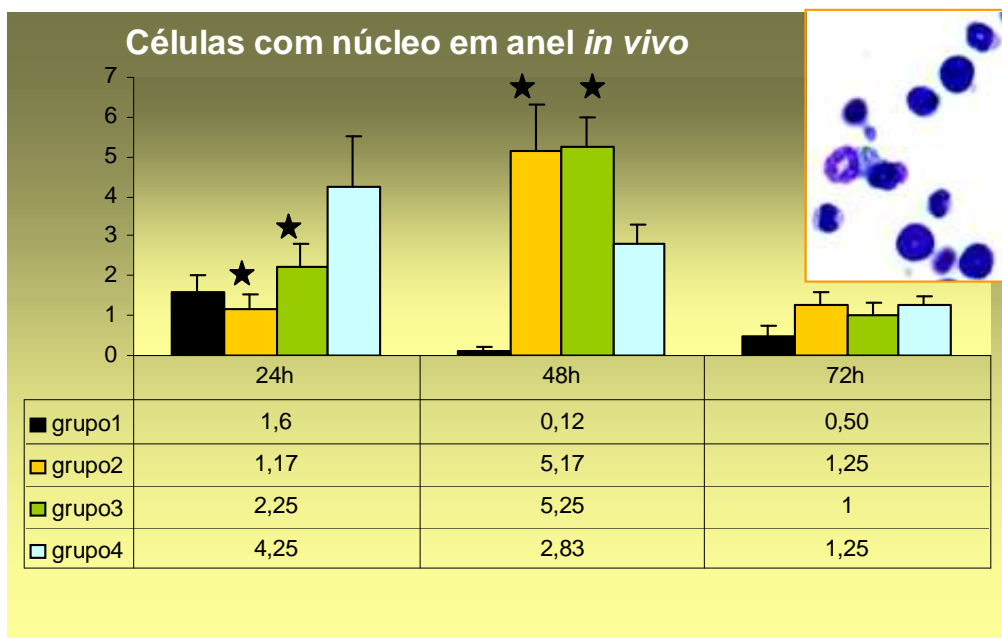


Gráfico 10 – Contagem percentual de células com núcleo em anel em cultivo primário de células mononucleares, após o tratamento com o medicamento IH. Destacamos a manutenção desse tipo celular nos tempos de 24 horas seguido de um aumento no tempo de 48 horas para os Grupos 2 e 3. Grupo 1 (Controle), Grupo2 (IH), Grupo 3 IH+M-CSF e Grupo 4 M-CSF *p < 0.05

5.3.2 IMUNOFENOTIPAGEM

Após o tratamento *in vivo*, os camundongos foram sacrificados, as células da medula foram removidas e uma alíquota foi coletada. As células foram analisadas pela citometria de fluxo. Os valores numéricos referem-se aos índices de fluorescência, dos marcadores de linhagem detectados nesse experimento, os quais são apresentados no Gráfico 11.

Para o marcador CD11b (linhagem monocítica), observamos que o IH diminuiu o número de células. O grupo M-CSF (controle positivo para linhagem monocítica) apresentou mais células quando comparado com o grupo controle, grupo sem tratamento algum. Destacamos aqui que ao somar, o M-CSF à medicação homeopática, o resultado foi similar ao encontrado no grupo que recebeu apenas o tratamento do medicamento. O número de células dendríticas (CD11c+), granulócitos (Ly6G+), linfócitos T (CD3+) e linfócitos B (CD45R) se apresentaram reduzido não só pelo tratamento com o IH, mas também pelos outros tipos de tratamento. Os eritrócitos (TER119+) apresentaram redução apenas no grupo tratado com o medicamento IH.

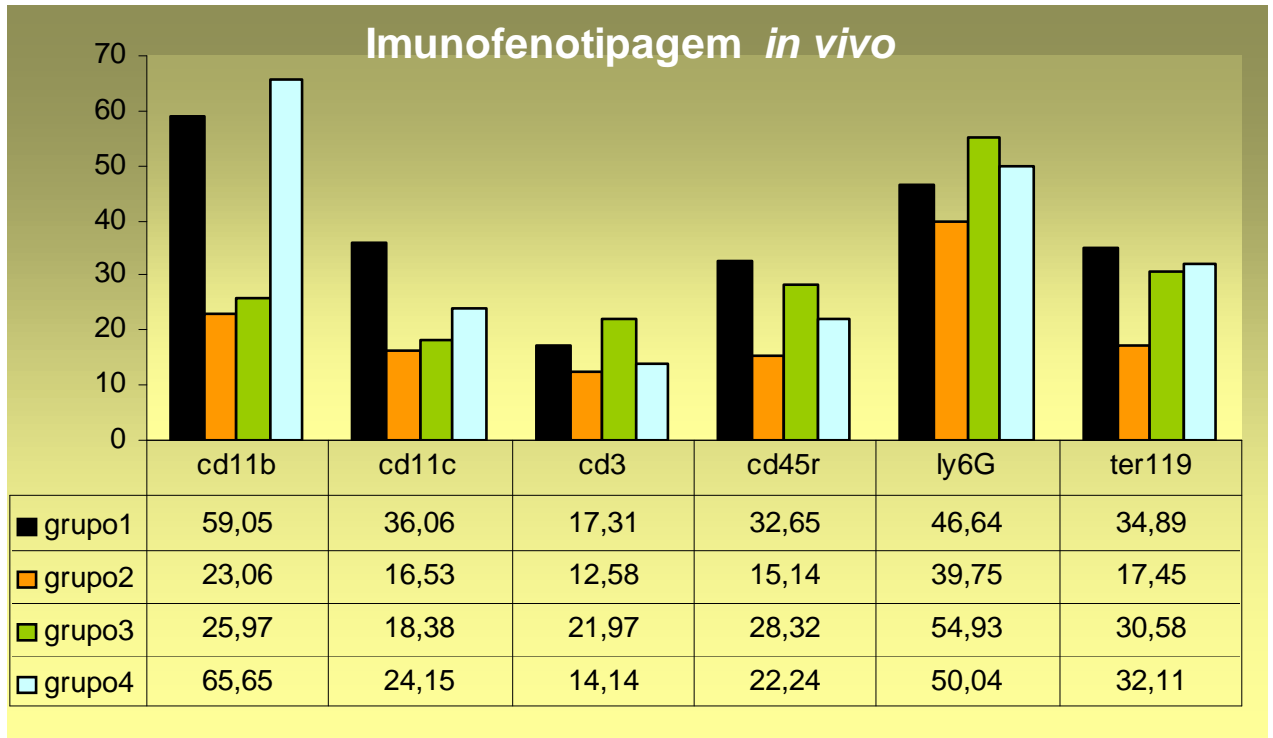


Gráfico 11 – Imunofenotipagem – Após o tratamento *in vivo*, camundongos foram eutanasiados e as células da medula óssea foram retiradas;. Uma alíquota recém coletada destas células foi analisada por Citometria de Fluxo; Grupo 1: controle; Grupo 2: camundongos que receberam tratamento com o medicamento homeopático; Grupo 3: camundongos tratados com o medicamento homeopático e M-CSF; Grupo 4: camundongos tratados com M-CSF

Imunofenotipagem CD11b e TER119

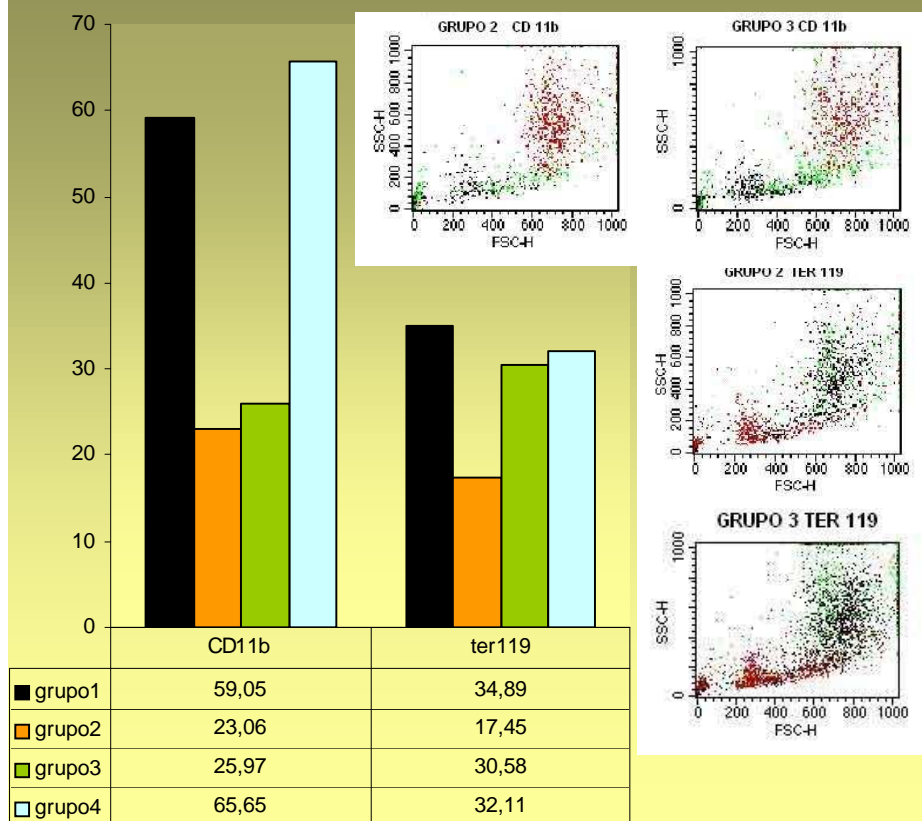


Gráfico 12 – Expressão do CD 11b e TER 119 para os grupos 2 e 3. Estes resultados foram obtidos após o tratamento *in vivo*. A imunofenotipagem foi executada logo após a coleta das células. As marcações foram efetuadas com anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo

6. DISCUSSÃO

A hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento e maturação das células sanguíneas sendo fundamental para a sobrevivência do indivíduo. Estas células pertencem a diferentes linhagens celulares e são formadas a partir de células-tronco as quais são responsáveis por substituir células que tenham concluído sua vida útil por novas, nos indivíduos adultos.

Anormalidades no desenvolvimento das células sanguíneas podem resultar em doenças, como leucemias. O conhecimento dos controles moleculares no desenvolvimento normal dessas células poderá resultar em um melhor entendimento e, conseqüentemente, possibilitar a cura de diversas anomalias. Para analisar os controles que regulam a viabilidade, multiplicação e diferenciação das células hematopoiéticas normais é desejável e conveniente que o estudo seja elaborado com modelos biológicos não geneticamente modificados. Portanto nossas análises se iniciaram em experimentos *in vitro*, com o cultivo primário de células de medula óssea de camundongos saudáveis. Utilizou-se o mesmo critério para as avaliações *in vivo*.

Devido aos diversos resultados já obtidos, mostrando os mecanismos de ação (processos bioquímicos, moleculares, genômicos e funcionais) do IH em macrófagos peritoneais de camundongos, tornou-se importante o uso de células de medula óssea. A população mononuclear é formada por células das linhagens mielóide e linfóide. Estas células apresentam potencial de proliferação/diferenciação em resposta a estímulos específicos como, por exemplo, o M-CSF, o qual foi utilizado neste trabalho como controle positivo. O M-CSF não só induz a proliferação destas células como também a diferenciação, havendo precursores propriamente monocíticos denominados M-CFUs (*macrophage- colony forming units*). A diferenciação terminal do M-CFUs, processo conhecido como maturação, e a conseqüente geração de monócitos também requer a presença de M-CSF (CELADA, 1994; VALLEDOR, 1998; SHIMA, 1995; SWEET e HUME, 2003; HASSAN et al.1994; MOORE et al. 1980; LADNER et al. 1988; KIM et al. 2004; MIRANDA et al. 2005; BENDER et al. 2004; HITOSHI et al. 1998).

Para a realização do cultivo primário foram retiradas as células da medula óssea e separadas as mononucleares. Os monócitos pertencem a esta população e podem se diferenciar em vários tipos de macrófagos, dependendo do microambiente tecidual onde estão inseridos. Os macrófagos não diferenciados que estão nos tecidos são capazes de proliferar graças à presença de M-CSF, citocina autócrina, e também de outros fatores de crescimento e citocinas não específicas como GM-CSF e IL-3 . Na ausência de citocinas ou fatores de crescimento, os macrófagos entram em estado de quiescência e, se a falta desses fatores persistir, acabam por morrer devido a processos apoptóticos . Após a realização de vários experimentos piloto, foi importante o estabelecimento das culturas *in vitro*. Com a padronização das melhores condições para estas células, passamos a observar possíveis modificações morfológicas e ultraestruturais associadas a citocinas e marcadores celulares. Ao analisarmos as culturas *in vitro*, verificamos que o observado no experimento piloto se repetiu, uma vez que as culturas apresentaram diferença na quantidade (densidade) de células nos grupos tratados em relação ao grupo controle. Os resultados da quantificação das citocinas nos mostraram que houve um aumento de TNF α nos grupos que receberam tratamento (IH, IH + M-CSF, e M-CSF). Essa citocina tem um importante papel na resposta inflamatória (CELADA e MAKI. 1992, XAUS et al. 1999)..

Os monócitos, linfócitos B e mastócitos, infectados pelo vírus da dengue, produzem diferentes citocinas, sendo demonstrado por alguns autores, maiores aumentos das concentrações de TNF- α , IL-2 e IL-6 nos primeiros três dias de doença, com aparecimento posterior de IL-10, IL-5 e IL-4. Macrófagos peritoneais apresentaram uma diminuição da produção dessa citocina, após o tratamento com o medicamento imunomodulador homeopático . Na medula, estas células expressam uma resposta diferenciada. Estudos mostram que a citocina TNF- α pode aumentar a proliferação de células precursoras que apresentam o marcador CD11b, já que atua em precursores da linhagem monocítica (PIEMONTE & BUCHI. 2002, CELADA e MAKI. 1992).

Destacamos que o marcador CD11b apresenta-se predominante na população medular aderente. Alguns autores citam que macrófagos são responsivos ao aumento desta citocina em cultura de longa duração e que a linhagem monócitos/macrófagos é a principal fonte de produção da citocina TNF α . Além disso, autores citam a relação

estabelecida entre M-CSF e TNF α em cultivo, os quais estimulam agentes anti-apoptóticos em cultura, corroborando com nossos resultados, pois verificamos a sobrevivência das células medulares ao longo do tempo de cultura. Nossos resultados sugerem que esse aumento na liberação do TNF α deve estar relacionado à manutenção dessas células. Ao contrário dos grupos controles, as culturas piloto tratadas sobreviveram em cultura por mais de três meses, sem adição de nenhum fator de crescimento (JARAMILLO et al. 2001; RUSTEN . 1994; ABUD et al. 2006).

Os grupos 3 e 4, apresentaram uma queda de células nucleadas no sobrenadante celular, no tempo de 72 horas, seguidos por uma tendência a elevação no tempo de 96 horas. Este fato pode ser um indício de que as células aderidas, em sua maioria CD11b, estariam produzindo e liberando TNF α para o sobrenadante da cultura e somado ao M-CSF, dessa maneira estimulando os progenitores ainda não aderidos a se proliferar, e conseqüentemente, ocasionando um aumento no número dessas células no sobrenadante da cultura. (JARAMILLO et al. 2001).

A análise morfológica da população de células aderentes nos mostrou a presença de linfócitos, nichos celulares, células com núcleos em anel, macrófagos residentes e macrófagos ativados. Com base na morfologia clássica, os macrófagos ativados apresentaram-se muito espalhado com grande quantidade de eucromatina. Nossos experimentos *in vitro* mostraram poucos macrófagos ativados no grupo controle quando comparado ao grupo IH. No grupo tratado com o medicamento, os macrófagos rapidamente aderiram e modificaram sua morfologia de residentes para ativados. LIN et al. 2001, retirava as células aderentes do pool total e obtinha uma cultura de células não-aderentes com células progenitoras de macrófagos. Nas culturas de células não aderentes, onde o M-CSF exógeno foi retirado, as células tornaram-se vulneráveis a ponto de após 72h mais de 95% estarem mortas. Como em nossos experimentos não foram retiradas as células aderentes, as mais comprometidas com a linhagem monocítica aderiram com mais rapidez, produzindo e liberando M-CSF, assim proporcionando um estímulo para a diferenciação da linhagem monocítica. Após 96 horas de cultura, o grupo tratado com IH apresentou uma maior densidade celular que o controle, indicando que esse medicamento favorece a adesão e diferenciação de monócitos que se encontram no sobrenadante da cultura. Destacamos também que os

grupos IH e IH+M-CSF apresentaram grande número de células com morfologia de ativadas. Resultados prévios de nosso laboratório mostraram que este medicamento não alterou a expressão de marcadores de superfície na população aderente da medula óssea, indicando que a ativação celular ocasionada pelo IH não interfere na quantidade e presença destes marcadores específicos *in vitro*. Experimentos anteriores também mostraram um aumento na adesão e espraiamento das células tratadas com o medicamento, corroborando os dados de ativação celular mostrados pela microscopia de luz. Com esse experimento pôde-se dizer que a maioria das células que estão aderidas expressa CD11b em sua superfície (ABUD et al. 2006).

Destacamos que nos experimentos *in vitro*, com células totais de medula óssea ou com a população mononuclear, a camada de células aderentes parece dar suporte para os nichos, que em ambos os experimentos se mostraram aumentados com o passar do tempo de cultura e do tratamento. Esses nichos podem conter células-tronco que ainda não se diferenciaram e/ou células progenitoras já comprometidas com alguma linhagem celular. O tratamento com o IH parece favorecer o surgimento de um mecanismo de suporte muito próximo ao que ocorre no microambiente medular (ABUD et al. 2006; CESAR et al. 2007 in press; FUCHS et al. 2004).

As análises ultraestruturais efetuadas pela microscopia eletrônica de transmissão e de varredura ampliam nosso conhecimento sobre os efeitos do medicamento IH e corroboram os dados apresentados pela microscopia de luz. A análise das culturas em microscopia eletrônica de varredura mostrou que existe grande diferença entre os tratamentos, tanto em relação à quantidade de células aderidas quanto à morfologia celular. A quantidade de células aderidas no controle é menor que no grupo IH, corroborando os resultados *in vitro* das células mononucleares. Em relação ao tamanho, as células do grupo IH apresentaram-se maiores e mais espraiadas. Novamente podemos dizer que o IH age sobre a adesão e ativação das células da medula óssea. De acordo com DEXTER e colaboradores em 1976, com o tempo de cultura utilizado, as células que se aderem são, principalmente, fagócitos mononucleares, com numerosas extensões citoplasmáticas e que tendem a se espraiar. Essa informação foi confirmada pela presença de grande quantidade do marcador CD11b na superfície das células medulares aderentes (ABUD et al. 2006).

Diferente dos neutrófilos, os monócitos, não são totalmente diferenciados quando saem da medula, mas sim, após circularem pelo sangue periférico, invadem os tecidos, onde finalizam seu processo de maturação e determinam seu período de vida. A maturação destas células tem sido bem estudada. Vários autores citam que pequenos e imaturos macrófagos se diferenciam em grandes fagócitos. Foram encontradas mitocôndrias de tamanho médio, redondas ou alongadas, situadas ao longo da cisterna do Golgi e RER, ou irregularmente difusas no citoplasma. Alguns autores citam que uma das características de diferenciação é o aumento dessas organelas. A maioria delas possui formas alongadas, com o interior da membrana formando distintas cristas e algumas mitocôndrias continham regiões mais claras na matriz, provavelmente uma manifestação de mudança de condições osmóticas. É citado que macrófagos que não formam clusters apresentam grande quantidade dessas organelas devida um aumento das hidrolases lisossomais necessárias para a fosforilação oxidativa dentro da atividade fagocitária. Assim, as células mononucleares passam por uma grande transformação, não apenas estrutural, mas também funcional. Os Macrófagos que tendem a formar "clusters", apresentam extensas interdigitações entre as células, sendo citado que este processo é acompanhado da diminuição da atividade fagocitária. Observou-se que estas células mantêm contato através de projeções citoplasmáticas e que o espaço extracelular é modificado, mais eletrondenso, semelhante aos septos juncionais. As imagens sugerem a presença de moléculas regularmente distribuídas, evidenciadas pela maior eletrondensidade, favorecendo as junções entre as células, dando maior sustentabilidade entre elas. Isso já foi observado também por outros autores, e indica a possibilidade de estruturação de um estroma medular *in vitro*. BAINTON e GOLDE, 1978, citam que estas zonas de contato em macrófagos podem estar servindo como elementos de adesão ou favorecendo a passagem seletiva de moléculas e que estas células produzem menor reação para fosfatase ácida e menor atividade fagocitária. Alguns autores sugerem que nas regiões de contato ocorra um intercâmbio de informações entre macrófagos e linfócitos. Aparentemente, o contato é essencial para a ativação dos linfócitos. Em todos esses eventos colaborativos, a presença do macrófago parece ser fundamental, bem como a existência desses contatos de adesão especializados. Em algumas horas de cultura é possível observar mudanças

ultraestruturais que caracterizam um processo de modificação metabólica. Essas alterações indicam uma intensa síntese protéica. Características observadas como, citoplasma abundante, envoltório nuclear bem evidente podendo ser observado poros nucleares e cromatina menos densa, Complexo de Golgi apresentando várias cisternas e retículo endoplasmático granular acompanhado de polirribossomos livres, são indícios de grande atividade celular. (COHN Z A, 1964; D. HORKY, 2006; SHOHAM et al. 1974; PARMLEY et al. 1976; BAINTON e GOLDE, 1978; LEVY et al. 1976; MCINTYRE et al, 1973; PORVAZNIK e MACVITTIE ,1979; ALBRECHT et al 1978).

Resultados prévios em nosso laboratório mostraram que o medicamento altera a distribuição de proteínas relacionadas à adesão e espraiamento de macrófagos peritoniais tratados. ANJOS et al. 2000, citam estudos realizados sobre as integrinas da subfamília $\beta 1$ na adesão célula-célula e célula-matriz extracelular que demonstraram mudanças na expressão destas moléculas o que se reflete em distúrbios no microambiente da medula óssea. Assim, as moléculas de adesão parecem ter um papel importante na regulação da hematopoiese normal. Ainda assim, destaca-se que, mesmo que junções *gap* funcionais, entre as células estromais e leucócitos, sejam raros ou inexistantes ainda assim, poderia ocorrer algum tipo de junção entre essas células, mesmo que apenas um contato mecânico (adesão). Células progenitoras consideradas normais aderem com intensidade ao estroma medular e permanecem em contato com este estroma. Em nossos experimentos foi observado que, após 96 horas de cultura, a diferença na quantidade e morfologia das células aderidas é ainda maior, pode-se dizer que este medicamento é dose e tempo dependente *in vitro* e parece atuar sobre os nichos celulares por meio de receptores específicos, facilitando a formação dessas áreas que podem conter células progenitoras. Piemonte e Buchi em 2002, mostraram que macrófagos tratados com o medicamento apresentaram uma redistribuição nos receptores de fibronectina (integrina $\alpha 5 \beta 1$) e nos filamentos de actina. OLIVEIRA et al, 2008, cita que foi encontrada um aumento nos genes que expressam a β actina, e da mesma forma, na talina, uma proteína importante ligada a actina, a qual tem papel fundamental na adesão focal. Outra proteína de adesão também estava aumentada, o sindecan-4. Destacamos que precursor celular, matriz - extracelular e interações com células endoteliais determinam a manutenção ou liberação das células hematopoéticas

do microambiente da medula óssea para o sangue periférico e que possíveis alterações nestas interações poderão causar patologias como as leucemias (ANJOS A R, 2000; PIEMONTE & BUCHI, 2002; ALLEN & DEXTER. 1984; DORSHKIND et al. 1993; JARVIS et al. 1997).

Nossas análises ultraestruturais ao observar as células não aderentes presentes no sobrenadante das culturas, em sua maioria apresentaram uma forma arredondada, núcleo grande e nucléolo proeminente. Isso indica que, mesmo não apresentando características de adesão, estas células já demonstram estágios de diferenciação mais comprometidos. Células do sobrenadantes, quando estimuladas, poderão se ligar e ativar as células estromais, o que contribui para a manutenção do microambiente formado. Verificamos a presença de células com morfologia de ativadas as quais, apresentaram núcleo com abundante eucromatina e um evidente nucléolo, ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem proeminentes. A ativação de macrófagos, além de outros critérios, também é analisada pela ultraestrutura e sua mudança na morfologia. Algumas destas alterações estão relacionadas a atividades funcionais que requerem aumento na síntese de proteínas. Estudos realizados sobre a expressão gênica em macrófagos, cita que a proteína S 28 do ribossoma e proteína S18A do ribossoma mitocondrial, foram encontradas aumentadas em macrófagos tratados com o medicamento. Algumas células com estreitas e extensas projeções também foram vistas nesta população celular. (OLIVEIRA et al, 2008; ALLEN & DEXTER. 1984).

O cultivo celular nos oferece um ambiente ideal para as condições de manutenção celular, com maior controle sobre as diversas variáveis, mas ainda assim, distante do ambiente natural. Portanto, cabe aqui ressaltar que o microambiente medular contém moléculas de matriz extracelular e outras células, que interagem e estabelecem um verdadeiro sistema regulador, o qual garante a hematopoiese *in vivo*. Desta forma, com protocolos experimentais *in vivo*, diferentes situações foram observadas após a análise com microscopia de luz. Uma delas foi justamente a não permanência dos nichos com o tempo de tratamento. Os grupos IH e IH+M-CSF mostraram nas primeiras 24 horas de cultura *ex-vivo*, uma maior quantidade de nichos e poucos linfócitos, sendo que estes números diminuiram ao longo do tempo de cultura.

Sugerimos, portanto, que o tratamento com o medicamento, atua de forma diferenciada nessas células, quando se comparados os experimentos *in vivo* e *in vitro*. Esses resultados pedem futuras análises complementares de sangue periférico.

Inicialmente, apenas com a análise dos experimentos *in vitro*, sugerimos que estes nichos poderiam ser grupos de linfócitos aderidos às células do estroma medular. Com a realização dos experimentos *in vivo*, destacamos a possibilidade de precursores de eritrócitos se localizarem nesses nichos. A imunofenotipagem realizada após o tratamento *in vivo* mostrou uma queda na expressão do marcador para eritrócitos TER119, sugerindo que o processo de maturação deste tipo celular foi acelerado com o tratamento, acelerando também a migração dessas células para a circulação periférica. Outra hipótese poderia ser que, com o tratamento, as células imaturas permaneceram aderidas ao estroma medular, o que auxiliaria na sua maturação. Dessa maneira, ao serem retiradas da medula, permaneceram em grumos, o que dificultou sua passagem pelo capilar do citômetro e conseqüentemente sua detecção. Vários autores citam a importância do ambiente medular e da interação com o macrófago para a eritropoiese. SHIVANI et al. 2007, mostrou que proteínas especiais estariam favorecendo a ligação de eritrócitos e macrófagos, formando as ilhas eritroblásticas, as quais abrigam eritroblastos em diferentes etapas de maturação. Estas regiões de contato foram evidenciadas nos resultados *in vitro* por ABUD et al 2006 e CESAR et al. 2007, tanto na microscopia eletrônica de varredura quanto de transmissão. Estas ilhas eritroblásticas são sensíveis a eritropoetina, diferenciando-se para a série eritróide. Alguns autores citam a possibilidade de o macrófago estar favorecendo o deslocamento destas células para os sinusóides e de ser este fato um recurso essencial na regulação e diferenciação desta linhagem celular. Portanto, é interessante ressaltar que tanto nos experimentos *in vitro*, como *in vivo*, este medicamento age sobre a linhagem monocítica e sobre os macrófagos, sendo um fator importante de influência não apenas na formação dos ninhos celulares, como também das células que constituem o microambiente medular, em sua riqueza de tipos celulares mais diferenciados ou mesmo precursores (ALBRECHT R. M., 1978; SLAPER-CORTENBACH I., 1987; BARBÉ E., 1996; CHASIS, J. A., 2006; ZAKHAROV Y, 1983; YOKOYAMA et al 2003, THIELE et al, 2000).

Resultados clínicos mostram a recuperação rápida de pacientes que utilizam tratamentos convencionais, após a utilização do medicamento imunomodulador. A supressão da medula óssea, efeito colateral comum quando há necessidade de tratamentos mais agressivos, manifestada pela leucopenia, trombocitopenia e anemia, é a toxicidade dose-limitante de ocorrência mais comum. Relatos clínicos mostram que o tratamento com o medicamento homeopático promove uma regularização dos valores hematológicos. Tal resultado permite liberação da dose-limitante do medicamento convencional e mantém a necessária regularidade e adesão ao tratamento. Os pacientes tratados com IH mantêm a normalidade da plaquetometria e da leucometria. Há vários relatos de que, em decorrência da estabilidade da série vermelha, a necessidade de hemotransfusões torna-se ocasional e acidental (DI BERNARDI, R.P, 2005; STROPARO, E. 2005)

Após o tratamento e com o tempo de cultura nos experimentos *in vitro*, notamos que as células com núcleo em anel ficaram aderidas e com aspecto de ativadas. Uma das características que diferenciam estas células como precursoras de monócitos ou de granulócitos está ligada à adesão e fagocitose. De acordo com a morfologia apresentada, podemos observar projeções citoplasmáticas vacuolizadas, correspondendo à linhagem monocítica. Os precursores de granulócitos apresentam um citoplasma não tão evidente e o anel do núcleo é bem mais aberto mostrando um início de segmentação. Nos experimentos *in vitro*, estas células estavam presentes nos primeiros tempos de cultivo diminuindo em número com o tempo. Nos tratamentos *in vivo*, destacamos que o tempo de 48 horas é o que mais apresenta este tipo de célula, sendo acompanhado de uma significativa diminuição com o decorrer do tratamento *ex vivo*. Estas células também apresentam essa morfologia característica, só que neste caso, foi possível observar diferentes tipos de núcleo em anel. Neste experimento o número estava aumentado nas 48 horas e os dois tipos de núcleo em anel são evidenciados. Corroborando este resultado, temos a imunofenotipagem demonstrando um aumento na linhagem granulocítica com o marcador Ly6G. Como a adesão é um dos fatores que diferencia estes dois tipos de precursores celulares, podemos sugerir que a adesão ocorrida entre os períodos de 24 e 48 horas, proporcionou uma diferenciação comprometendo as células da linhagem granulocítica, de tal forma que

estas perdem sua capacidade de adesão, podendo ser encontradas no sobrenadante. As que permanecem aderidas estão comprometidas com a linhagem monocítica, diferenciando-se em macrófagos e tornando-se ativadas. Fato este evidenciado no tempo de 72 horas. Este resultado sugere que no tratamento *in vitro* o medicamento atua preferencialmente na linhagem monocítica. No tratamento *in vivo* o medicamento atua de forma sistêmica e outras células provavelmente também estejam recebendo influência do tratamento (BIERMANN, 1999).

Atualmente têm sido realizados experimentos utilizando um *pool* de células mononucleares obtidas da medula óssea que, contendo uma pequena porcentagem de células progenitoras, possibilitam induzir a angiogênese no miocárdio enfartado ou isquêmico. São utilizados diferentes fatores de crescimento na diferenciação das células progenitoras para se obter o aumento do número de células, que se constituem de ensaios de proliferação e a diferenciação pela análise por citometria de fluxo dos marcadores de membrana celular. Uma vez que uma das limitações do cordão umbilical é o número limitado de células, existem atualmente vários centros de investigação desenvolvendo procedimentos que permitam aumentar este número em culturas hematopoiéticas, fazendo uso de diferentes combinações de fatores de crescimento pela técnica *ex vivo*. Estes avanços poderão levar a, no futuro, o transplante em adultos atingir níveis de sucesso semelhantes aos transplantes pediátricos. Os avanços ocorridos na Biologia Molecular e Imunologia na última década permitiram um aumento no conhecimento da fisiopatologia de diversas doenças, de maneira que se utilizam novas modalidades de imunoterapia para várias patologias. As terapias que modificam as respostas biológicas estimulam os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro, mediando, por exemplo, a regressão do câncer. Entretanto o desenvolvimento de técnicas quimio-imuno-terapêuticas tem sido dificultado devido à quimioterapia citotóxica suprimir a resposta imune. Atualmente a atenção de cientistas e da indústria farmacêutica mundial está dirigida a novas formas de terapia imunomoduladora para doenças crônicas como câncer, AIDS, hepatite C, leucemias, etc., que trazem um extremo desgaste físico e emocional, não só dos portadores, mas também de toda a família envolvida. Estas terapias imunomoduladoras são dirigidas a células específicas ou as citocinas que contribuem para a resposta imune e ficaram conhecidas como

“modificadores da resposta biológica”. Uma delas utiliza o tratamento *ex-vivo*, cultivando células hematopoiéticas para o tratamento de doentes após a alta dose de quimioterapia e/ou radioterapia (DAHLKE et al., 2006; YOKOYAMA et al., 2006; ORLIC et al., 2001; FERRARI et al., 1998; MEZEY et al., 2000; GOMES L , 2004; BALLOW e NELSON, 1997; OBADINA et al., 1996).

Dentro deste contexto, evidenciamos em nosso estudo que, além de atóxico, o efeito do medicamento homeopático imunomodulador (IH) age na ativação das células mononucleares da medula óssea quando cultivadas com ou sem M-CSF. A sobrevivência das células em cultura é de interesse em tratamentos clínicos relacionados ao transplante de medula e outras aplicações, dentro da medicina regenerativa.

7. CONCLUSÕES

- ❖ O tratamento com o medicamento homeopático em técnica de cultura líquida de medula óssea utilizada possibilitou a manutenção das populações celulares não aderentes e aderentes estudadas;
- ❖ A contagem das células do sobrenadante, nos experimentos *in vitro*, demonstrou que estas diminuíram no grupo que recebeu apenas o medicamento homeopático, enquanto as que receberam o tratamento somado com M-CSF, apresentaram uma ligeira elevação com o passar do tempo, sugerindo que o tratamento não interfere nas células não aderentes.
- ❖ O medicamento homeopático aumentou a quantidade da citocina TNF α presente no sobrenadante das culturas no tempo de 96 horas, o que pode explicar a sobrevivência das células aderentes ao longo do tratamento;
- ❖ O tratamento com o medicamento aumentou a densidade celular nas culturas e a diferenciação da população de células mononucleares ao longo do tempo;
- ❖ A avaliação morfológica pela microscopia de luz proporcionou a caracterização e contagem com análise estatística de diferentes tipos celulares, células progenitoras, ninhos celulares e, quanto à atividade metabólica, células residentes e ativadas;
- ❖ Após 96 horas, tanto células não aderentes e aderentes, tratadas quanto controle, analisadas pela microscopia eletrônica de transmissão, expressaram características de alta atividade metabólica, sugerindo que o tratamento não altera as células já comprometidas com processos de diferenciação ;
- ❖ O tratamento permitiu observar que com o aumento da densidade celular, estas células por sua vez, formavam “clusters” com extensas interdigitações e que estas regiões analisadas na ultraestrutura revelou uma eletrondensidade maior nestas regiões podendo indicar a presença de moléculas que favoreçam processos de adesão e comunicação celular.

- ❖ No tratamento *ex-vivo*, células mononucleares se diferenciam independente da presença do M-CSF, para a linhagem monocítica.
- ❖ A população de células mononucleares em cultura após o tratamento *in vivo* com o medicamento, não apresenta alteração no número de linfócitos, macrófagos residentes e ativados, quando comparado com os controles ao longo do tempo.
- ❖ A análise de imunofenotipagem com células totais, apresenta uma diminuição para os marcadores CD11b e TER119 quando comparado com os controles, representando efeitos do tratamento *in vivo* para estes tipos celulares;

8-CONCLUSÃO GERAL

A separação das células mononucleares tendo como controle positivo o M-CSF, tanto *in vitro* como *in vivo*, permitiram observar com maior clareza os efeitos do tratamento e a ativação das células da linhagem monocítica em cultura de curta duração. A ultraestrutura mostrou que num período de 96 horas as células aderentes diferenciadas tornam-se metabolicamente ativas e formam uma camada de suporte (estroma) para nichos celulares e células com núcleo em anel.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**, 4th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 553pg; 2000.

ABUD, A.P.R. **Ação *in vitro* do medicamento homeopático Canova em células de medula óssea de camundongos**. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

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 Biology International** vol. 30 (10), p. 808--816. 2006.

ALBRECHT R. M., HINS DILL R. D., SANDOK P. L. e HOROWITZ S. D. Murine Macrophage-Lymphocyte Interactions: Scanning Electron Microscopic Study **Infection and Immunity**, p. 254-268,1978.

ALLEN, T. D., DEXTER, T. M. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. **Experimental Hematology**. vol. 12. p. 517-521. 1984.

ANJOS A. R. , ALVARES-SILVA M., BORELLI P. Matriz Extracelular e Leucemia. **Rev.bras.hematol.hemoter**, **22**(3): 404-412, 2000.

BAINTON D. F., GOLDE D.W. Differentiation of Macrophages from Normal Human Bone Marrow in Liquid Culture - Electron Microscopy and Cytochemistry. **J. Clin. Invest.** V 61 (6) pp 1555-1569, 1978.

BALLOW M., NELSON R. Immunopharmacology-Immunomodulation and Immunotherapy. **Journal of American Medical Association**, VOL.278, 22: 2008-2017, 1997.

BARREDA, D. R., HANINGTON, P. C., BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology**. vol. 28. n°5. p. 509-554. 2004

BARRY, F. P. & MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. vol. 36. p. 568-584. 2004.

BD – BIOSCIENCES – Disponível em: www.bdbiosciences.com. Acesso: 10/03/2008

BENDER, A.T., OSTENSON, C.L., GIORDANO, D., BEAVO, J.A. Differentiation of human monocytes *in vitro* with granulocyte–macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression. **Cellular Signalling** vol.16, p. 365—374,2004.

BIERMANN, H., PIETZ, B, DREIER, R., SCHMID, K.W., SORG, C., SUNDERKOTTER, C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. **J Leukoc Biol.** vol.65 (2), p. 217—31,1999.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** Vol. 21, p. 77—89, 1968.

BROM, J., KOLLER, M., SCHLUTER, B., MULLER-LANGE, P., ULRICH STEINAU, H., KONING, W. Expression of the adhesion molecule CD11b and polymerization of actin by polymorphonuclear granulocytes of patients endangered by sepsis. **Burns.** vol. 21. n°6. p. 427-431. 1995.

BUCHI, D.F. AND SOUZA, W.,. Internalization of surface components during ingestion of *Saccaromyces cerevisiae* by macrophage. **Submicroscopy Cytol. Pathol.** vol. 24 (1), p. 135—141,1992.

BUCHI, D.F., SOUTO-PADRON, T., SOUZA, W. Internalization of Lectin-binding sites during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **Biocell.** vol. 17 (1), p. 1—11,1993.

BYRNE, P. V., GUIBERT, L. J., STANLEY, E. R. Distribution of cells bearing receptors for a colony-stimulating factor (CSF-1) in murine tissues. **The Journal of Cell Biol.** vol. 91 (3 Part 1). p. 848-853. 1981.

CELADA, A., e MAKI, R.A. Transforming growth factor- β enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. **J. Immunol.**, 148:1102-1105. 1992.

CELADA, A. e NATHAN, C.F. Macrophage activation revisited. **Immunol. Today.** 15:100-102, 1994.

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** (2007), doi:10.1016/j.micron.2007.02.005

CHASIS J. A. Erythroblastic islands: specialized microenvironment niches for erythropoiesis. Erythroid system and its diseases. **Current Opinion in Hematology.** vol. 13(3): p.137-141, 2006.

CITTERIO, S., RESCIGNO, M., FOTI, M., GRANUCCI, F., AGGUJARO, D., GASPERI, C., MATYSZAK, M. K., GIROLOMONI, G., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells as natural adjuvants. **Methods**. vol.19. p. 142-147. 1999.

COOPER. G. M. **A Célula**, 2ª edição, Editora Artmed., 712pg; 2002.

CROFT. A. P., PRZYBORSKI, S. A. Mesenchymal stem cells from the bone marrow stroma: basic biology and potential for cell therapy. **Current anaesthesia & Critical care**. vol. 15 (6). p. 410-417. 2004.

HORKY D., LAUSCHOVA I., KLABUSAY M., DOUBEK M., SHEER P., PALSA S., DOUBEK J. Appearance of iron-labeled blood mononuclear cells in electron microscopy. **Veterinarni Medicina**, 51, (3): 89–92, 2006.

DAHLKE, M.H., LOI, R., WARREN, A., HOLZ, L., POPP, F.C., WEISS, D.J., PISO, P., BOWEN, D.G., MCAUGHAN, G.W., SCHLITT, H.J., BERTOLINO, P. Immunemediated hepatitis drives low-level fusion between hepatocytes and adult bone marrow cells. **J. Hepatol**. vol.44 (2), p. 334—341,2006.

DANTAS, F. O que é homeopatia. **Ed. Brasiliense**. 3º ed., 1987.

DE OLIVEIRA, C.C., OLIVEIRA, S. M., GODOY, L.M.F., GABARDO, J., BUCHI, D. F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection** vol. 52, p. 420--432, 2006.

DEXTER, T.M., ALLEN, T.D., LAJTHA, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. **J. Cell Physiol**. vol. 91, p. 335—344, 1976.

DEJBAKSHSH-JONES, S. & STROBER, S. Identification of an early T cell progenitor for a pathway of T cell maturation in the bone marrow. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. vol.96. p. 14493-14498. 1999.

Di BERNARDI, R.P. **Recuperação de pacientes HIV/AIDS em Botswana, África, com uso do medicamento homeopático Canova**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

DONG LI, GUO-YUN WANG, ZHAO-FEN LIU, YONG-XIANG SHI, HUI ZHANG, ZENG-LIANG BAI. Macrophage-associated erythropoiesis and lymphocytopoiesis in mouse fetal liver: ultra structural and ISH analysis. **Cell Biology International** vol. 28 p. 457 e 461, 2004.

E. BARBÉ, I. HUITINGA, E. A. DÖPP, J. BAUER AND C. D. DIJKSTRA. A novel bone marrow frozen section assay for studying hematopoietic interactions in situ: the role of stromal bone marrow macrophages in erythroblast binding. **Journal of Cell Science** vol. 109, p. 2937-2945, 1996.

FERRARI, G., CUSELLA, G., ANGELIS, D., COLETTA, M., PAOLUCCI, E., STORNAIUOLO, A., COSSU, G., MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science** vol. 279, p. 1528—1530, 1998.

FUCHS, E.; TUMBAR, T., GUASCH, G. Socializing with the neighbors: Stem Cells and their niche. **Cell**. vol. 116. p. 769-778. 2004.

GOMES L., VIEIRA M., CASTELO-BRANCO G., GOMES A. e SANTOS R. Células Estaminais do Sangue do Cordão Umbilical. **Boletim de Biotecnologia**, N. 79, Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, 2004.

GUILBERT, L. J., STANLEY, E. R. Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells. **Journal of Cell Biol.** vol. 85 (1). p. 153-159. 1980.

HASSAN, N.F., CHEHIMI, J., HO WEN-ZHE, CAMPBELL, D.E. AND DOUGLAS, S.D. Effect of hematopoietic growth factors on human blood monocytes/macrophages in *in vitro* culture. **Clinical and diagnostic laboratory immunology** vol.1 (6), p. 620—625, 1994.

HAYLOCK, D. N., MAKINO, S., DOWSE, T. L., TRIMBOLI, S., NIUTTA, S., TO, L. B., JUTTNER, C. A., SIMMONS, P.J. *Ex vivo* hematopoietic progenitor cell expansion. **Immunomethods**. vol. 5. p. 217-225. 1994.

HITOSHI AMANO, SHOJI YAMADA, and ROLF FELIX. Colony-Stimulating Factor-1 Stimulates the Fusion Process in Osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research** Volume 13, Number 5, 1998.

HOLYOAKE, T.L. Cytokines at the research-clinical interface: potential applications. **Blood Reviews** vol.10, p.189 –200, 1996.

HUME, D. A., PAVLI, P., DONAHUE, R. E., et al. The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte system “in vivo”. **Journal of Immunology**. vol. 141 (10). p. 3405-3409. 1988.

IMADA, C., HASUMURA, M., NAWA, K. Promotive effect of macrophage colony-stimulating factor on long-term engraftment of murine hematopoietic stem cells. **Cytokine** vol. 31, p. 447—453, 2005.

INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S., STEINMAN, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Experimental Medicine**. vol. 176. p. 1693-1702. 1992.

J THIELE, HM KVASNICKA, DW BEELEN, B PILGRAM, A ROSE, L-D LEDER AND UW SCHAEFER. Erythropoietic reconstitution, macrophages and reticulin fibrosis in bone marrow specimens of CML patients following allogeneic transplantation. **Leukemia** vol.14, p.1378–1385, 2000.

JARAMILLO G M, FIGUEROA E F, MORALES E G, VALLE E S, MAYANI H,. Tumor Necrosis factor- α Levels in long-term marrow cultures from patients with aplastic anemia: modulation by granulocyte-macrophage colony- stimulating factor. **American Journal of Hematology** 68: 144-148, 2001.

JARVIS, L. J., MAGUIRE J. E., LeBIEN, T. W. Contact between human bone marrow stromal cells and B lymphocytes enhances very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1-independent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and ERK2 in stromal cells. **Blood** vol. 90. no 4. p. 1626-1635. 1997.

JONAS, W. B., JACOBS, J. A cura através da homeopatia. Editora Campus. 283 pg. Rio de Janeiro, 1996.

KAMEOKA J, NOBUAKI Y, OBINATA M. Bone marrow stromal cells selectively stimulate the rapid expansion of lineage-restricted myeloid progenitors. **Journal of Cellular Physiology**; 164: 55-64,1995.

KATSURA, Y. Redefinition of lymphoid progenitors. **Nature Reviews**. vol. 2. p. 1-6. 2002.

KIM J. M., KIM H. , KWON S. B., LEE S.Y., CHUNG S.C., JEONG D.W., MIN B.M., Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 325, 101–108, 2004.

KINA, T., IKUTA, K., TAKAYAMA, E., WADA, K., MAJUMDAR, A. S., WEISSMAN, I. L., KATSURA, Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. **British Journal of Haematology**. vol. 109. p. 280-287. 2000.

KONDO, M., WEISSMAN, I. L., AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**. vol. 91. p. 661-672. 1997.

KONDO, M., WAGERS, A. J., MANZ, M. G., PROHASKA, S. S., SCHERER, D. C., BEILHACH, G. F., SHIZURU, J. A., WEISSMAN, I. L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. **Annual Review of Immunology**. vol. 21. p. 759-806. 2003.

KUROSAKA, D., LEBIEN, T.W., PRIBYL, J.A.R. Comparative studies of different stromal cell microenvironments in support of human B-cell development. **Exp. Hematol.** vol.27, p.1271—1281, 1999.

LADNER M. B. MARTIN G.A. , NOBLE J. A. , WITTMAN V.P., WARREN, K. M., MCGROGAN M., e STANLEY R. cDNA cloning and expression of murine macrophage colony-stimulating factor from L929 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Vol. 85, pp. 6706-6710, 1988

LEVY, J. A., WEISS R. M., DIRKSEN E. R., e ROSEN M. R. Possible Communication between murine macrophages oriented in linear chains in tissue culture. **Exp. Cell Res.** 103: 375-385, 1976.

LIN, H., CHEN, C. CHEN B.D.-M. Resistance of bone marrow-derived macrophages to apoptosis is associated with the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in primary cultures of bone marrow cells. **Biochem. J.** vol. 353, p. 299—306, 2001.

LONG, M.W., WILLIAMS, J.L., MANN, K.G. Expression of human bone-related proteins in the hematopoietic microenvironment. **J. Clin. Invest.** vol. 86, p. 1387—1395, 1990.

LOPES, L., GODOY, L.M.F., DE 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, 277—287, 2006.

LORD, B. I. **Biology of haemopoietic stem cell**. Editora C. Potten. p. 401. NY Academic Press. 1997.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica**. 2ª Edição. MEDSI – Editora Médica e Científica Ltda, 1999.

MARASKOVSKY, E., BRASEL, K., TEEPE, M., ROUX, E. R., LYMAN, S. D., SHORTMAN, K., McKENNA, H. J. Dramatic increase in the number of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: Multiple dendritic cell subpopulation identified. **Journal of Experimental Medicine**. vol. 184. p. 1953-1962. 1996.

MCINTYRE, J. A., LA VIA M. F., PRATER T. F. K., e NIBLACK G. D. Studies of the immune response “in vitro”. Ultrastructural examiinationi of cell types and cluster formation and functional evaluation of clusters. **Lab. Invest.** 29: 703-713, 1973.

METCALF, D. Murine hematopoietic stem cells committed to macrophages/dendritic cell formation: Stimulation by Flk2-ligant with enhancement by regulators using the gp130 receptor chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA. vol. 94. p. 11552-11556. 1997.

MEZEY, E., CHANDROSS, K.J., HARTA, G., MAKI, R.A., MC KERCHER, S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. **Science** vol. 290, p. 1779—1782, 2000.

MIYAKE, K., MEDINA, K., ISHIHARA, K., KIMOTO, M., AUERBACH, R., KINCADE, P.W. A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture. **J. Cell Biol.** Vol.114 (3), p. 557—565, 1991.

MIRANDA M., XU H., TORCHIA J., JOHNSON D. Cytokine-induced myeloid differentiation is dependent on activation of the MEK/ERK pathway. **Leukemia Research**, Vol. 29, Issue 11, Pages 1293-1306, 2005.

MOORE, M.A.S. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. **Blood**. vol. 78. n^o 1. p. 1-19. 1991.

MOORE R., STEEG P. S., MANNEL D. N., e MERGENHAGEN S. Role of Lipopolysaccharide in Regulating Colony-Stimulating Factor-Dependent Macrophage Proliferation “in vitro”. **Infection And Immunity**, Vol. 30, No. 3, p. 797-804, 1980.

MOTOYOSHI, K. Biological activities and clinical applications of M-CSF. **International Journal of Hematology**. vol. 67(2). p 109-122. 1998.

MÜLLER-SIEBURG, C. E., DERYUGINA, E. The stromal cells: guide to the stem cell universe. **Stem Cells**. vol. 13. p. 477-486. 1995

NATHAN, C.F.. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.** 79: 319-326. 1987
OLINS, A.L., OLINS, D.E. The mechanism of granulocyte nuclear shape determination: possible involvement of the centrosome. **Eur. J. Cell Biol.** vol. 84, p.181—188, 2005.

OBADINA, M., VERMA, U., HAWKINS, M e MAZUMDER, A Immunomodulation following chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, 38: 41-48, 1996

OLIVEIRA, C.C., 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. **Journal of Cellular Biochemistry** 9999: 1-14, 2008.

ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., JAKONIUK, I., ANDERSON, S.M., LI, B., PICHEL, J., MCKAY, R., NADAL-GINARD, B., BODINE, D.M., ANNAROSA, A.K., GERSTENSTEIN, M., IKAWA, M., OKABE, M., NAGY, A. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature** vol. 410, p. 701—705, 2001.

- ORKIN S. H. Diversification of Haematopoietic Stem Cells to specific lineages. **Nature Reviews** vol. 1 p. 57-64, 2000.
- OTTMANN, O. G., HOELZER, D. Growth factors in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**. vol. 22. p. 1171-1178. 1998.
- PARMLEY, R. T., OGAWA NI., SPICER S S., e WRIGHT N. J. Ultrastructure and cytochemistry of bone marrow granulocytes in culture. *Exp. Hematol.* 4:75-89, 1976.
- PAUL, S.R., YANG, Y-C., DONAHUE, R.E., GOLDRING, S., WILLIAMS, D.A. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. **Blood**. vol. 77, n°8. p. 1723-1733. 1991.
- PEARCE, D.J., RIDLER, C.M., SIMPSON, C., BONNET, D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. **Blood** vol.103 (7), p. 2541—2546, 2004.
- 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. **Journal of Infection** vol.51 (2), p.157—164, 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.** vol 33 (4), p. 255—263, 2002.
- PORVAZNIK M. e MACVITTIE T. J. Detection of gap Junctions between the progeny of a canine macrophage colony-forming cell “in vitro”. **The Journal of Cell Biology**, V.82, - p 555-564, 1979
- QUESENBERRY, P. J.; COLVIN, G. A. **Williams - Hematology**. 6th edition, Mc. Graw-Hill Medical publishing division. 1939pg.
- RUSTEN L.S., JACOBSEN F.W., LESSLAUER W., LOETSCHER H., SRNELAND E. B., e JACOBSEN S. E. W. Bifunctional Effects of Tumor Necrosis Factor α (TNF α) on the Growth of Mature and Primitive Human Hematopoietic Progenitor Cells: Involvement of p55 and p75 TNF Receptors. **Blood**, Vol 83, No 11:p: 3152-3159, 1994.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**, 5^a edição, Editora Malone LTDA. São Paulo. 423pg. 1999.
- SATO, D.Y.O., WAL, R., DE 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** vol.94 (1), p. 26—32, 2005.

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), 223—228, 2003.

Separação e contagem de células mononucleares de sangue periférico. Disponível em: <http://www.lvapli.ufsc.br> - Acesso em 10/03/2008

SHIMA, M., TEITELBAUM, S.L., HOLERS, V.M., RUZICKA, C., OSMACK, P., ROSS, F.P.,. Macrophage-colony-stimulating factor regulates expression of the integrins $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ by murine bone marrow macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** vol. 92, p.5179—5183, 1995.

SHIVANI S., SHASHI B., AJAY K., e MANJIT H. Changing Pattern of the subcellular distribution of erythroblast macrophage protein (Emp) during macrophage differentiation. **Blood Cells Mol Dis.**; 38(1): 25–31, 2007.

SHOHAM, D., DAVID E. B., e ROZENSZAJN L. A.. Cytochemical and morphologic identification of macrophages and eosinophils in tissue cultures of normal human bone marrow. **Blood.** 44: 221-233, 1974.

SINGH S. M., SINGH N., SHRIVASTAVA P. Effect of alcoholic extract of Ayurvedic herb *Tinospora cordifolia* on the proliferation and myeloid differentiation of bone marrow precursor cells in a tumor-bearing host. **Fitoterapia** vol. 77 p. 1 – 11, 2006.

SLAPER-CORTENBACH I., PLOEMACHER R. AND LÖWENBERG BOB. Different stimulative effects of human bone marrow and fetal stromal cells on erythropoiesis in long-term culture. **Blood** vol. 69 (1) p.135-139, 1987.

SONI, S., BALA, S., KUMAR, A., HANSPAL, M. Changing Pattern of the subcellular distribution of erythroblast macrophage protein (Emp) during macrophage differentiation. **Blood Cells Mol Dis.** vol. 38(1): p. 25–31, 2007

STROPARO, E. **Pacientes HIV/AIDS+ tratados com o medicamento homeopático Canova – estudo prospectivo observacional em índices laboratoriais, clínicos e de qualidade de vida.** Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná.

SWEET, M.J. e HUME, D.A. CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis** vol.51, p.169—177, 2003.

TOUW, I., LOWENBERG, B. No stimulate effect of adipocytes on hematopoiesis in long-term human bone marrow cultures. **Blood**. vol. 61. n°4. p. 770-774. 1983.

VALLEDOR, A. F., BORRAS, E. F, CULLEL-YOUNG, M., e CELADA, A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. **J. Leukoc. Biol.** 63: 405-417, 1998.

VILA M. C. **Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir**. Barcelona, 2002. Tesis Doctora I(Programa de doctorado en Inmunología) Universitat de Barcelona.

WHETTON, A. D. & GRAHAM, G. J. Homing and mobilization in the stem cell niche. **Trends in Cell Biology**. vol. 9. p. 233-238. 1999.

WOLPERT, L., BEDDINGTON, R., BROCKES, J., JESSEL, T., LAWRENCE, P., MEYEROWITZ, E. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**, 1ª Edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2000.

YOKOYAMA, S-I., FUKUDA, N., LI Y., HAGIKURA, K., TAKAYAMA, T., KUNIMOTO, S., HONYE, J., SAITO, S., WADA, M., SATOMI, A., KATO, M., MUGISHIMA, H., KUSUMI, Y., MITSUMATA, M., MUROHARA, T. A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** vol.40 (1), p. 24—34, 2006.

YOKOYAMA T., ETOH T., KITAGAWA H., TSUKAHARA S., KANNAN Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erithroid maturation proceeds in the rat bone marrow **J. Vet. Med.** vol.65 (4), p.449—452, 2003.

XAUS, J., COMALADA, M., VALLEDOR, A.F., LLOBERAS, J., LOPEZ-SORIANO, F., ARGILES, J.M., BOGDAN, C., e CELADA, A.. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-a. **Blood**. 95:3823-3831. 2000.

ZHANG, D., JOHNSON, M. M., MILLER, C. P., PIRCHER, T. J., GEIGER, J. N., WOJCHOWSKI, D. M. An optimized system for studies of EPO-dependent murine pro-erythroblast development. **Experimental Hematology**. vol. 29. p. 1278-1288. 2001.

ZUCKERMAN K.S e WICHA M.S. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. **Blood**; 61: 540-547,1983.

ANEXO 1- TABELA 3 CONTAGEM DE CÉLULAS APÓS TRATAMENTO *IN VITRO*

<i>Linfócitos</i>			
Tratamento / tempo	48 horas	72 horas	96 horas
Grupo1	0.7979 a (A)	0.7151 ab (B)	0.7177 a (B)
Grupo2	0.7679 b (A)	0.7273 a (B)	0.7152 a (B)
Grupo3	0.7199 c (A)	0.7204 ab (A)	0.7071 a (A)
Grupo4	0.7316 c (A)	0.7107 b (B)	0.7071 a (B)

<i>Macrófagos Residentes</i>			
Tratamento / tempo	48 horas	72 horas	96 horas
Grupo1	0.8381 a (A)	0.8279 a (A)	0.6873 a (B)
Grupo2	0.8332 a (A)	0.8520 a (A)	0.5307 b (B)
Grupo3	0.6343 b (A)	0.6004 c (AB)	0.5271 b (B)
Grupo4	0.7770 a (A)	0.7109 b (A)	0.4924 b (B)

<i>Macrófagos ativados</i>			
Tratamento / tempo	48 horas	72 horas	96 horas
Grupo1	0.0153 c (C)	0.1555 b (B)	0.2974 b (A)
Grupo2	0.0518 c (B)	0.1044 b (B)	0.4488 a (A)
Grupo3	0.3194 a (B)	0.3507 a (B)	0.4491 a (A)
Grupo4	0.1709 b (C)	0.2674 a (B)	0.4703 a (A)

<i>Nichos celulares</i>			
Tratamento / tempo	48 horas	72 horas	96 horas
Grupo1	0.7071 b (A)	0.7071 b (A)	0.7071 b (A)
Grupo2	0.7071 b (A)	0.7085 b (A)	0.7091 b (A)
Grupo3	0.7085 ab(A)	0.7083 b (A)	0.7107 b (A)
Grupo4	0.7136 a (B)	0.7169 a (B)	0.7283 a (A)

<i>Células com Núcleo em Anel</i>			
Tratamento / tempo	48 horas	72 horas	96 horas
Grupo1	0.7137 b (A)	0.7107 b (A)	0.7071 b (A)
Grupo2	0.7244 a (A)	0.7157 a (AB)	0.7112 ab (B)
Grupo3	0.7252 a (A)	0.7265 a (A)	0.7201 a (A)
Grupo4	0.7123 b (A)	0.7089 b (A)	0.7119 ab (A)

Tabela 3 – Análise morfológica das células aderentes. Células mononucleares de medula foram contadas de acordo com o item 4.6.2. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. Os resultados são expressos em números transformados representando três experimentos independentes; Controle=Grupo1; IH=Grupo2; IH + M-CSF=Grupo3; M-CSF=Grupo4. Letras maiúsculas indicam comparação dentro da linha (tempo da cultura); letras minúsculas indicam comparação dentro da coluna (tratamento); as mesmas letras indicam que não existem diferenças e diferentes letras indicam que existe diferença estatística na comparação entre eles.

ANEXO 2- TABELA DA CONTAGEM DE CÉLULAS APÓS TRATAMENTO *IN VIVO*

A – Linfócitos				
	GI	MQ	CV	V – valor
Tratamentos	11	0,025683	22,4432	2,08989E-24
Tratamento (T)	3	0,006461	5,6456	0,001175508 *
tempo(t)	2	0,127377	111,3071	3,09474E-28 *
Txt	6	0,001397	1,2207	0,300243575n.s.
Residuo	122	0,001144		
Total	133		CV= 4,28%	
B – Macrófagos residentes				
	GI	MQ	CV	V – valor
Tratamentos	11	0,047546	23,5818	2,9257E-25
Tratamento(T)	3	0,018398	9,1250	1,70276E-05*
Tempo(t)	2	0,233088	115,6057	6,88375E-29 *
Txt	6	0,000273	0,1356	0,991405907n.s.
Residuo	122	0,002016		
Total	133		CV=5,13%	
C – Macrófagos ativados				
	GI	MQ	CV	V – valor
Tratamentos	11	0,107253	43,1744	7,93185E-37
Tratamento(T)	3	0,016251	6,5419	0,000386578*
Tempo(t)	2	0,562184	226,3049	8,83467E-42*
Txt	6	0,001111	0,4471	0,845851737n.s.
Residuo	122	0,002484		
Total	133		CV=4,85%	
D – Nichos Celulares				
	GI	MQ	CV	V – valor
Tratamentos	11	0,000502	7,6259	6,76419E-10
Tratamento (T)	3	0,000261	3,9624	0,009797955 *
Tempo(t)	2	0,001647	25,0280	7,79981E-10 *
Txt	6	0,000241	3,6569	0,002253948 *
Residuo	122	0,000066		
Total	133		CV=1,13%	
E – Células com núcleo em anel				
	GL	MQ	CV	V – valor
Tratamentos	11	0,001211	7,2387	2,11619E-09
Tratamento T)	3	0,001074	6,4202	0,000449238 *
tempo(t)	2	0,002503	14,9588	1,54828E-06 *
Txt	6	0,000849	5,0746	0,000110946 *
Residuo	122	0,000167		
Total	133		CV= 1,79%	

Tabela 4: Contagem de células e análise de variância (ANOVA) após tratamento *in vivo*: com um diagrama fatorial, delineado ao acaso, para determinar a significância estatística(*); foram considerados: linfócitos, macrófagos residentes, macrófagos ativados, nichos celulares e células com núcleo em anel; e as seguintes interações: tratamento; tempo da cultura, e tratamento x tempo. Linfócitos, macrófagos residentes e macrófagos ativados apresentaram significância para tratamento e tempo, mas não para tratamento x tempo; Nichos celulares e células com núcleo em anel mostraram estatísticas diferenças para todas as interações; MQ: média quadrada; GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação;

ANEXO 3- TABELA 5 MOSTRANDO COMPARAÇÃO TEMPO E TRATAMENTO

A – Linfócitos		Média	Tempo	Média
Grupo 4		0,8026 a	24	0,8555 a
Grupo 2		0,7959 a	48	0,7663 b
Grupo 1		0,7939 a	72	0,7570 b
Grupo 3		0,7705 b		
		$\Delta=0,0213$	$\Delta=0,0172$	
B – Macrófagos residentes		Média		Media
Grupo 1		0,9029 a	24	0,9623 a
Grupo 2		0,8875 a b	48	0,8397 b
Grupo 4		0,8619 b c	72	0,8313 b
Grupo 3		0,8500 c		
		$\Delta=0,0283$	$\Delta=0,0228$	
C – Macrófagos ativados		Média		Média
Grupo 3		1,0596 a	24	1,0967 a
Grupo 4		1,0259 b	48	1,0807 a
Grupo 2		1,0153 b	72	0,8921 b
Grupo 1		1,0089 b		
		$\Delta=0,0314$	$\Delta=0,0288$	

Tabela 5: Dados da análise estatística: As medias percentuais depois de analisadas com ANOVA demonstraram que linfócitos, macrófagos residentes, e macrófagos ativados apresentaram relevância estatística somente para tratamento e tempo apenas e não quando comparado tratamento x tempo. Desta forma o teste de Tukey foi analisado separadamente. Os resultados estão expressos em números transformados, representando três experimentos independentes. Grupo 1: controle; Grupo 2: camundongos tratados com o medicamento homeopático; Grupo 3: medicamento homeopático com M-CSF; e Grupo 4: camundongos tratados com M-CSF. As mesmas letras indicam que não há diferença entre a comparação proposta e diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre as comparações propostas. Δ = resultado do teste de Tukey

ANEXO 4 – TABELA 6 MOSTRANDO ANÁLISE SIGNIFICATIVA

A – Nichos Celulares		Tratamento X tempo		
	24 h	48h	72h	
Grupo 1	0,71512	0,7240125	0,711025	
Grupo 2	0,718517	0,717317	0,71525	
Grupo 3	0,7291625	0,7261417	0,713425	
Grupo 4	0,7152417	0,715067	0,715033	
	$\Delta=0,0094541$	$\Delta=0,0090141$	$\Delta=0,00863036$	
B –Células com núcleo em anel		Tratamento X tempo		
	24h	48h	72h	
Grupo 1	0,71725	0,70795	0,711025	
Grupo 2	0,714425	0,735858	0,71525	
Grupo 3	0,7210625	0,738383	0,713425	
Grupo 4	0,7344667	0,724475	0,71503	
	$\Delta=0,0150385$	$\Delta=0,0143387$	$\Delta=0,0137283$	

Tabela 6: Análise estatística dos nichos celulares e células com núcleo em anel: Dados comparativos entre tratamento e tempo demonstrando significância; Grupo 1: controle; Grupo 2: camundongos tratados com o medicamento homeopático; Grupo 3: camundongos tratados com o medicamento homeopático e M-CSF; Grupo 4: tratamento com M-CSF. Δ = Resultado do teste de Tukey

ANEXO 5 - TABELA 7 MOSTRANDO COMPARAÇÕES TEMPO x TRATAMENTO

A – Nichos celulares		Tratamento X tempo			
24 h		48h		72h	
Grupo 3	0,7291625 a	Grupo 3	0,7261417 a	Grupo 2	0,71525 a
Grupo 2	0,718517 b	Grupo 1	0,7240135 b	Grupo 4	0,715033 a
Grupo 4	0,7152417 c	Grupo 2	0,717317 b	Grupo 3	0,713425 a
Grupo 1	0,715112 c	Grupo 4	0,715067 b	Grupo 1	0,711025 a
B – Células com núcleo em Anel		Tratamento X tempo			
24h		48h		72h	
Grupo 4	0,7344667 a	Grupo 3	0,738383 a	Grupo 2	0,71525 a
Grupo 3	0,7210625 ab	Grupo 2	0,735858 a	Grupo 4	0,71503 a
Grupo 1	0,71725 b	Grupo 4	0,724475 a	Grupo 3	0,713425 a
Grupo 2	0,714425 b	Grupo 1	0,70795 b	Grupo 1	0,711025 a

Tabela 7: Dados da análise estatística: as medias percentuais após analisadas ANOVA demonstraram que os nichos celulares as células com núcleo em anel apresentaram significância estatística. Os resultados são expressos como números transformados, representando três experimentos independentes. As mesmas letras indicam que não há diferença e letras diferentes indicam estatística relevância entre as comparações estabelecidas. Grupo 1: controle ; Grupo 2: camundongos tratados com o medicamento homeopático; Grupo 3: tratamento com o medicamento homeopático e M-CSF; Grupo 4: camundongos tratados com M-CSF. Δ = Resultado do teste de Tukey.

ANEXO 6: PROCEDÊNCIA DA CÉLULA L929

Banco de Células do Rio de Janeiro;

linhagem celular; L- 929

tecido; conjuntivo

tipo celular; fibroblasto

morfologia característica; fibroblasto

patologia; normal

origem; camundongo mus musculus

sexo; masculino

produto; fator estimulador de colônia para macrófagos (csf), M-CSF

ANEXO 7: PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA CULTURA DE CÉLULAS

MEIO DE CULTURA EAGLE DULBECO MODIFICADO

Equipamento

- a) Aparelho de Fluxo Laminar
- b) Balança semi - analítica
- c) Aparelho de filtração esterilizante (Sartório ou Tripé)
- d) Potenciômetro
- e) Container
- f) Agitador magnético

Material

- a) Balão Volumétrico com capacidade para 1000 mL.....1 unid.
- b) Frasco estéril com tampa.....1 unid.
- c) Espátula para pesagem.....1 unid.
- d) EAGLE DMEMp/1L
- e) HEPES (tampão)..... ..2,00 g
- f) NaHCO₃2,20 g
- g) Água deionizada e purificada por milliqqsp.....1000 mL

Método

- a) Pesar e adicionar as substâncias na ordem relacionada
- b) Dissolver bem por agitação
- c) Completar o volume para 1000 mL
- d) Acertar o pH para 7,4 com HCl 1N ou NaOH 1N. Filtrar em membrana 0,22 µm e rotular
- e) Retirar amostras para controle de esterilidade
- f) Conservar em câmara fria com temperatura de 7°C ± 5°C
- g) Estocar por no máximo, seis meses

PREPARO DA SOLUÇÃO DE CIPROFLOXACINO (CIPRO)

Equipamento

- a) Balança semi – analítica

b) Membrana filtrante 0,22 μ m

c) Espátula para pesagem

Material

a) Balão volumétrico com capacidade para 100 mL1 unid.

a) Frascos esterilizados para fracionamento em alíquotas.

b) ciprofloxacino cloridrato.....0,1331 g

c) Água deionizada e purificada em Millq qsq.....100 mL

Método

a) Dissolver a ciprofloxacino cloridrato em água

b) Filtrar em membrana 0,22 μ m

c) Distribuir em volume de 10 μ l /frascos esterilizados

d) Retirar alíquotas para teste de esterilidade

e) Rotular, identificar e datar estocando os mesmos em congelador de 4° C

f) Usar 2 mL desta solução para cada 100 mL de meio

h) Estocar por seis meses.

PREPARO DA L-GLUTAMINA 50X CONCENTRADO

Equipamento

a) Agitador magnético

b) Filtro sartório

c) Balança semi - analítica

d) Membrana filtrante 0,22 μ m

e) Espátula para pesagem

Material

a) Balão volumétrico com capacidade para 250 mL1 unid.

d) Frascos esterilizados para fracionamento em alíquotas.

e) L - Glutamina3 g

d) Água deionizada e purificada em Millq qsq.....100 mL

Método

- a) Dissolver a L - glutamina em água com auxílio de agitador magnético
- b) Filtrar em membrana 0,22 µm
- c) Distribuir em volume de 10, 20 ou 30 mL/frasco esterilizado
- d) Retirar alíquotas para teste de esterilidade
- e) Rotular os frascos, identificar e datar estocando os mesmos em freezer de $-23^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- f) Usar 2 mL desta solução para cada 100 mL de meio
 - i) Estocar por seis meses.

OBSERVAÇÃO: a estabilidade da L - glutamina é de cerca de duas semanas.

Filtração de pequenas quantidades

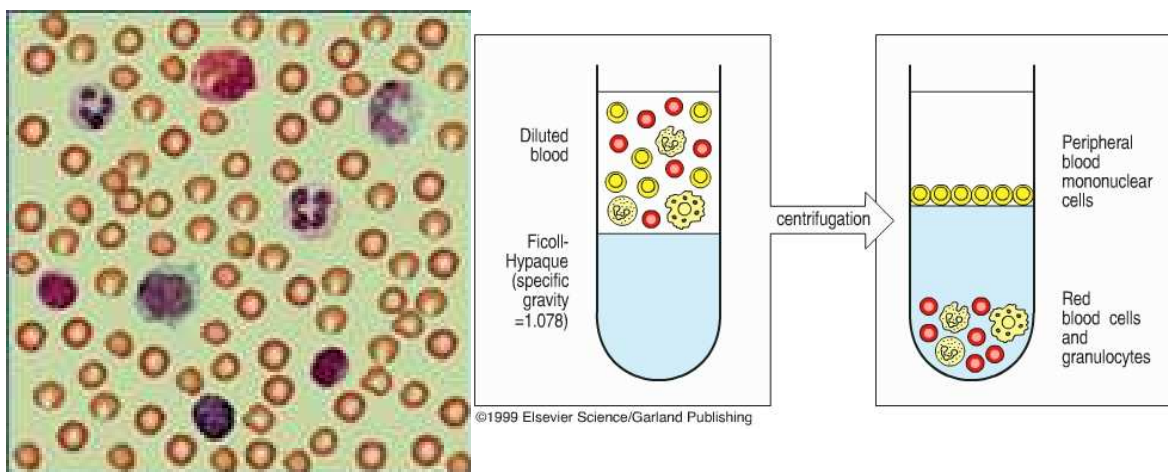
Para filtrar pequenas quantidades de solução a serem usadas no cultivo de células usa - se filtros millex 0,45 µm e o esterilizante millex 0,22 µm descartável, bem como o filtro swinny, não descartável, ambos usados com o auxílio de seringa (de 5 mL, 10 mL, 20 mL ou 50 mL) dependendo da quantidade de filtrado que se pretende obter.

Controle de esterilidade utilizando Tioglicolato e Caseína

- a) Após a filtração e, antes de serem usadas, quaisquer soluções (Meio de cultura, L- glutamina e CMF-BSS), devem ser testadas quanto à presença de fungos ou de bactérias contaminantes.
- b) O controle de esterilidade é realizado por meio de teste com Tioglicolato e Caseína, fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia, distribuídos em tubos tamponados com algodão em volumes de 10 mL.
- c) Adicionar 1mL da solução filtrada em cada tubo de caseína (para fungos) e tioglicolato (para bactérias aeróbias e anaeróbias).
- f) Os tubos ficam num total de 15 dias incubando, sendo 7dias em estufa seca a $35^{\circ}\text{C} \pm 5$ para tioglicolato (bactérias) e $25^{\circ}\text{C} \pm 5$ para caseína (fungos)e, 8 dias em temperatura ambiente e local escuro.
- e) Ao término do teste, todos os tubos inoculados, assim como seus controles, são autoclavados, antes de serem enviados à lavagem.

ANEXO 8 : SEPARAÇÃO E CONTAGEM DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE

O Ficoll-Hypaque consiste de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa. Os gradientes de Ficoll-Hypaque são utilizados em laboratórios clínicos para separar os componentes celulares do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos, etc.). A mistura Ficoll-Hypaque é colocada no fundo de um tubo e as células de medula são vagarosamente colocadas sobre a fase de Ficoll. Após ser centrifugado, as duas fases tornam-se bem visíveis e a separação ocorre da seguinte maneira: na fase superior fica o plasma e seus constituintes solúveis, na interface as células mononucleares, em seguida o Ficoll e após os eritrócitos e granulócitos que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo.



PROCEDIMENTO

1. Coletar 10 mL de células de medula
2. Em outro tubo colocar 3 ml de Ficoll e sobre ele, de forma lenta e cuidadosa, adicionar os 10 ml de células coletadas. É essencial que o material depositado não se misture com a solução de Ficoll formando duas fases bem distintas
3. O material vai para a centrifugação a 1000rpm por 40 minutos, em centrífuga clínica
4. Com pipeta Pasteur coletar cuidadosamente a nuvem de células que se formou na interfase e transferir para um tubo contendo solução de PBS. Esta etapa é importante, pois o Ficoll é tóxico para as células e precisa ser rapidamente diluído para não causar lise celular
5. Centrifugar estas células diluídas em salina a 1.000 rpm por 10 minutos e repetir esta lavagem mais uma vez. Esta lavagem é importante para eliminar plaquetas contaminantes que ficam nesta interfase e atrapalham a contagem.
6. Após a segunda lavagem ressuspender o sedimento celular em meio de cultura e proceder a contagem.
7. Foram plaqueadas em placas de 24 poços 250.000 células por poço

ANEXO 9: FIXAÇÃO, COLORAÇÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS DE CÉLULAS ADERENTES

Preparo do Fixador Bouin:

Formol comercial.....50 ml

Solução saturada de ácido pícrico.....150ml

Ácido acético glacial.....10ml

Tempo de fixação; 1 minuto

Lavar 3 vezes e executar o procedimento de coloração

Coloração com Giemsa

Adição do corante Giemsa (Pro Cito[®]). Mantê-lo por 10 minutos nas células aderentes;

As lamínulas foram lavadas com água destilada e desidratadas, passando pela seguinte bateria:

Desidratação do material:

- acetona 100% Merck[®];
- acetona 100% Merck[®];
- mistura I (1 xilol : 2 acetona) Merck[®];
- mistura II (1 xilol : 1 acetona) Merck[®];
- mistura III (2 xilol : 1 acetona) Merck[®];
- xilol 100% Merck[®];
- xilol 100% Merck[®];

Montagem das lâminas com resina Entellan[®].

OBS: Após a fixação e lavagem, pode-se interromper o procedimento com adição de álcool 70% Merck[®] e armazenamento das lamínulas a 4°C

ANEXO 10: IMUNOCITOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

- Sobrenadante celular retirado e centrifugado, para que as células presentes fossem discriminadas;
- Separação da alíquota (50µl) de cada solução de sobrenadante; .
- Adição, em único tubo, de 2,5µl de cada anticorpo conjugado com partícula fluorescente (*bead*) (as soluções dos anticorpos devem ser vortexadas antes da utilização). Os *beads* conjugados a cada anticorpo, apresentam fluorescências diferentes;
- Distribuição dessa solução em dois tubos separados e adição dos sobrenadantes;
- Adição do *mouse Th1/Th2 PE detection reagent* (anticorpos, específicos para cada citocina, acoplados ao fluorocromo ficoeritrina -PE);
- Incubação por 3 horas, a temperatura ambiente, no escuro;
- Adição, a cada tubo, de 100µl de *wash buffer* (solução de lavagem e leitura);
- Centrifugação a 1.300 rpm por 5 minutos;
- Sobrenadante descartado e nova adição de 200µl de *wash buffer*;
- Solução homogeneizada e vortexada;
- Análise no citômetro de fluxo FACSCalibur.

ANEXO 11: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

- **Fixação:** Gutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4%, CaCl_2 1 mM, em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente.
- Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, 3 vezes 10 minutos cada.
- **Pós-fixação:** Tetróxido de Ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8%, CaCl_2 1 mM, em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, por 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente
- Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, 3 vezes.
- **Desidratação:** acetona 50%, 70%, 90% e 100%, de 15 minutos cada.
- **Infiltração** : acetona : epon – 3:1, acetona : epon – 1:1, acetona : epon – 1:3, epon puro.
- **Emblocagem**
- **Polimerização**
- **Ultramicrotomia**
- **Contrastação com chumbo e uranila**
- **Observação:** Microscópio Eletrônico de Transmissão

1. Fixação: a solução fixadora de Karnovsky conterà no final:

glutaraldeído 2 %

paraformaldeído 4%

tampão cacodilato de sódio 0,1M

cloreto de cálcio 1 mM

pH acertado para 7,2 a 7,4 com NaOH ou HCl 1M

2. Pós-fixação

Consiste em impregnação de um metal pesado no material para uma boa visualização no MET. Impregnação com solução de ósmio a 1% por 30 minutos.

Proteger o material da luz, cobrindo o recipiente com papel alumínio, pois a luz oxida o ósmio.

Solução estoque de ferricianeto (ou ferrocianeto) de potássio a 3,2% em água destilada contendo 5mM de CaCl_2 , tetróxido de ósmio a 4% (coberto e muito bem vedado frasco) e tampão cacodilato 0,1M.

Preparo da solução

1 gota de tetróxido de ósmio a 4% - concentração final 1%

1 gota de ferricianeto de potássio/ CaCl_2 .

2 gotas de tampão cacodilato de sódio 0,2M

Concentração da solução final: tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8%, CaCl_2 1mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M.

3. Desidratação

Desidratar o material em bateria de acetona 50%, 70%, 80%, 90%, 100% e 100% por 15 minutos cada vez (se precisar interromper, guardar em acetona 70%, geladeira).

4. Inclusão

Infiltrar o material com as misturas:

Mistura I - acetona 2: epon 1 - deixar OVERNIGHT

Mistura II - acetona 1: epon 1 - deixar OVERDAY

Mistura III - acetona 1: epon 2 - deixar OVERNIGHT

Após essa etapa deve-se infiltrar em epon puro e deixar OVERDAY.

Emblocar e etiquetar. Deixar em estufa a 60°C por 3 ou 4 dias.

OBSERVAÇÕES:

- Todo o trabalho deve ser feito em capela, luvas e máscara.
- As pipetas devem ser descartáveis.
- Descarte dos fixadores e solventes em leite em pó, que contém proteínas, lipídeos e carboidratos, que permitem reações que neutralizam as soluções, e

depois encaminhados para lixo hospitalar. As resinas devem ser polimerizadas, isto é, transformadas em plástico, antes de serem descartadas.

Preparo do Epon

Observação: usar proveta e bastão de vidro marcado para uso apenas de epon.

- Colocar em uma proveta 25 ml da resina Epon ou Polybed 812;
- Acrescentar 17 ml da resina NMA;
- Agitar 15 minutos, sem fazer bolhas;
- Acrescentar 8 ml da resina DDSA;
- Agitar mais 15 minutos sem fazer bolhas;
- Enquanto agita vai colocando lentamente 32 gotas de DMP-30;
- Agitar mais 15 minutos.

A resina pode ser estocada em frascos escuros, tampados ou em seringas (facilidade de uso), bem vedadas com parafilme (ausência de ar) e guardadas em frasco maior, juntamente com sílica para tirar a umidade, em freezer.

ANEXO 12: IMUNOCITOQUÍMICA PARA IMUNOFENOTIPAGEM

- Centrifugação do sobrenadante da cultura a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Sobrenadante desprezado e fixação do sedimento com 1 ml de paraformaldeído (EMS) 1%, por 1 hora;
- Centrifugação das células fixadas a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Sobrenadante desprezado;
- Lavagem com PBS através de centrifugação a 2.800 rpm por 3 minutos;
- Concentração celular ajustada para 10^6 . Essa quantidade foi colocada em tubos tipo eppendorfs[®] separados, já que cada alíquota celular recebeu apenas um dos anticorpos utilizados, para tornar possível a análise individual;
- Adição de 100µl de PBS e 1µl de cada anticorpo primário (concentração final do anticorpo 0,5µg%). Todos os anticorpos utilizados são biotinizados;
- Incubação por 40 minutos a temperatura ambiente sobre a bancada;
- Centrifugação dos tubos a 2.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado;
- Adição de 100µl de PBS e 1µl de estreptavidina conjugado com o fluorocromo ficoeritrina, em cada tubo (concentração final da estreptavidina 0,5µg%);
- Incubação por 30 minutos, no escuro a temperatura ambiente;
- Centrifugação dos tubos e sobrenadante desprezado;
- Lavagem das células com 100µl de PBS;
- Centrifugação das células e sobrenadante descartado;
- Adição, a cada tubo, de 800µl de PBS para a leitura no citômetro de fluxo;
- Foram usados mais dois tubos, um contendo apenas células e outro apresentando células e estreptavidina apenas, ambos para calibrar o aparelho e funcionam como controle da autofluorescência celular;
- Análise no citômetro de fluxo FACSCalibur.