

LUCIANA LOPES

**CITOQUÍMICA ULTRAESTRUTURAL DE ENZIMAS EM
MACRÓFAGOS TRATADOS COM O MEDICAMENTO
HOMEOPÁTICO MÉTODO CANOVA®**

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

**CURITIBA
2002**

Ao meu avô, Donaldo Kock (*in memoriam*), que foi um exemplo de vida a ser seguido, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Ramiro Claudio Lopes e Liane Lopes, obrigada por me darem o dom da vida, por todo seu amor, carinho e ajuda. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao Cezar Luiz Czarny, meu amor, por estar sempre por perto. Com seu apoio, amor, paciência, carinho e compreensão, tornou tudo muito melhor.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Dorly de Freitas Buchi, obrigada por me orientar tanto pelos caminhos da ciência como da vida. Pelo grande carinho e amizade, enfim por ser tão especial.

À minha querida amiga, Carolina Camargo de Oliveira, por fazer parte deste trabalho, por sua ajuda e amizade durante todos os momentos, pela sua boa vontade, por cuidar de mim e do meu trabalho enquanto eu estive doente, por me ajudar nos experimentos, na informática, na vida... Enfim obrigada por sua grande amizade.

A Ana Paula R. Abud, Fernanda F. Simas, Mariana S. Araujo e Rodrigo V. Serrato, por tornarem todos os momentos do curso de biologia muito mais especiais e saudosos com a amizade de vocês, tanto dentro como fora da sala de aula.

À Mariana Piemonte Moretão, por ter me ajudado desde o início da minha iniciação, por ter me ensinado a coletar células, a fazer cultivo celular, por ter sanado muitas dúvidas. Obrigado pela sua boa vontade e principalmente pela sua amizade.

Ao pessoal do laboratório, obrigada por todos os bons momentos que passamos juntos. Desde os que já saíram: Ana Paula Azambuja, Fernando Mariano, Gilliat Telles, Lyris Godoy, Rodrigo Bagatelli e Sabrina Probst até os que continuam aqui: Carolina C. de Oliveira, Darcy Y. O. Sato, Fabiano R. Palauro, Raffaello P. Di Bernardi, Raquel Wal, Samuel Gehrke e Simone Oliveira. Obrigada pela paciência, ajuda e amizade de vocês.

À Ruth Janice Guse Schadeck, por ter me auxiliado no estabelecimento de protocolos e por esclarecer muitas dúvidas.

Ao Marco Antônio Ferreira Randi, por ter me iniciado na ciência e por estar sempre disposto a esclarecer alguma dúvida ou a me socorrer quando o computador está com problemas.

À Eliane Regina do Nascimento Mendes por toda sua ajuda, desde o preparo de reagentes, até a louça lavada e material autoclavado.

Ao Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho por ter disponibilizado seus equipamentos e reagentes, sempre que necessário.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica desta universidade, pelo uso de seus equipamentos, em especial à Dr.^a Daura Regina Eiras-Stofella, Matilde M. de oliveira, Vera Regina F. Pieonteke e Rosi Kugler por toda ajuda prestada.

Ao Francolino Cardoso e Beatriz Cezar, do Instituto de Tecnologia do Paraná, por nos ceder meio de cultura e outros reagentes sempre que necessário.

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

Ao Canova do Brasil Ltda., pela oportunidade de estudar essa medicação, por cedê-la e por todo apoio financeiro.

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

Aos camundongos, por cederem suas vidas à ciência.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistema Imune	1
1.2. Macrófagos	1
1.3. Mg ⁺⁺ ATPase.....	3
1.4. Fosfatase Ácida	4
1.5. Homeopatia.....	5
1.6. Método Canova®	7
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	11
4.2. Experimento <i>in vitro</i>	11
4.3. Grupos de tratamento	11
4.4. Marcação ultraestrutural citoquímicas da enzima Mg ⁺⁺ ATPase.....	12
4.5. Marcação ultraestrutural citoquímica da enzima Fosfatase Ácida (AcPase).....	12
4.6. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	13
5. RESULTADOS	14
5.1. Grupos Controle da Enzima	14
5.2. Atividade enzimática da Mg ⁺⁺ ATPase	15
5.3. Atividade enzimática da AcPase	17
6. DISCUSSÃO	18
7. CONCLUSÕES	20
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

RESUMO

Macrófagos são células do sistema imune, pertencentes ao Sistema Mononuclear Fagocítico, as quais apresentam uma série de funções relacionadas principalmente com a defesa do organismo. A enzima $Mg^{++}ATPase$ é uma enzima presente na membrana plasmática, responsável pelo transporte do íon Mg^{++} na célula. Este é utilizado como cofator em diversas vias metabólicas, como por exemplo a glicólise, neoglicogênese e síntese protéica. A fosfatase ácida é uma enzima marcadora de lisossomos. Estes desempenham a função de digerir material proveniente de fora da célula (heterofagia) e de substâncias próprias das células (autofagia), interferindo diretamente no processo de defesa do organismo. O Método Canova[®] é um medicamento homeopático indicado em diversas doenças com alterações no sistema imunológico. Experimentos prévios realizados demonstraram alterações morfológicas e bioquímicas em macrófagos peritoneais de camundongos e alveolares humanos, tratados com o Método Canova[®]. O objetivo deste trabalho é detectar possíveis alterações da enzima fosfatase ácida e da $Mg^{++}ATPase$ em macrófagos peritoneais de camundongos. Foram realizados experimentos *in vitro*, onde estas células foram plaqueadas e mantidas a 37°C e 5% CO_2 durante 48 horas. Estabeleceram-se grupos tratados com o medicamento e grupos controles: sem o medicamento e outros sem o substrato da enzima. Nos grupos tratados foi adicionado ao meio de cultura 10% de Método Canova[®] e após 24 horas mais 1%. As células foram então processadas segundo o protocolo rotineiro das respectivas enzimas. Após a incubação, as células foram processadas e observadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. Tanto na fosfatase ácida, assim como na $Mg^{++}ATPase$, o grupo tratado obteve uma marcação eletrondensa positiva mais intensa nos macrófagos peritoneais dos camundongos tratados com o Método Canova[®] que no grupo controle. Na $Mg^{++}ATPase$ a marcação foi observada principalmente na membrana plasmática. Na fosfatase ácida, a marcação foi observada principalmente na membrana dos lisossomos, vacúolos citoplasmáticos, envoltório nuclear e membrana plasmática. A diferença na intensidade de marcação entre os grupos, pode significar que reações metabólicas envolvendo estas enzimas ocorram em maior quantidade nos macrófagos tratados com o Método Canova[®].

Palavras-chave: Fosfatase Ácida; Homeopatia; Macrófagos; Método Canova; $Mg^{++}ATPase$.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Imune

Os seres vivos dispõem de defesas naturais e adquiridas através de um conjunto integrado de estruturas, células e elementos do sangue que permitem ao organismo reconhecer e responder a agentes agressores provenientes do meio ambiente. O sistema imune, portanto, divide-se em natural e específico, que diferem essencialmente quanto à especificidade e à memória (SEADI, 1998).

A imunidade natural, consiste em mecanismos de defesa que o organismo dispõe, antes mesmo de se expor à qualquer substância estranha (SEADI, 1998). É a primeira linha de defesa do nosso organismo, caracterizada em grande parte pela liberação de mediadores de macrófagos, neutrófilos, basófilos e mastócitos. Em contraposição, a imunidade específica tem suas respostas induzidas ou estimuladas pela exposição à substâncias estranhas, sendo que essas respostas são específicas a cada tipo de antígeno, ou seja, para cada antígeno tem-se uma resposta diferente (BALLOW & NELSON, 1997).

O sistema imune é composto por vários tipos celulares, entre eles estão os linfócitos, fagócitos e células acessórias. Os linfócitos são células que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos. No entanto, as fases de reconhecimento e ativação das respostas imunes específicas, dependem de células não linfóides, as células acessórias, que não são específicas para antígenos diferentes. Os fagócitos mononucleares, células dendríticas e outras populações celulares funcionam como células acessórias. O Sistema Mononuclear Fagocítico é a segunda maior população de células do sistema imune. É constituído de células que tem uma linhagem comum, originada da medula óssea e que, após a maturação e subsequente ativação, assumem formas morfológicas variadas, mas com uma função em comum, a defesa do organismo através da fagocitose (ABBAS *et al*, 2000).

1.2. Macrófagos

Uma das células do Sistema Mononuclear Fagocítico que penetra no sangue periférico depois de deixar a medula óssea, incompletamente diferenciado, é o

monócito. Estes se fixam nos tecidos, amadurecem e diferenciam-se em macrófagos (ABBAS *et al.*, 2000).

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

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

Os macrófagos apresentam uma série de funções relacionadas principalmente com a defesa do organismo. Estas funções estão envolvidas com um reconhecimento primário que ocorre ao nível de receptores da membrana plasmática destas células. Estes receptores de superfície são moléculas glicoprotéicas expressas na superfície celular, que permitem a comunicação dos macrófagos com o meio em que está localizado, recebendo informações para exercer suas funções ou para cessá-las (SILVA & QUELUZ, 1996).

Os receptores da membrana plasmática controlam as atividades dos macrófagos tais como: crescimento, diferenciação, ativação, migração, endocitose e secreção. Portanto, os receptores são importantes em processos fisiológicos e patológicos, incluindo a defesa do hospedeiro, inflamações e reparos. A versatilidade de respostas destas células à vários estímulos depende da sua habilidade em expressar um grande repertório de receptores (GORDON *et al.*, 1988).

Os macrófagos internalizam, processam, digerem e apresentam o antígeno aos linfócitos, que vão produzir moléculas que vão desencadear respostas em outras células. Por outro lado, os linfócitos também vão produzir mensagens que vão para os macrófagos, ativando-os, ou seja, potencializando sua ação (STITES & TERR, 1992). Macrófagos ativados têm sua atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica rapidamente aumentadas (ERWIG *et al.*, 1998). São um pouco maiores que os não ativados, há um aumento citoplasmático e são muito mais eficientes em

destruir bactérias e outros patógenos, além de secretar uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas que influenciam na atividade de outras células (STITES & TERR, 1992).

Os macrófagos respondem a estímulos externos provenientes de alguns microrganismos ou de linfócitos ativados, modificando algumas de suas propriedades, tais como: habilidade para aderir e espalhar-se em substratos, a taxa de endocitose e fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos (VENKATA-REDY & GANGADHARAN, 1992). Em resposta a estes estímulos, estas células sofrem uma ativação que lhes permite entre outras funções adquirir uma grande capacidade de matar microrganismos e algumas células tumorais. Isso pode ocorrer através de mecanismos oxigênio ou nitrogênio dependentes, nos quais intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e de nitrogênio (RNI) são produzidos. Os produtos de oxigênio produzidos pelos macrófagos incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (WOOD & AUSTYN, 1993). Para a proteção dos macrófagos contra esses produtos tóxicos, os ROIs são estocados em vesículas chamadas lisossomos, as quais podem ser colocadas em contato com vesículas contendo o material ingerido, os fagossomos (PLAYFAIR, 1995).

1.3. Mg^{++} ATPase

O citoplasma contém energia acumulada nos depósitos de moléculas de triacilglicerídeos (gorduras neutras), de moléculas de glicogênio e, também, sob a forma de compostos intermediários (metabólitos) ricos em energia, dos quais o principal é o ATP. Este é um composto instável, que não contém energia tão concentrada, mas facilmente utilizável porque a enzima que rompe a molécula de ATP (ATPase) é muito abundante na célula (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). Esses tipos de enzima (ATPases), vem sendo amplamente utilizadas como marcadoras de membrana plasmática (CARVALHO & SOUZA, 1989). As ATPases são responsáveis pelo rompimento da ligação química do grupo fosfato terminal do ATP, liberando energia e gerando ADP e fosfato inorgânico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Devido ao aumento metabólico, os macrófagos ativados necessitam de mais nutrientes e entre esses nutrientes encontram-se os íons. A entrada de íons na

célula é proporcionada por bombas iônicas presentes nas membranas. A Mg^{++} ATPase, enzima presente na membrana plasmática, permite a entrada do íon Mg^{++} na célula, utilizando a energia liberada pela hidrólise do ATP. Praticamente todas as enzimas glicolíticas requerem Mg^{++} para atividade. Este íon é ainda utilizado como cofator em diversas vias metabólicas, como por exemplo glicólise, neoglicogênese, fermentação alcoólica e síntese protéica (BUCHI & SOUZA,1992; LEHNINGER,1995; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

1.4. Fosfatase Ácida

A Fosfatase Ácida (AcPase) é uma das hidrolases contidas nos lisossomos, facilmente demonstrada citoquimicamente. Esta enzima libera fosfato inorgânico, um metabólito chave para o desenvolvimento celular, a partir de ésteres de fosfato (SCHADECK *et al.*, 2000). A AcPase tem sido amplamente utilizada em técnicas citoquímicas como enzima marcadora de vesículas do sistema lisossomal, podendo demonstrar a organização do processo de endocitose, entretanto é igualmente claro que ela também ocorre em outros sistemas membranosos das células e na fase solúvel (TEIXEIRA *et al.*, 2001; ALBERTS *et al.*,1997; OLEA,1991). Os lisossomos são sacos membranosos de enzimas hidrolíticas utilizadas na digestão intracelular controlada de macromoléculas, contém vários tipos de enzimas hidrolases ácidas responsáveis pela quebra de restos intra e extracelulares, destruição de microrganismos fagocitados e produção de nutrientes para a célula. Nos macrófagos os lisossomos desempenham a função de digerir material proveniente de fora da célula (heterofagia), e substâncias próprias das células (autofagia) (MEIRELLES,1983). A AcPase é classicamente considerada como um critério bioquímico para macrófagos ativados (KARNOVSKY & LAZDINS, 1978). Quando ativados, os macrófagos produzem ROIs e enzimas lisossomais, entre elas a fosfatase ácida (GREEN *et al.*,1994), exercendo desta forma, uma função digestiva, a qual intervém em numerosos processos biológicos, como a defesa e a nutrição dos organismos, regulação da função secretora ou involução de órgãos ou tecidos no curso do desenvolvimento (MEIRELLES,1983).

1.5. Homeopatia

A homeopatia, a ciência baseada na lei da semelhança, é um sistema de tratamento médico que foi fruto da inteligência de Samuel Christian Hahnemann (1755-1843), um médico alemão. O termo homeopatia deriva do grego e significa "sofrimento semelhante" ou curar semelhante pelo semelhante. *Pathos*, corresponde a sofrimento, e *Homoios* significa semelhante. (RUIZ, 1999).

Hahnemann desenvolveu esta abordagem no decorrer de um período de 50 anos. Era um pensador progressista, um crítico mordaz da medicina da sua época. Abandonou a prática da medicina várias vezes antes da descoberta da homeopatia, especificamente porque não considerava ético o uso de doses múltiplas e muitas vezes tóxicas dos medicamentos, na época o método normal de tratamento (JONAS & JACOBS, 1996). No ano de 1796, Samuel Hahnemann escreveu pela primeira vez para o público acerca do *princípio de similia*, ou como ele chamou, a *lei de similia*, o que seria a base do método homeopático. Ao mesmo tempo, ele introduziu o termo "homeopatia" para descrever a prática nele observada. Ele sugeriu basicamente, que uma droga atua de forma terapêutica quando produz em uma pessoa saudável, sintomas semelhantes aos de uma pessoa doente e que pessoas diferentes teriam diferentes graus de sensibilidades até aos mesmos medicamentos. Seu livro clássico, "*Organon de Medicina: A arte racional da cura*", foi publicado inicialmente em 1810 e foi revisado 6 vezes por ele, com última edição escrita em 1843, pouco antes de sua morte (CLOVER, 1993).

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

Embora sua intenção original tenha sido reduzir os efeitos tóxicos dos medicamentos, Hahnemann afirmou que o processo de dinamização ou seja, agitar as diluições enquanto eram feitas entre cada diluição, tornava os remédios mais ativos e específicos aos indivíduos sensíveis a eles. Portanto, a homeopatia é um método de tratamento suave, que utiliza substâncias especialmente preparadas e

altamente diluídas para colocar em ação os mecanismos de cura do próprio corpo e guiá-los para eliminar a doença. Esse tipo de tratamento, induz o próprio corpo e a mente a se curarem e parte do princípio de que todos os processos psicológicos, fisiológicos e celulares são interligados e estão envolvidos em uma doença (JONAS & JACOBS,1996).

Os tratamentos convencionais são rápidos, mas também afetam as partes saudáveis do corpo, muitas vezes produzindo efeitos colaterais indesejados. Como a homeopatia utiliza princípios ativos (substâncias) altamente diluídas, preparadas de acordo com um processo específico, produzem pouco ou nenhum efeito colateral. As substâncias utilizadas são derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, todas em quantidades ínfimas, utilizando um processo de preparação especial que compreende a diluição em etapas, com agitação entre elas (JONAS & JACOBS,1996).

Uma alegação fundamental da homeopatia desde seu início é ser útil na prevenção e no tratamento de problemas do sistema imunológico, como infecções e alergias (GRIMMER, 1948; BOWEN, 1981; TAYLOR-SMITH, 1950; SHEPHERD, 1967 *apud* JONAS & JACOBS,1996). Há muitos estudos laboratoriais sobre a influência das funções imunológicas com o uso de diluições agitadas em série e da homeopatia. Madeleine Bastide e outros têm relatado que as diluições agitadas em série de uma substância química, reguladora do sistema imunológico, chamada interferon e os hormônios timulina e bursina, podem aumentar a taxa de glóbulos brancos e outras funções imunológicas em animais (DAURAT,1986; BASTIDE,1985,1987 *apud* JONAS & JACOBS,1996). Existem ainda minerais que influenciam o sistema imunológico, como silício, zinco e cálcio, sendo que eles também apresentam efeito quando preparados em diluições muito baixas (HARISCH,1988,1989 *apud* JONAS & JACOBS,1996).

Inúmeros outros modelos laboratoriais usam preparados homeopáticos. Entre esses, alterações na função enzimática das células (HARISH, 1988,1989 *apud* JONAS & JACOBS,1996), aceleração da cicatrização (OBERBAUM,1992 *apud* JONAS & JACOBS,1996), redução na incidência e progressão do câncer em animais (SUKUL,1987,1988 *apud* JONAS & JACOBS,1996), alterações no limiar da

dor (KEYSELL,1984 *apud* JONAS & JACOBS,1996), efeitos comportamentais em animais (SUKUL,1987,1988 *apud* JONAS & JACOBS,1996), e muitas outras áreas.

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

Enfim, não é o medicamento em si que cura a doença, mas a reação dos mecanismos de cura do corpo, ao medicamento, que leva a melhora (JONAS & JACOBS,1996). Existem muitas ocasiões em que a homeopatia pode ser a principal terapia exigida para auxiliar a cura, mas em muitas outras situações ela pode constituir uma útil corda adicional no arco terapêutico convencional. Hoje em dia é cada vez mais do conhecimento geral que a maior parte das doenças resulta de diversos fatores. De onde se deduz que variadas linhas de terapia podem muito bem ser propícias na ajuda da cura (CLOVER,1993).

1.6. Método Canova®

O Método Canova® é um produto homeopático desenvolvido a partir de tinturas conhecidas na Farmacopéia Homeopática Mundial, derivados do *Aconitum napellus*, *Bryonia alba*, *Thuya occidentalis*, *Lachesis trigonocephalus* e *Arsenicum album*, diluídos em água destilada e álcool de neutro (0,01%) (CANOVA DO BRASIL, 2001).

Estudos com animais de experimentação mostraram que o produto obtido pelo Método Canova® é totalmente inócuo e não foi detectada dose letal média (DL50). Outros estudos em animais mostraram que este medicamento é eficaz no controle de infecções virais, bacterianas, parasitas e, inclusive no controle de tumores experimentais em camundongos. No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que o medicamento não atua diretamente contra bactérias, fungos, parasitas, células cancerosas mantidas em cultura. Isso indica que o produto atua no organismo como um todo, aumentando as defesas, evitando as infecções de diversos tipos e atuando através de um mecanismo imunomodulador (LAGUENS, 1995 *apud* CANOVA DO BRASIL, 2000).

Buchi deu início aos estudos laboratoriais com o Método Canova[®] em 1997, desde então vários experimentos foram desenvolvidos, *in vitro* e *in vivo*, com macrófagos peritoneais de camundongos a respeito deste medicamento. Esses ensaios demonstraram que o Método Canova[®] atua sobre macrófagos peritoneais de camundongo, promovendo sua ativação, diminuindo a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) e alterando a distribuição molecular dos filamentos de actina, integrinas α_5 e β_1 e receptores F_C , sugerindo alguns dos mecanismos através dos quais o medicamento possa agir e ressaltar seu potencial terapêutico (PIEMONTE & BUCHI, *in press*).

Em 2001, SASAKI realizou o primeiro estudo clínico randomizado duplo-cego para avaliar a eficácia do Método Canova[®] em pacientes portadores de HIV. Nesse estudo constatou a diminuição da carga viral, queda nas infecções oportunistas, e diminuição dos danos hepáticos causados pela medicação convencional., nos pacientes tratados com o Método Canova[®].

2. JUSTIFICATIVA

Desordens no sistema imunológico podem ser a causa de muitas enfermidades, desde doenças autoimunes, até síndromes de imunodepressão, como a AIDS. Em acréscimo a isso a responsividade do sistema imune determina de maneira decisiva o prognóstico do paciente e uma resposta imune inadequada ou insuficiente podem significar a perda da luta do organismo contra a doença. Pensando desta forma é que cada vez mais médicos e pesquisadores têm se interessado por medicamentos e terapias que atuem como moduladores da resposta imunológica, visando “regular” o organismo para responder de forma adequada a qualquer estímulo agressor, sem causar efeitos colaterais ao mesmo.

A maioria dos tratamentos médicos é efetivo no controle das doenças, porém muitas vezes produzem efeitos colaterais indesejados. A homeopatia é um método de tratamento que busca intensificar os mecanismos de cura do próprio organismo e que de maneira geral não apresenta toxicidade, fazendo com que esta especialidade médica seja cada vez mais utilizada. No entanto a homeopatia ainda carece de estudos científicos a respeito de seus mecanismos de ação. O Método Canova[®] é um medicamento homeopático que vem sendo utilizado com sucesso no tratamento de milhares de pacientes com câncer e AIDS, principalmente na Argentina e Brasil. Alguns desses pacientes utilizam apenas o Método Canova[®], enquanto outros fazem o uso dessa medicação em associação aos medicamentos alopáticos usuais recomendados à suas respectivas doenças. Em ambos os casos os pacientes apresentam melhora nos sintomas e principalmente na qualidade de suas vidas, além disso o Método Canova[®] atua amenizando os efeitos colaterais dos demais medicamentos quando estes são utilizados em conjunto.

Este trabalho objetiva aumentar o conhecimento dos mecanismos celulares de ação deste medicamento. Tendo em vista que esse medicamento, que tem demonstrado ser eficaz clinicamente, ainda carece de estudos à nível celular e molecular.

3. OBJETIVOS

- Dar continuidade aos experimentos já realizados com o Método Canova[®], a fim de obter um maior número de informações que contribuam para o esclarecimento de suas propriedades.

- Avaliar possíveis alterações ultraestruturais nos macrófagos tratados com o Método Canova[®] com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Transmissão;

- Detectar a atividade da enzima Fosfatase Ácida *in vitro*, utilizando técnicas de citoquímica ultraestrutural, em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com o Método Canova[®].

- Detectar a atividade da enzima Mg⁺⁺ ATPase *in vitro*, utilizando técnicas de citoquímica ultraestrutural, em macrófagos peritoneais de camundongos tratados como Método Canova[®].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais, foi feita a coleta do lavado intraperitoneal de 12 camundongos (*Mus musculus*) suíços, albinos, machos, de aproximadamente 3 meses de idade, com peso entre 30 e 40g.

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

4.2. Experimento *in vitro*

As células do lavado intraperitoneal foram cultivadas em 12 garrafas de cultivo estéreis, cada uma com 5mL de lavado e aproximadamente 4×10^6 células, mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, durante 15 minutos para a adesão dos macrófagos nas paredes da garrafa. Após este tempo, as células não aderentes foram descartadas e adicionou-se meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibiótico (penicilina 1 U/mL, estreptomicina 1 µg/mL, e anfotericina 2,5µg/L).

4.3. Grupos de tratamento

Para ambos os experimentos, as 12 garrafas de cultura foram divididas em 3 diferentes grupos de células: 1) Grupo Tratado: onde se adiciona ao meio de cultura o composto medicamentoso Método Canova[®], em concentração de 10% em relação ao meio, repetindo-se a aplicação, desta vez na concentração de 1% passadas as primeiras 24 horas de cultivo; 2) Grupo Controle: é cultivado somente com o meio de cultura; 3) Grupo Controle da Enzima: é estabelecido durante o processamento enzimático. Neste grupo não é adicionado o substrato da enzima, para que se possa garantir a especificidade da marcação. Para cada grupo são utilizadas 4 garrafinhas

de cultura, sendo estas mantidas sob as mesmas condições, (37°C, 5% CO₂), durante 48 horas.

4.4. Marcação ultraestrutural citoquímicas da enzima Mg⁺⁺ ATPase

Após o cultivo, as células são lavadas com tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2) e pré-fixadas em glutaraldeído 1% (próprio para enzimas) em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2), durante 10 minutos à 4°C. São novamente lavadas em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2) e em tampão Tris-maleato (0,1M - pH 7,2), ambos contendo 5% de sacarose.

A incubação é feita em estufa à 37°C, com 5% de CO₂, durante 1 hora, em meio adequado à atividade da enzima, sempre respeitando-se os grupos de tratamento. O meio de incubação contém o substrato da enzima (ATP), o cofator (Sulfato de Magnésio) e o acceptor (Cloroeto de Cério), necessários para a atividade da enzima Mg⁺⁺ ATPase. As células são novamente lavadas com tampão Tris-maleato e com tampão Cacodilato de Sódio e então fixadas segundo Robinson e Karnovsky, 1983 (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5mM). Posteriormente, as células são processadas para microscopia eletrônica de transmissão.

4.5. Marcação ultraestrutural citoquímica da enzima Fosfatase Ácida (AcPase)

Após o cultivo celular as células são lavadas e levemente fixadas com glutaraldeído 1% em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2) durante 10 minutos à 4°C. Em seguida são lavadas em tampão Cacodilato de Sódio (0,1M - pH 7,2) e em tampão Tris-maleato (0,1M - pH 7,2), ambos com 5% de sacarose.

As células são então incubadas à 37° C por 1 hora em meio adequado à atividade da enzima AcPase, sempre respeitando-se os grupos de tratamento. Este meio contém o substrato da enzima (β-Glicerofosfato) e o acceptor para o produto final da enzima (Cloroeto de Cério). Após a incubação, as células são lavadas novamente com tampão Tris-maleato e com tampão Cacodilato de Sódio. São então fixadas segundo Robinson e Karnovsky, 1983 (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5mM). Posteriormente, as células são processadas para microscopia eletrônica de transmissão.

4.6. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células são raspadas das garrafas de cultivo, coletadas e centrifugadas, sempre respeitando os grupos de células sem misturá-los. Faz-se então a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 2 mM, desidratação em acetona, infiltração em mistura de epon:acetona em série decrescente e a emblocagem é feita em epon. Após a polimerização em estufa à 60°C, os blocos são cortados em ultramicrótomo e observados sem contrastação, de forma aleatória duplo-cego, no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. São observados cortes de células pescados em gradinhas de cobre de 300 mesh. Estes são obtidos através de cortes aleatórios, em intervalos de 0,5 μ das 16x10⁶ células de cada grupo experimental. Cada grupo foi feito em duplicata, totalizando portanto 32x10⁶ células por grupo.

5. RESULTADOS

5.1. Grupos Controle da Enzima

Não foi observada marcação eletrodensa positiva para este grupo de células, em nenhum dos ensaios citoquímicos (Figuras 1 e 2).

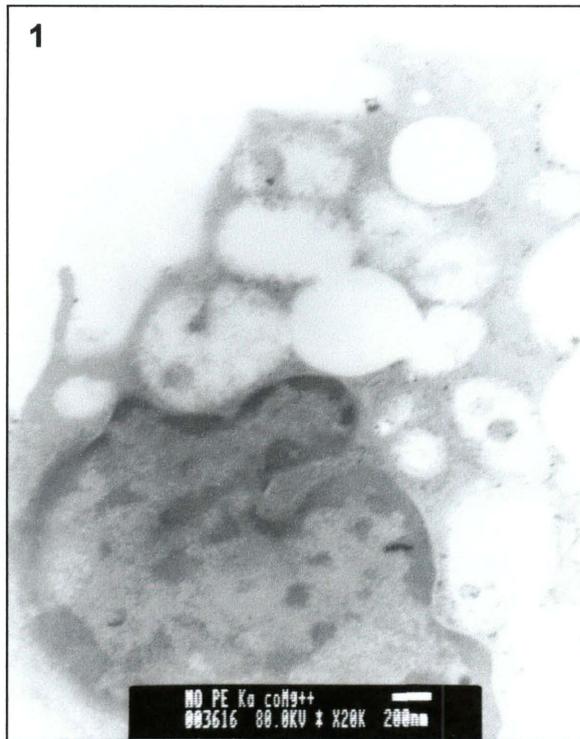
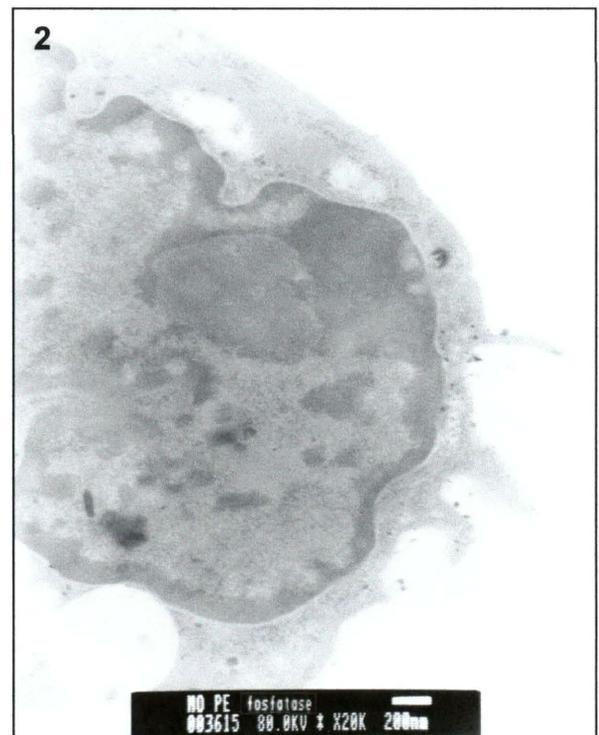


Figura 1: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Macrófago do grupo controle da enzima, sem marcação eletrodensa para a enzima $Mg^{++}ATPase$. Aumento 20.000 x; Barra 200 ηm .

Figura 2: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Macrófago do grupo controle da enzima, onde podemos notar ausência de reação eletrodensa para a enzima $AcPase$. Aumento 20.000 x; Barra 200 ηm .



5.2. Atividade enzimática da Mg^{++} ATPase

Foi observada marcação eletrondensa positiva para a enzima Mg^{++} ATPase tanto no grupo tratado quanto no grupo controle.

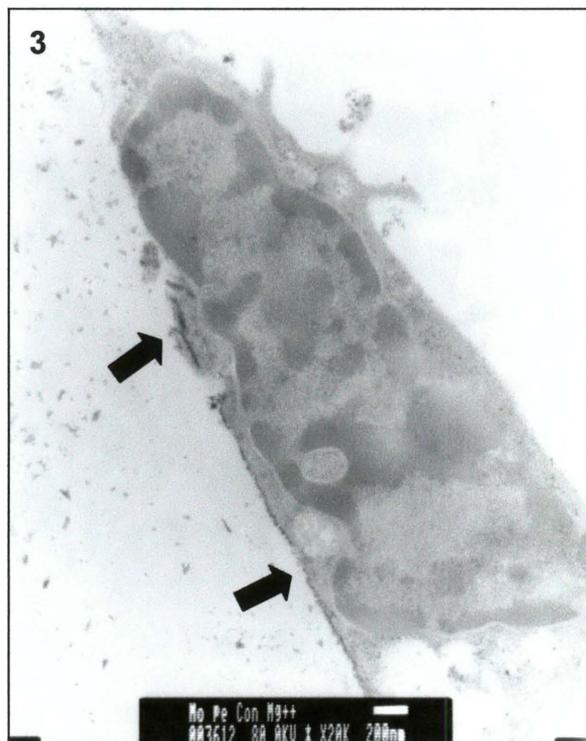


Figura 3: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Macrófago do grupo controle do tratamento, com poucas vesículas. Seta \blacksquare : marcação eletrondensa fraca, mostrando reação positiva para a enzima Mg^{++} ATPase. Aumento 20.000x; Barra 200 η m.

Figura 4: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Macrófago do grupo controle do tratamento, com poucas vesículas. Seta \blacksquare : marcação eletrondensa esparsa e irregular para a atividade enzima Mg^{++} ATPase. Aumento 20.000x; Barra 200 η m.



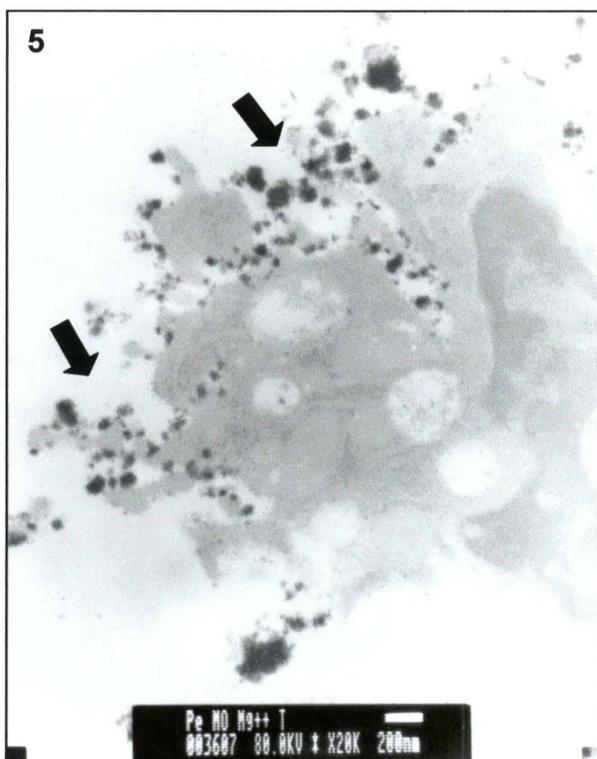
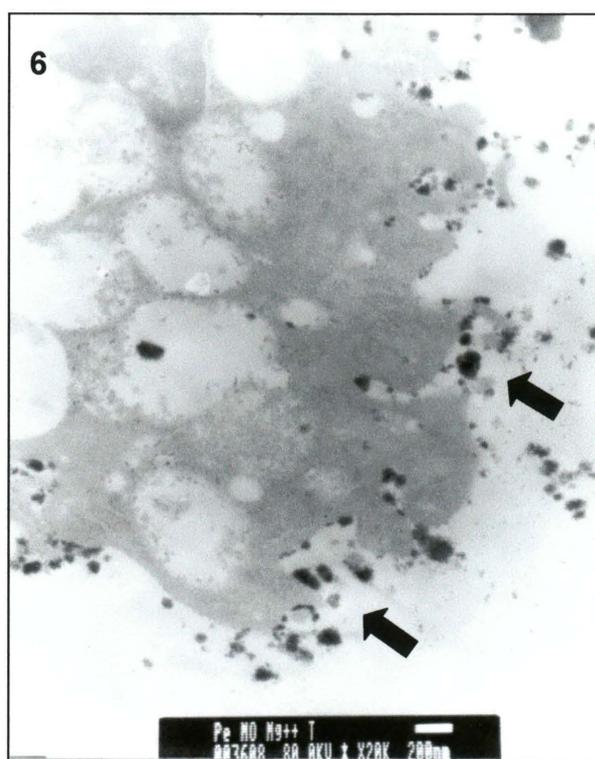


Figura 5: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Célula do grupo tratado, com aspecto de célula ativada, mostrando muitas vesículas citoplasmáticas. Seta **➡** : intensa marcação eletrondensa positiva para a enzima $Mg^{++}ATPase$. Aumento 20.000x; Barra 200 ηm .

Figura 6: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Macrófago do grupo tratado, com morfologia de célula ativada, apresentando muitas vesículas citoplasmáticas. Seta **➡**: intensa marcação eletrondensa para a enzima $Mg^{++}ATPase$. Aumento 20.000x; Barra 200 ηm .



5.3. Atividade enzimática da AcPase

Foi observada marcação eletrondensa positiva para a enzima AcPase tanto no grupo tratado quanto no grupo controle.

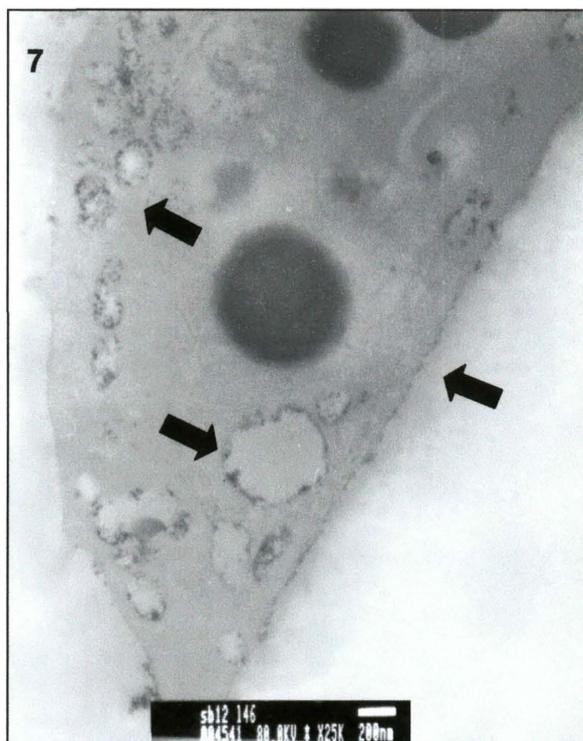
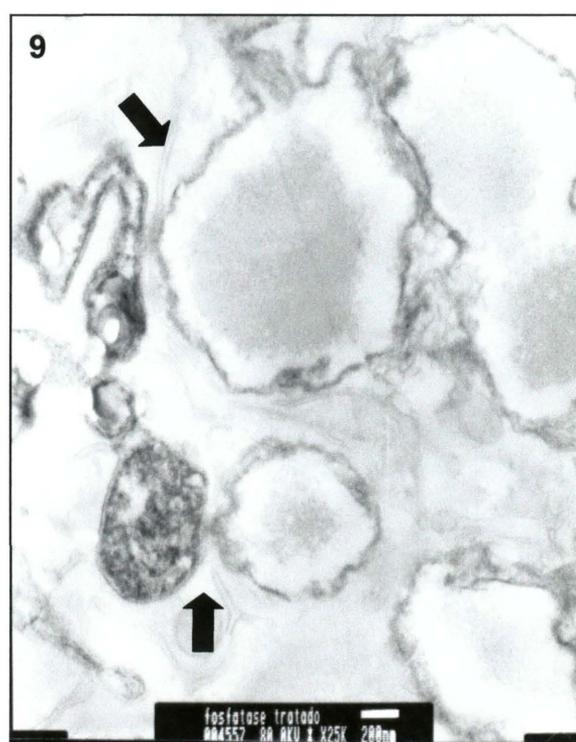
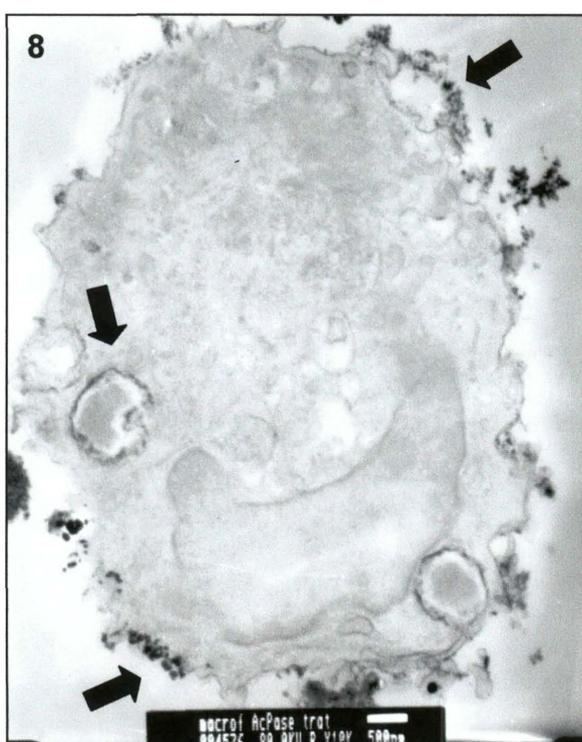


Figura 7: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Macrófago do grupo controle do tratamento. Seta  : marcação eletrondensa fraca, mostrando reação positiva para a enzima AcPase. Aumento 25.000x; Barra 200 η m.

Figuras 8 e 9: Eletromicrografia de macrófago peritoneal de camundongo. Macrófagos do grupo tratado. Seta  : intensa marcação eletrondensa positiva para a enzima AcPase. Fig. 8: Aumento 10.000x; Barra 500 η m. Fig. 9: Aumento 25.000x; Barra 200 η m.



6. DISCUSSÃO

A observação, aleatória duplo cego, dos cortes permitiu a identificação dos diversos grupos experimentais. Os grupos controle da enzima, tanto na detecção da Mg^{++} ATPase como na detecção da AcPase, que não receberam o substrato da enzima, não apresentaram reação positiva eletrondensa, demonstrando a especificidade do experimento.

PIEMONTE em 1999, observou uma ativação entre 72 e 86% de macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vivo* e *in vitro* com o Método Canova[®], quando comparados com o grupo controle com 15-33% de células ativadas. No grupo controle, tanto da enzima Mg^{++} ATPase como da enzima AcPase, observou-se uma similaridade na quantidade de macrófagos considerados morfologicamente ativados e residentes observados por Piemonte. Pode-se observar que 70-80% das células tinham morfologia de macrófagos residentes, com as organelas referenciais presentes, núcleo grande e claro e poucas vesículas citoplasmáticas. Nos grupos tratados de ambas enzimas, a semelhança com os dados de Piemonte se repetiu. A ultraestrutura dessas células revelou que 70-80% dos macrófagos apresentavam morfologia de células ativadas, isto é macrófagos maiores, com núcleo maior, rico em eucromatina, citoplasma abundante e rico em vesículas.

A Mg^{++} ATPase é uma enzima que permite a entrada do íon Mg^{++} na célula e é considerada marcadora de membrana plasmática (CARVALHO & SOUZA, 1989). Esta enzima foi detectada no grupo controle, que não entrou em contato com o medicamento homeopático Método Canova[®], com reação eletrondensa positiva mais fraca na membrana plasmática, se comparado ao grupo tratado. Este apresentou forte marcação eletrondensa indicando reação positiva da enzima Mg^{++} ATPase, sugerindo a possibilidade de que enzimas que necessitam do íon Mg^{++} como cofator estejam em maior atividade.

Observou-se marcação eletrondensa positiva para a AcPase nos macrófagos, peritoneais dos camundongos, tratados com o Método Canova[®]. Esta marcação demonstrou-se mais intensa no grupo tratado se comparada com o grupo controle, que não recebeu a medicação. Pôde-se observar a marcação principalmente na membrana dos vacúolos citoplasmáticos e na membrana plasmática. A AcPase é

classicamente considerada como um critério bioquímico para macrófagos ativados (KARNOVSKY & LAZDINS, 1978; GREEN, 1994). A diferença observada na intensidade da marcação existente entre os grupos pode significar, que reações metabólicas envolvendo a fosfatase ácida ocorram em maior quantidade nos macrófagos tratados com o Método Canova[®], demonstrando uma maior ativação dos macrófagos, favorecendo a defesa do organismo, pela otimização dos processos de digestão intracelular.

7. CONCLUSÕES

O medicamento homeopático Método Canova[®] altera tanto a ultraestrutura dos macrófagos peritoneais de camundongos como também, a taxa de atividade das enzimas Mg^{++} ATPase e AcPase.

Tanto a enzima Mg^{++} ATPase, responsável pelo transporte do íon Mg^{++} , como a enzima AcPase, responsável pela hidrólise de grupamentos fosfato, encontram-se mais ativas nos macrófagos tratados com o medicamento homeopático Método Canova[®], indicando aumento do metabolismo celular com esse tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 3^a ed., Revinter, Rio de Janeiro, 2000.
2. ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**, 3^aed., Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.
3. BALLOW, M.; NELSON, R. Immunopharmacology – Immunomodulation and Immunotherapy. **JAMA**, Chicago, v.278, n.22, p. 2008-2017, 1997.
4. BERNAL, G.G. Homoeopathy and physics: a brief history. **British Homoeopathic Journal**, 82, p.210-216, 1993.
5. BUCHI, D.F; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.24, n.1, p.135-141,1992.
6. CANOVA DO BRASIL, **Informações científicas**. Curitiba, 2000.
7. CANOVA DO BRASIL, **Monografia: Método Canova®**. Curitiba,2001.
8. CARVALHO, L.; DE SOUZA, W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachizoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. **Journal of Protozoology**, v.36, n.2, 1989
9. CLOVER, A. **Homeopatia**, 1^a ed., Estampa, Lisboa, 1993.
10. ERWIG, L. P. et al. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **Journal Immunology**, Baltimore, v.161, n.4, p.1983-8, 1998.
11. GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Color Textbook of Histology**, Philadelphia, p. 58-69, 1997.
12. GORDON, S. et al. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **Journal Cell Science**, suppl. 9, p. 1-26, 1988.

13. GREEN, S.J.; ANIAGOLU, J.; RANEY, S.J. Oxidative metabolism in murine macrophages. **Current Protocols in Immunology**, Supl. 12, New York, 1994.
14. JONAS, W.B.; JACOBS, J. **A cura através da homeopatia**, Rio de Janeiro, p. 13-19, 21-28, 61-78, 1996.
15. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**, Rio de Janeiro, p. 26-28, 64-68, 2000.
16. KARNOVSKY, M.L.; LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. **The Journal of Immunology**, v.121, n.3, p.809-813, 1978.
17. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; MICHAEL, M.M. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo, p.147-148, 278, 300-301, 309, 446-447, 644-645, 679, 1995.
18. MEIRELLES, M.N.S.L.. **Alguns aspectos da interação *Trypanosoma cruzi* – Macrófago**, Rio de Janeiro, 1983. Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
19. OLEA, M.T. An structural localization of lysosomal acid phosphatase activity in aging mouse spleen: a quantitative x-ray microanalytical study. **Acta Histochem. Cytochem.**, v.24, n.2, p.201-208, 1991.
20. PIEMONTE, M.R. **Alterações Estruturais em Macrófagos Peritoneais de Camundongos Tratados com o Método Canova**, Curitiba, 1999. Tese de mestrado - Universidade Federal do Paraná.
21. PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, IFN- γ and TNF- α production, $\alpha_5\beta_1$ integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **J. Submicrosc. Cytol. and Pathol.**, *in press*, 2002.
22. PLAYFAIR, J. **Infection and Immunity**. Oxford University Press Inc., New York, 1995.
23. ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5^a ed., Manole, São Paulo, 1999.

24. ROBINSON, J.M.; KARNOVSKY, M.J. Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. V.31, n.10, p.1197-1208, 1983.
25. RUIZ, R. **A montagem da teoria da dinamização dos medicamentos homeopáticos de Samuel Hahnemann**, São Paulo, 1999. Tese de doutorado - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.
26. SAMPAIO, S.C. **Influências do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a funcionalidade e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos**, São Paulo, 2000. Tese de mestrado - Universidade de São Paulo.
27. SASAKI, M.G.M. et al. Estudo clínico randomizado placebo controlado para avaliar a eficácia e segurança do Método Canova[®] na terapêutica de pacientes portadores de HIV/Aids em uso de anti-retrovirais. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, Supl.1, 2001.
28. SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D.F.; LEITE, B.; Ultrastructural aspects of *Colletotrichum graminicola* conidium germination, appressorium formation and penetration on cellophane membranes: focus on lipid reserves. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 30, n.4, p.555-561, 1998.
29. SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D.F.; LEITE, B.; Acid Phosphatase activity in ungerminated conidia from *Colletotrichum graminicola* as determined by spectrophotometric and cytochemical methods. **Bras. J. morphol. Sci.**, v.17, p.81-85, 2000.
30. SEADI, C. **Princípios Básicos de Imunologia**, 1^a ed., Ulbra, Canoas, 1998.
31. SILVA, M.H.C.; QUELUZ, T.H.A.T. Macrófagos pulmonares. **Journal Pneumology**, v. 22, n. 1, p. 45-8, 1996.
32. STITES, D.P.; TERR, A.I. **Imunologia**, Prentice/Hall do Brasil, Rio de Janeiro, 1992.
33. TEIXEIRA, C.F. et al. Cytochemical study of *Streptococcus agalactiae* and macrophage interaction. **Microscopy Research and Technique**, v.54, p.254-259, 2001.

34. VENKATA-REDDY, M. & GANGADHARAM, P.R.J. Heat shock treatment of macrophages causes increased released superoxide anion. **Infect. Immunol.**, v.60, p.2386-2390, 1992.
35. WOOD, K.J., AUSTYN, J.M. **Principles of cellular and molecular immunology.** Oxford University Press Inc, New York, 1993.