

LYRIS MARTINS FRANCO DE GODOY

**EFEITOS DO MEDICAMENTO MÉTODO CANOVA[®]
SOBRE ASPECTOS FUNCIONAIS DE MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

2002

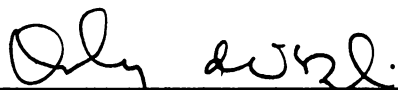
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

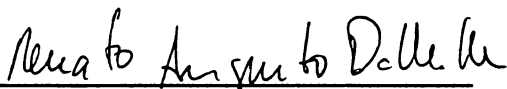
PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "**EFEITO DO MEDICAMENTO MÉTODO CANOVA SOBRE A FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS**", de autoria da Pós-Graduanda Lyris Martins Franco de Godoy, e composta pelos Professores: Dra. Dorly de Freitas Buchi; (como Orientadora e Presidente); Dr. Renato DaMatta (UENF) e Dra. Márcia Helena Mendonça (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dra. Dorly de Freitas Buchi, nota 10 (DEZ); Dr. Renato DaMatta, nota 10 (DEZ) e Dra. Márcia Helena Mendonça, nota 10 (DEZ). De acordo com o Regimento interno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: APROVADA com a nota 10 (DEZ), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas.

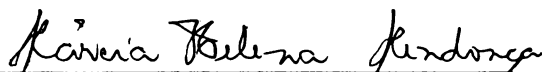
Em Curitiba, 28 de fevereiro de 2002.



Dra. Dorly de Freitas Buchi



Dr. Renato DaMatta



Dra. Márcia Helena Mendonça

Aos meus pais, por me permitirem ter a melhor infância que eu poderia
imaginar e por sempre terem dado importância
para os meus sonhos...

A minha mãe, Rosely, por seu apoio e estímulo incondicionais
e por me “arrancar “ da cama todos os dias para ir
trabalhar, especialmente nos
fins de semana...

Ao meu pai, Lauro, por todas as “mensagens e
dicas” e por me manter acordada com suas
histórias durante as madrugadas em
que eu precisava trabalhar...

Ao meu irmão, Loam, por todas as
“discussões científicas”, brincadeiras
e por me fazer ter a sensação de
que o que eu faço é
importante...

Aos meus avós, Oriente, Neusa, Saturnino e Ely, minha bisavó
e meus tios por todo apoio e carinho durante todo
o meu caminho até aqui...

Especialmente, a minha tia Telma pelas caronas e
lanchinhos...e a minha tia Ista, por todo apoio
técnico durante a confecção desse e
de outros trabalhos, por ser a
minha “mão do gato”...

Aos meus primos, Aninha, Cacá e
Marcelinho, por me fazerem
rir e tornarem minha
vida divertida...

Ao meu "love", Gustavo, por alegrar minha vida com sua presença...

por estar ao meu lado, mesmo longe, me ajudando

a ter calma nos momentos difíceis...

e por compartilhar comigo seus

sonhos e objetivos...

Aos meus amigos-irmãos, Scama, Déia e Deda, por me
mostrarem o que é a verdadeira amizade...

por estarem sempre presentes nos
momentos bons e ruins...

por todas as viagens, filmes, conversas, brincadeiras,
risadas, “tequiladas” e até pelas broncas,

durante todos... bem... deixe-me ver...

todos esses ***muitos*** anos !!!

(vamos nos poupar desses detalhes, né?)

Aos grandes amigos que estiveram presentes
em algum momento durante minha vida
e meu caminho até aqui...

vocês sabem quem são e que eu
adoro todos vocês...

Agradecimentos

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Dorly de Freitas Buchi, por todas as oportunidades, por respeitar minhas escolhas e me permitir desenvolver esse trabalho, dividindo comigo, muitas vezes, as angústias e agora a alegria de ter atingido meus objetivos.

As minhas colegas de mestrado e grandes amigas Raquel e Darcy, pela amizade e apoio... sem vocês eu não teria conseguido !!!

Aos meus companheiros de laboratório, Caro, Lu, Sabrina, Fernando, Raffa, Samuel (meu fiel mancebo!!!), Fabiano e Simone, por todas as conversas, brincadeiras e “gracinhas”, por tornarem os dias de trabalho divertidos... e especialmente à Mari, por toda a ajuda.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Helena Mendonça, pela sabedoria, ensinamentos e convivência durante todo esse período.

À Prof.^a Maria Helena Guerreiro, pela ajuda nos experimentos e por todo estímulo, carinho e reconhecimento do meu trabalho.

Ao Prof. Marco Antônio Randi, por ter sido o melhor professor que eu já tive, por me iniciar no mundo da Ciência e por me ajudar todas as vezes em que precisei durante todos esses anos.

À Prof.^a (e quase doutora !!!) Célia Regina C. Franco, por responder minhas dúvidas, ajudar em meus experimentos, alegrar o departamento com suas risadas e principalmente, por ser meu exemplo desde a época da graduação.

Ao Prof. Dr. Sílvio Sanches Veiga, por sanar muitas vezes minhas dúvidas e permitir o uso de seu laboratório, reagentes e equipamentos. Aos demais integrantes do LME, por toda a ajuda.

À Prof.^a Dr.^a Maria Benigna, por todos os protocolos, dicas e por permitir o uso de seus equipamentos sempre que necessário. À Guilhermina, por toda atenção.

Ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), especialmente Dr. Samuel Goldemberg, Dr. Stênio Fragoso, Viviane e Andréia, por possibilitarem o uso do *T. cruzi*.

À Prof.^a Dr.^a Vanette Thomaz-Soccol por ter permitido o uso da *L. amazonensis*, e especialmente à Edilene e Regiane, por prepararem os parasitas e sanarem minhas dúvidas.

Ao Prof. Juarez Gabardo, pela orientação na realização das análises estatísticas, por todo o auxílio e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Renato DaMatta, pela infinita ajuda, atenção e paciência, fundamentais para a conclusão desse trabalho.

À Marlene e Gerisalda, por resolverem todos os meus problemas “burocráticos” durante esses dois anos.

Ao Cândido, por me “socorrer” sempre que necessário e por todas as brincadeiras, que tornaram mais fáceis e suportáveis os momentos de trabalho com os animais. À D.^a Tereza, Ezequiel, Julio e demais funcionários do biotério, especialmente ao Luís, por todo o apoio.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o período de realização do mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xiii
LISTA DE PROTOCOLOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MACRÓFAGOS	1
1.1.1 Características Gerais	1
1.1.2 Recrutamento e Ativação Celular	3
1.1.3 Participação na Resposta Imune e Inflamatória	4
1.2 HOMEOPATIA E MÉTODO CANOVA®	11
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 ANIMAIS	15
4.2 TRATAMENTO COM O MÉTODO CANOVA®	15
4.2.1 Tratamento <i>in vivo</i>	15
4.2.2 Tratamento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	15
4.3 COLETA DAS CÉLULAS PERITONEAIS	16
4.4 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS PERITONEAIS	16
4.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	17
4.6 SELEÇÃO DOS MACRÓFAGOS	17
4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR DOS MACRÓFAGOS	18
4.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADESÃO E ESPRAIAMENTO	18
4.8.1 Determinação da Taxa de Adesão	19
4.8.2 Determinação da Porcentagem de Espreadimento	19
4.9 MICRORGANISMOS	21
4.9.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
4.9.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
4.9.3 <i>Leishmania amazonensis</i>	22
4.10 INTERAÇÃO MICRORGANISMOS-MACRÓFAGOS	23
4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENDOCÍTICA	23
4.12 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	26
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28

4.14 REAGENTES	29
4.15 EQUIPAMENTOS	30
5 RESULTADOS	31
5.1 MOBILIZAÇÃO CELULAR	31
5.2 VIABILIDADE CELULAR	31
5.3 CAPACIDADE DE ADESÃO	33
5.4 CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO	36
5.5 ATIVIDADE ENDOCÍTICA	41
5.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	48
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC – célula apresentadora de antígenos

BCG – bacilo Calmett-Guérin

BSA – soro albumina bovina

CSU-GM – unidade formadora de colônia de granulócitos e monócitos

CO₂ – dióxido de carbono

dH₂O – água destilada

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – ácido desoxiribonucléico

D.O. – densidade óptica

DP – desvio padrão

EHS – tumor Englebreth-Holm-Swarm

EPI - epimastigota

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IL-1 – interleucina 1

IL-2 – interleucina 2

IFN- γ - interferon gama

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

LIT – liver infusion tryptose

LPS - lipopolissacarídeo

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NANA – ácido N-acetilneuramínico

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

O_2^- - ânion superóxido

OH^\cdot - radical hidroxila

PBS – tampão fosfato salina

PMA – acetato de forbol miristato

SFB – soro fetal bovino

SNC – sistema nervoso central

TAU – triatomine artificial urine

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TRIPO - tripomastigota

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 01	- ATIVIDADE ENDOCÍTICA APÓS INTERAÇÃO COM MICRORGANISMOS INFECTIVOS E NÃO INFECTIVOS	41
FIGURA 01	- PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA - MECANISMOS DE AÇÃO	5
FIGURA 02	- PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA UNIÃO ENTRE OS SISTEMAS IMUNE INATO E ADAPTATIVO	7
FIGURA 03	- EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A MOBILIZAÇÃO CELULAR	32
FIGURA 04	- EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A CAPACIDADE DE ADESÃO	34
FIGURA 05	- CAPACIDADE DE ADESÃO: PLÁSTICO X MATRIGEL	35
FIGURA 06	- EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO	37
FIGURA 07	- MACRÓFAGOS CULTIVADOS SOBRE PLÁSTICO	38
FIGURA 08	- MACRÓFAGOS CULTIVADOS SOBRE MATRIGEL	39
FIGURA 09	- CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO: PLÁSTICO X MATRIGEL	40
FIGURA 10	- EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A ATIVIDADE ENDOCÍTICA PARA FORMAS NÃO INFECTIVAS	42
FIGURA 11	- FAGOCITOSE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	43
FIGURA 12	- FAGOCITOSE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EPIMASTIGOTA	44
FIGURA 13	- EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A ATIVIDADE ENDOCÍTICA PARA FORMAS INFECTIVAS	45
FIGURA 14	- FAGOCITOSE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> TRIPOMASTIGOTA	46
FIGURA 15	- FAGOCITOSE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i> PROMASTIGOTA	47
FIGURA 16	- EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	49
FIGURA 17	- MACRÓFAGOS CULTIVADOS SOB CONDIÇÕES IDEAIS	50
FIGURA 18	- INTERAÇÃO MACRÓFAGOS X <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EPIMASTIGOTA	51
FIGURA 19	- INTERAÇÃO MACRÓFAGOS X <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> TRIPOMASTIGOTA	52
FIGURA 20	- INTERAÇÃO MACRÓFAGOS X <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i> PROMASTIGOTA	53

LISTA DE PROTOCOLOS

PROTOCOLO 01	- ENSAIO DE ADESÃO CELULAR	20
PROTOCOLO 02	- COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE GIEMSA	25
PROTOCOLO 03	- DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO	27

RESUMO

O medicamento homeopático Método Canova® é um imunomodulador, que não apresenta toxicidade ou efeitos colaterais aparentes, indicado em diversas patologias nas quais o sistema imune se encontra comprometido. Estudos recentes mostraram que este medicamento atua sobre macrófagos, provocando alterações em sua morfologia, distribuição de receptores e secreção de citocinas, sugerindo um processo de ativação dessas células. Esse estudo foi projetado para avaliar o efeito de Método Canova® sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais de camundongo, a partir da análise dos seguintes parâmetros: viabilidade e mobilização celular, adesão e espraiamento, atividade endocítica e produção de óxido nítrico. Os dados obtidos mostraram que o tratamento com o Método Canova® não altera a viabilidade celular, as capacidades de mobilização e adesão dos macrófagos ou o índice endocítico das formas infectivas dos microrganismos. Em contrapartida, o tratamento com esse medicamento estimula a capacidade de espraiamento, fagocitose de microrganismos não infectivos e produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Tais resultados demonstraram que o Método Canova® não apresenta efeitos tóxicos sobre os macrófagos, além de promover um processo estimulatório dos mesmos.

ABSTRACT

The homeopathic medicine Método Canova® is an immune modulator, which does not present collateral effects nor toxicity, used in several pathologies where the immune system is disturbed. Recent experiments showed that this medicine acts on macrophages, changing their morphology, receptors distribution and cytokines secretion, suggesting an activation process of these cells. This study was designed to evaluate the effect of Método Canova® on functionality of mouse peritoneal macrophages, through the following parameters: cellular viability and mobilization, adhesion and spreading, endocytic activity and nitric oxide production. The data obtained showed that treatment with Método Canova® doesn't affect cellular viability, mobilization and adhesion capacities nor endocytic index of infective microorganisms by macrophages. In other hand, this medicine stimulates the spreading capacity, ingestion of non-infective microorganisms and nitric oxide production by these cells. These results showed that Método Canova® doesn't present toxic effects against macrophages and promote its stimulation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MACRÓFAGOS

1.1.1 Características Gerais

Ontogeneticamente, os macrófagos são originários de células precursoras do saco vitelínico, migrando para o fígado, baço e medula óssea antes e logo após o nascimento. Já nos indivíduos adultos, os macrófagos têm origem em uma célula pluripotente mielóide, presente na medula óssea, a partir da qual são originadas diferentes células progenitoras, entre elas as “unidades formadoras de colônia de granulócitos e monócitos” (CFU-GM). As CFU-GM dão origem aos pró-monócitos, que já apresentam capacidade de pinocitose e expressam uma série de receptores característicos de macrófagos. Os pró-monócitos, por sua vez, dão origem aos monócitos, que saem da medula óssea e ganham a circulação sanguínea. Os monócitos permanecem na circulação por cerca de 1 a 3 dias, período após o qual migram para os diversos tecidos, onde se diferenciam e formam uma população residente de macrófagos, com tempo de vida variando entre 2 e 4 meses (NELSON e JOW, 1990; NEVEU, 1986).

Os macrófagos estão amplamente distribuídos no organismo, sendo encontrados em órgãos linfóides e não linfóides. Dependendo de sua localização, células da linhagem macrofágica podem receber denominações específicas, como por exemplo células de Kupffer (fígado), osteoclastos (ossos) ou micróglia (SNC). Os macrófagos teciduais apresentam-se em um estágio terminal de diferenciação, sendo incapazes de reiniciar a replicação de DNA e, conseqüentemente, de se multiplicar. Entretanto, algumas exceções foram observadas para microambientes específicos, tais como o pulmão, a glândula pituitária e sítios de injúria tecidual ou inflamatórios (GORDON, 1999).

Os macrófagos foram primeiramente descritos por METCHNIKOFF (1905), no início do século XX. Morfologicamente, caracterizam-se por serem células relativamente grandes, medindo entre 25-50µm de diâmetro, com núcleo irregular e excentricamente posicionado, um ou mais nucléolos e cromatina pouco condensada. Sua superfície celular é bastante irregular, sendo dotada de inúmeras projeções citoplasmáticas. Apresentam Complexo de Golgi abundante, grande número de lisossomos e mitocôndrias e um citoesqueleto bem desenvolvido, rodeando o núcleo da célula e estendendo-se até a periferia da mesma (AUGER e ROSS, 1992).

A carga negativa da superfície dos macrófagos desempenha um papel importante em vários processos celulares, incluindo o contato célula-célula, a fagocitose e a diferenciação celular (CARVALHO e DE SOUZA, 1990). O desenvolvimento de suas funções depende também de um reconhecimento primário ao nível de receptores de superfície presentes na membrana plasmática dessas células, que são, na sua maioria, glicoproteínas transmembrana (SILVA e QUELUZ, 1996). O caráter aniônico da superfície dos macrófagos é dado principalmente pela presença do ácido n-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico. Em adição, grupamentos sulfato e carboxila, encontrados em glicosaminoglicanas, e grupamentos fosfato encontrados nos fosfolípidos, também contribuem para a negatividade da superfície celular (SOEIRO *et al.*, 1994).

Entre as moléculas e receptores expressos pelos macrófagos estão moléculas MHC I e II, envolvidas no processo de apresentação de antígenos para os linfócitos T (DEBRICK *et al.*, 1991; CAO *et al.*, 1989), receptores Fc para imunoglobulinas e receptores para o sistema complemento, envolvidos na fagocitose de partículas opsonizadas (UNKELESS *et al.*, 1988; RABELLINO *et al.*, 1981), receptores para anafilaxina e receptores manose/fucose, envolvidos na fagocitose de partículas não opsonizadas (EZEKOWITZ e STAHL, 1988;

GOODMAN *et al.*, 1982) e receptores integrínicos, envolvidos na adesão e migração sobre moléculas da matriz extracelular (KOHN e KLINGEMANN, 1991).

1.1.2 Recrutamento e Ativação Celular

Durante o processo de inflamação, ocorre um aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (METCALF, 1971), assim como a redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que eles migram para o foco da lesão (van FURTH *et al.*, 1973). No sítio inflamatório, os macrófagos passam por um processo denominado ativação, que compreende vários estágios e caracteriza essas células, dependendo do estágio em que se encontram, como macrófagos estimulados e ativados (NATHAN, 1987; WERB *et al.*, 1986; GORDON, 1986; COHN, 1978).

Os macrófagos estimulados apresentam elevada capacidade de espraiamento, fagocitose e secreção de proteases neutras e outras enzimas, sendo ainda mais responsivos a fatores de crescimento, como fator estimulador de colônias de macrófagos. Entretanto, macrófagos estimulados apresentam ainda baixa atividade citotóxica e microbicida (GORDON, 1995). A estimulação dos macrófagos ocorre pela ação de fatores não específicos, sendo observada após injúria tecidual, onde a integridade do tecido é preservada (RAPPOLEE e WERB, 1988). Experimentalmente, esses macrófagos podem ser obtidos pela administração de drogas inertes, tais como tioglicolato e carragenina (GORDON, 1995; HOPPER, 1986).

Os macrófagos ativados, por sua vez, são capazes também de produzir grandes quantidades de metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio (H_2O_2 , O_2^- , OH^- e NO), o que lhes confere alta capacidade microbicida e tumoricida (JORENS *et al.*, 1995; ADAMS e HAMILTON, 1984). A ativação envolve a interação de citocinas com receptores presentes na membrana dos macrófagos,

desencadeando uma série de eventos moleculares que incluem hidrólise de fosfatidilinositol, formação de diacilglicerol, alterações na concentração de cálcio citosólico, ativação de proteína quinase C, fosforilação de proteínas e alterações na transcrição gênica (ADAMS e HAMILTON, 1992). A ativação experimental de macrófagos pode ser obtida pela infecção do animal com microrganismos, como bacilo Calmett-Guérin (BCG), ou pela aplicação de citocinas, como IFN- γ , gerando uma resposta em função do agente ativador (TAKEMURA e WERB, 1984).

1.1.3 Participação na Resposta Imune e Inflamatória

Os macrófagos influenciam vários aspectos da resposta imune e inflamatória, atuando como células efetoras e desempenhando um papel fundamental na união entre os sistemas imunes inato e adaptativo. Em adição, essas células participam de processos envolvidos na angiogênese e reparo tecidual (UNANUE e ALLEN, 1987) (Figura 1).

Para monitorar o organismo de maneira eficiente em busca de agentes agressores, os macrófagos, assim como as demais células do sistema imune, precisam circular como células não aderentes nos vasos sanguíneos e linfáticos e migrar como células aderentes através dos tecidos. Na presença de um antígeno estranho, devem ser capazes de se concentrar nos órgãos linfóides, ultrapassar as barreiras impostas pelo endotélio e membrana basal e migrar em direção aos sítios de infecção (SPRINGER, 1990).

Os macrófagos interagem com outras células e com a matriz extracelular em diversas situações durante sua ontogenia e diferenciação, assim como em resposta a estímulos fisiológicos apropriados (MERCURIO e SHAW, 1988; HARLAN, 1985). Sua habilidade de interagir com moléculas da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina e fibronectina, é um fator determinante para o desenvolvimento de suas funções. Essa interação permite às células

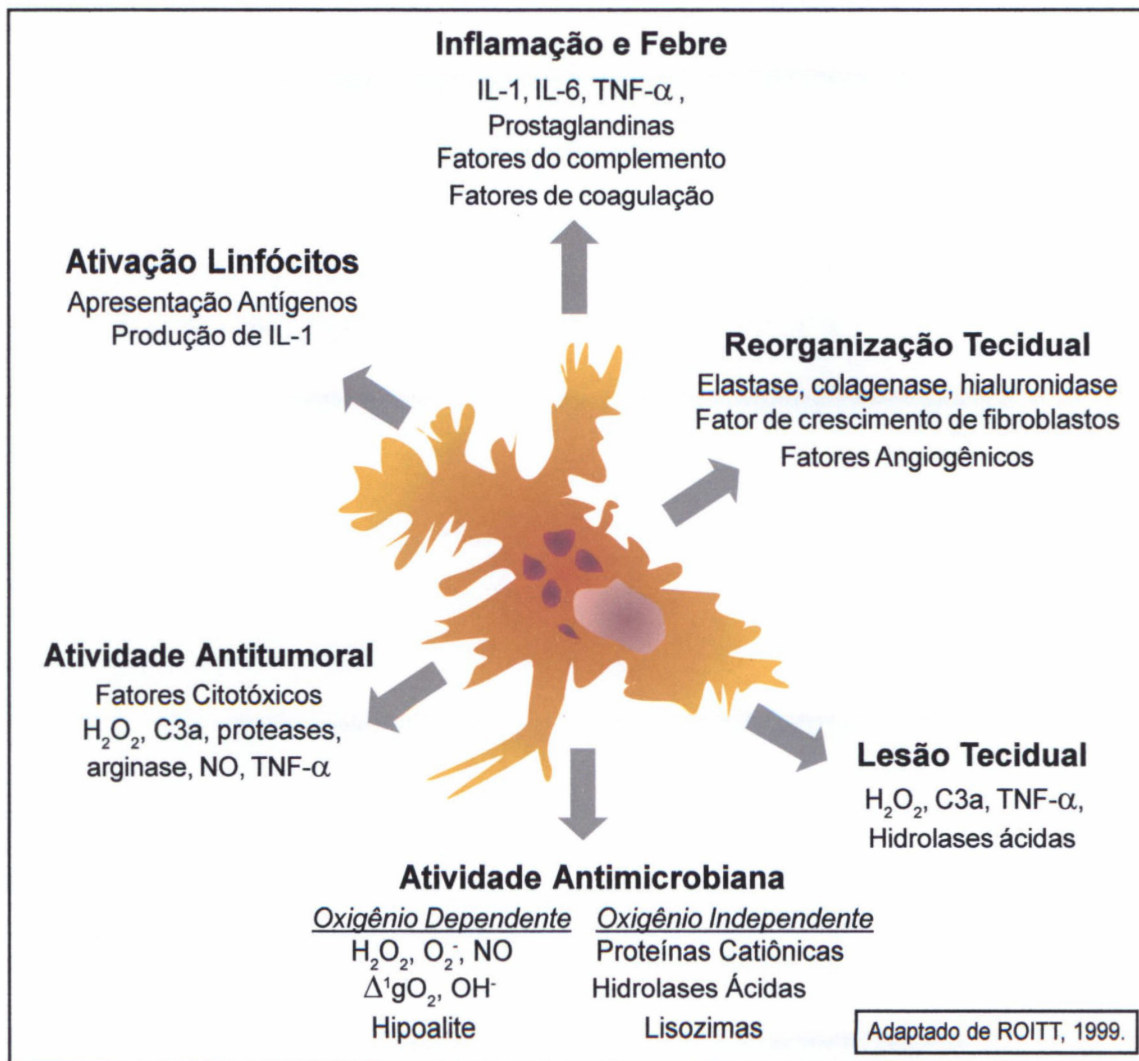


FIGURA 1- PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA - MECANISMOS DE AÇÃO

aderir e espalhar-se sobre a matriz e acontece via receptores específicos presentes na membrana celular, entre os quais destacam-se as integrinas (LAOUAR *et al.*, 1999; HYNES, 1992). Além de serem receptores de adesão, as integrinas funcionam como transdutores de sinal via fosforilação de resíduos de tirosina (CHEN *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1994). Assim, a interação dos receptores integrínicos com seus ligantes na matriz extracelular desencadeia uma série de cascatas de sinalização intracelular, influenciando a expressão gênica (LIN *et al.*, 1995) e regulando, dessa forma, processos como crescimento celular (SCHNELLER *et al.*, 1997) e apoptose (MIAO *et al.*, 1997).

A atuação dos macrófagos como células efetoras, bem como seu papel na união entre os sistemas imunes inato e adaptativo, envolve a participação de diferentes mecanismos, tais como endocitose, processamento e apresentação de antígenos e secreção de moléculas efetoras e regulatórias (GORDON, 1999) (Figura 2).

A endocitose é um processo fundamental para o desenvolvimento de diferentes funções dos macrófagos. Ela permite a captura de uma série de substâncias, macromoléculas e microrganismos, variando de acordo com a natureza do agente a ser ingerido (BERON *et al.*, 1995).

Substâncias ou partículas pequenas, presentes em solução, são captadas através de um processo denominado pinocitose, que pode ser seletivo ou não seletivo. Na pinocitose não seletiva ou de fase fluida, ocorre o englobamento de microgotas, promovendo a captação de solutos dissolvidos no fluido extracelular, tais como sacarose. Já na pinocitose seletiva ou absorptiva, o englobamento de macromoléculas depende de seu reconhecimento e ligação a receptores presentes na membrana, como é o caso de complexos antígeno-anticorpo e hormônios protéicos (PHAIRE-WASHINGTON *et al.*, 1980a).

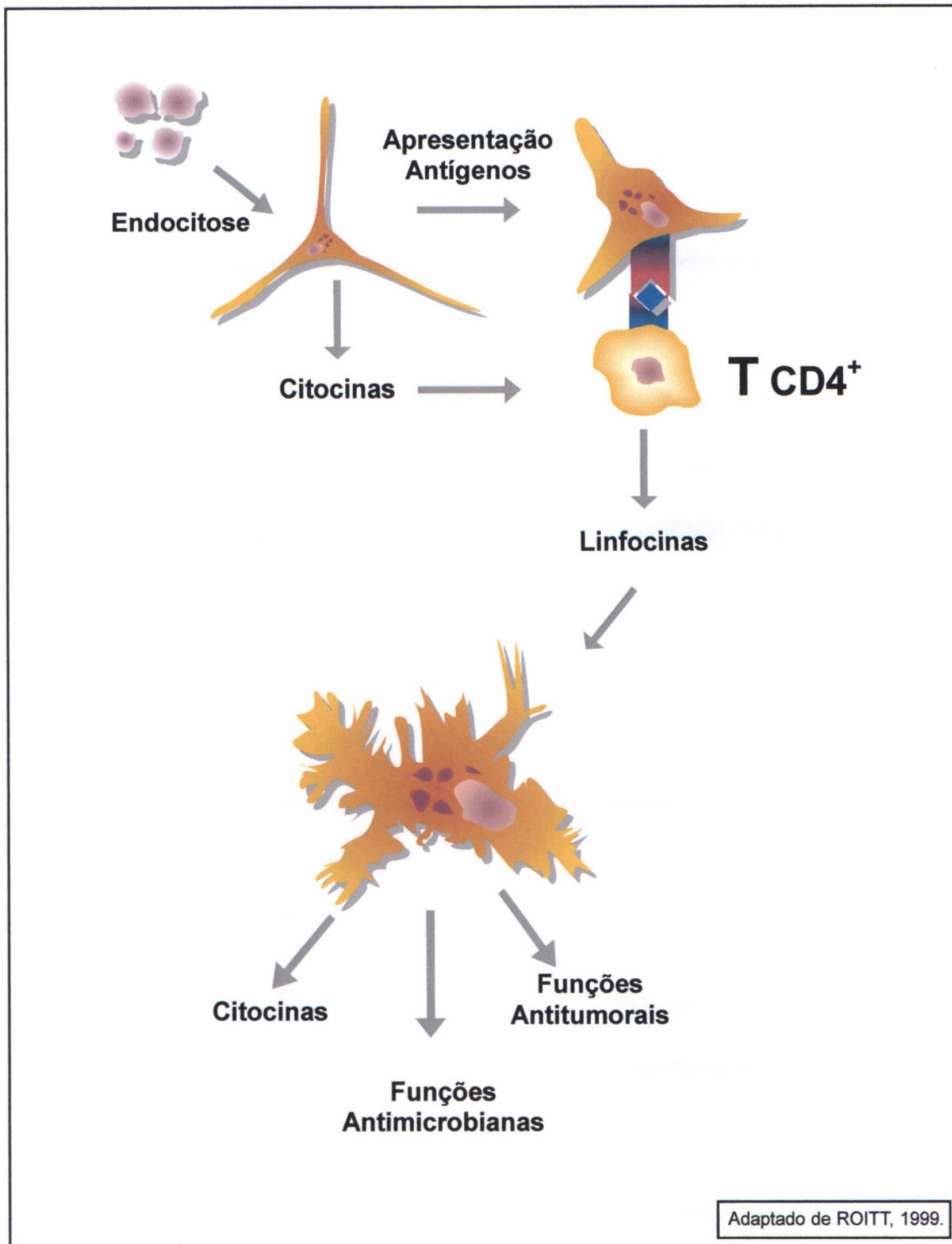


FIGURA 2- PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA UNIÃO ENTRE OS SISTEMAS IMUNES INATO E ADAPTATIVO.

A ingestão de partículas sólidas e microrganismos é denominada fagocitose. Assim como a pinocitose seletiva, a fagocitose depende da interação entre receptores presentes na membrana dos macrófagos e seus respectivos ligantes na superfície dos elementos a serem fagocitados (BERON *et al.*, 1995).

O processo de fagocitose está intimamente relacionado aos fenômenos de adesão e espriamento celular. Durante esses processos ocorrem uma série de alterações estruturais nas células, envolvendo a ativação e agrupamento de receptores de membrana para moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina e laminina. A ativação dos receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelular mediadas por tirosinoquinases, promovendo a reorganização de elementos do citoesqueleto, como microtúbulos e filamentos de actina e a redistribuição de organelas citoplasmáticas (GREENBERG, 1995). Essas alterações levam a uma mudança na morfologia celular, possibilitando o aumento da área de contato da membrana plasmática da célula fagocitária com a superfície das partículas ou microrganismos a serem fagocitados. Além disso, o aumento da polimerização de filamentos de actina próximo à membrana plasmática acarreta a formação de projeções celulares e pseudópodos, que se estendem ao redor das partículas-alvo e promovem sua internalização (ARAKI *et al.*, 1996).

O processo de endocitose está também relacionado com a função de célula apresentadora de antígeno (APC) desempenhada pelos macrófagos. Eles são capazes de interagir com uma variedade muito grande de moléculas extracelulares, tais como proteínas e polissacarídeos livres em solução ou presentes na estrutura de microrganismos. Subseqüentemente, essas moléculas são internalizadas, submetidas a mudanças metabólicas intracelulares e apresentadas em sua superfície em associação com moléculas MHC I e II, de maneira a serem reconhecidas pelos linfócitos T (DEBRICK *et al.*, 1991; CAO *et al.*, 1989).

Macrófagos podem ingerir e destruir microrganismos através da utilização de diferentes mecanismos microbicidas, tanto oxidativos (H_2O_2 , O_2^- , OH^- e NO), quanto não oxidativos (hidrolases ácidas, lisozimas e proteínas catiônicas). O processo de fagocitose estimula o “burst” respiratório dos macrófagos, resultando em um aumento na formação de reativos intermediários do oxigênio. O mesmo ocorre em relação à produção de metabólitos do nitrogênio, sendo que ambos variam em quantidade conforme o estágio de ativação dessas células (JOHNSTON, 1981). Dentre esses metabólitos, o óxido nítrico (NO) é uma das principais moléculas efetoras da atividade microbicida e citotóxica contra parasitas intra e extracelulares, bem como células tumorais (JORENS *et al.*, 1995)

O NO é derivado de átomos de nitrogênio guanidino da L-arginina e de oxigênio molecular, sendo produzido em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Quando em solução aquosa, o óxido nítrico é uma molécula relativamente instável, apresentando uma meia-vida entre 3 e 15s. Devido a esse fato, a produção de NO é normalmente medida indiretamente, através da determinação da concentração de seus produtos oxidativos, nitrito e nitrato, no soro ou sobrenadante de culturas celulares (PALMER *et al.*, 1988; KWON *et al.*, 1990; LEONE *et al.*, 1991).

Existem três isoformas de NO sintase: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS). Em resposta à acetilcolina e ao influxo de cálcio, a eNOS produz quantidades fisiológicas de NO, que se difunde para fora do endotélio e promove o relaxamento vascular e muscular. A nNOS de células neuronais também produz quantidades moderadas de NO em resposta ao cálcio e glutamato, participando dos processos de ativação das células da glia. A iNOS é expressada em uma variedade de tipos celulares, incluindo macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, em resposta a diversos estímulos imunológicos ativadores, tais como $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e LPS. Uma vez induzida, a iNOS produz

grandes quantidades de NO, mediando atividades tumorocidas e microbicidas (NATHAN e XIE, 1994; MARLETTA, 1993). Assim, a produção de óxido nítrico pode ser considerada uma característica típica de macrófagos ativados (NIBBERING *et al.*, 1991; DING *et al.*, 1988; STUEHR e MARLETTA, 1987).

Vários microrganismos têm demonstrado sensibilidade ao NO produzido por macrófagos (LIEW *et al.*, 1997). Entre eles, podemos citar *Leishmania* spp (GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1990), *Trypanosoma* spp (VESPA *et al.*, 1994; GAZZINELLI *et al.*, 1992; MUÑOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992) e *Toxoplasma gondii* (ADAMS *et al.*, 1990). O óxido nítrico é capaz de atuar diretamente sobre os parasitas, provocando efeitos tóxicos e inibitórios sobre diversos processos celulares, como crescimento e multiplicação (ADHUNA *et al.*, 2000; BOURGUIGNON *et al.*, 1997). Nas células tumorais, as proteínas e ácidos nucléicos são geralmente os alvos do óxido nítrico. A interação com essas substâncias gera, entre outros efeitos, inibição da síntese protéica e de DNA, além de supressão da respiração mitocondrial (JORENS *et al.*, 1995).

O grau de importância do óxido nítrico no controle de infecções parasitárias, entretanto, parece variar de acordo com o organismo hospedeiro em questão. Evidências que corroboram esse fato foram obtidas a partir da observação de que macrófagos derivados de monócitos sangüíneos de galinha são capazes de destruir formas de *T. cruzi*, embora não seja detectada a produção de NO por essas células durante a infecção (DAMATTA *et al.*, 2000).

Além das moléculas envolvidas nos mecanismos microbicidas e citotóxicos, os macrófagos secretam uma série de citocinas regulatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Essas citocinas podem exercer efeitos autócrinos ou parácrinos, controlando a proliferação, diferenciação e função efetora dos próprios macrófagos, linfócitos e outras células envolvidas na resposta imunológica (BIANCHI *et al.*, 1998; NATHAN, 1987).

1.2 HOMEOPATIA E MÉTODO CANOVA®

Dá-se o nome de Homeopatia ao sistema terapêutico criado no século XVIII pelo médico alemão Samuel Christian Hahnemann (1755-1843), fundamentado no princípio da similitude “*similia similibus curantur*”, no qual semelhantes são curados pelos semelhantes. Segundo Hahnemann, o medicamento homeopático é toda substância que tem a faculdade de provocar sintomas patológicos no homem sadio e de fazer desaparecer esses mesmos sintomas no homem enfermo (BAROLLO, 1995).

Os medicamentos homeopáticos são elaborados com base em substâncias dos reinos animal, vegetal e mineral, segundo uma técnica farmacêutica própria da homeopatia. Essa técnica é denominada dinamização e envolve a diluição seriada das substâncias em questão, intercalada a processos rítmicos ou sucussão (KAPLAN, 1994).

Ao contrário das drogas utilizadas pela medicina alopática, que atuam diretamente sobre os processos fisiológicos relacionados com os sintomas da doença, os medicamentos homeopáticos promovem a melhora do estado geral de saúde do indivíduo, estimulando seu sistema imunológico a desencadear respostas adequadas para cada situação. Assim, o tratamento homeopático permite ao indivíduo restabelecer a saúde e prevenir a doença sem, no entanto, produzir os efeitos colaterais experimentados por muitos dos tratamentos convencionais (ULLMAN, 1995).

O Método Canova® consiste num medicamento indicado em patologias onde o sistema imunológico do indivíduo encontra-se comprometido, podendo ser utilizado sozinho ou em associação a outros agentes terapêuticos no tratamento de diversas doenças, tais como hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e neoplasias.

O Método Canova® trata-se de um produto resultante da combinação das seguintes tinturas homeopáticas, conhecidas das farmacopéias mundiais:



Esses componentes são diluídos em água destilada contendo 0.01% (v/v) de etanol, utilizada como veículo. A extração e a seqüência de combinação de seus componentes é essencial ao processo de ação desse medicamento, resultando daí a denominação de Método.

O Método Canova® é originário da Argentina, sendo atualmente manipulado pela farmácia A Homeoterápica em Curitiba, PR, e envasado pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), o qual também realiza o controle de qualidade através de testes de esterilidade, toxicidade e pirogênio.

As informações aqui descritas sobre o Método Canova® foram fornecidas pela empresa Canova do Brasil Ltda., Curitiba, PR, e estão também disponíveis no site: <http://www.metodocanova.com.br>.

2 JUSTIFICATIVA

Desordens no sistema imunológico podem ser a causa de muitas enfermidades e a responsividade do sistema imune determina de maneira decisiva o prognóstico do paciente. Pensando nesse sentido 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 e suficiente a qualquer estímulo agressor, sem, no entanto, causar efeitos agressivos ao mesmo.

O Método Canova[®] é um medicamento imunomodulador indicado em patologias onde o sistema imune do paciente se encontra comprometido. Dados clínicos mostraram que esse medicamento não apresenta efeitos colaterais nem toxicidade, aumentando a imunidade do indivíduo e contribuindo para o desencadeamento de uma resposta imunológica específica e adequada contra diferentes estados patogênicos.

Nosso laboratório tomou conhecimento do Método Canova[®] em 1997, através de informações provenientes de médicos e pacientes que o estavam utilizando. Desde então, vários experimentos foram e vêm sendo desenvolvidos, no intuito de obter esclarecimentos sobre suas propriedades e mecanismos de ação. Entre eles, estudos utilizando macrófagos peritoneais de camundongo mostraram que o Método Canova[®] atua sobre essas células, provocando alterações na sua morfologia, distribuição de receptores e secreção de citocinas (PIEMONTE e BUCHI, 2001).

Esses dados indicam um processo de ativação dos macrófagos, sugerindo uma via de atuação do medicamento através dos mesmos. No presente trabalho, objetivou-se dar continuidade aos experimentos já realizados com o Método Canova[®], uma vez que torna-se premente a obtenção de informações que contribuam para o esclarecimento de suas propriedades.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do Método Canova[®] sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais de camundongo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar macrófagos tratados e não tratados com o Método Canova[®] em relação aos seguintes parâmetros funcionais:

- **Mobilização Celular:** determinar o número de células presentes na cavidade peritoneal dos camundongos;
- **Viabilidade Celular:** determinar a porcentagem de células viáveis no lavado peritoneal dos camundongos;
- **Capacidade de Adesão:** determinar a taxa de adesão sobre superfícies plásticas e matrigel;
- **Capacidade de Espreadimento:** determinar a taxa de espreadimento sobre superfícies plásticas e matrigel;
- **Atividade Endocítica:** calcular o índice endocítico após a interação com leveduras e parasitas intracelulares;
- **Produção de Óxido Nítrico:** quantificar a produção de óxido nítrico na presença ou não de parasitas intracelulares;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos suíços (*Mus musculus*), machos, com 2 a 3 meses idade, pesando entre 25 e 35g, cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.2 TRATAMENTO COM O MÉTODO CANOVA®

Para todos os experimentos foi utilizado o Método Canova® na sua forma injetável, cedido pela empresa Canova do Brasil Ltda.

4.2.1 Tratamento *in vivo*

Os camundongos foram inoculados, via subcutânea, com doses diárias de 0,2 ml do Método Canova®. Os animais foram tratados durante um período de 7 ou 28 dias, conforme o determinado para cada experimento. Os animais do grupo controle não receberam tratamento. Após 24 horas do término do tratamento, os animais foram sacrificados e os macrófagos coletados para a realização dos experimentos desejados (PIEMONTE, 2000).

4.2.2 Tratamento *in vivo* e *in vitro*

Os macrófagos foram obtidos de camundongos submetidos ao tratamento *in vivo* durante 7 dias com o Método Canova®, sendo então mantidos em cultivo sob condições ideais. Durante todo o período determinado para cada experimento, o tratamento foi complementado com a aplicação *in vitro* do

medicamento, na concentração de 1% (v/v) em relação ao meio de cultura padrão (ver item 4.7). As doses foram aplicadas diariamente, sendo a primeira adicionada após 3 horas de cultivo e as demais a intervalos de 24 horas. Os macrófagos do grupo controle foram obtidos de animais que não receberam tratamento e cultivados sob condições ideais, sem a adição do medicamento, até o final dos experimentos.

4.3 COLETA DAS CÉLULAS PERITONEAIS

Os animais foram sacrificados por inalação de éter etílico, sendo então realizada a secção da pele abdominal para exposição do peritônio parietal e a inoculação intraperitoneal de 5-10 ml de PBS (pH 7.4) estéril e gelado. Após o massageamento do abdômen por aproximadamente 30 segundos para o desprendimento das células, o lavado peritoneal dos camundongos foi aspirado e acondicionado em frascos estéreis, mantidos em banho de gelo até sua utilização. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas células provenientes da união dos lavados de 3 a 10 camundongos por grupo (BUCHI e DE SOUZA, 1992).

4.4 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS PERITONEAIS

Após a coleta do lavado peritoneal, as células foram centrifugadas a 850xg durante 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado celular ressuspenso em 1 ml de meio de cultura (ver item 4.7). A suspensão celular resultante foi então diluída 1:10 (v:v) em PBS (pH 7,4) estéril. A determinação do número de células presente em cada amostra foi realizada através de contagem em Câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio invertido e utilização de anéis de contraste de fase (SAMPAIO *et al.*, 2001).

4.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células contidas no lavado peritoneal foi determinada pela técnica de exclusão de Azul de Tripán, onde apenas as células não viáveis coram-se de azul. Após a coleta, as células foram centrifugadas a 850xg durante 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado celular ressuspense em 1ml de PBS (pH 7,4) estéril. Alíquotas da suspensão celular foram diluídas 1:10 (v:v) em uma solução de Azul de Tripán 1% (v/v) em PBS estéril (pH 7,4). A porcentagem de células viáveis foi determinada a partir da contagem diferencial realizada em Câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio de luz (SAMPAIO *et al.*, 2001).

4.6 SELEÇÃO DOS MACRÓFAGOS

A seleção dos macrófagos foi realizada por adesão, processo que permite obter culturas em monocamada de células aderentes, das quais pelo menos 98% são macrófagos. As células contidas no lavado peritoneal foram contadas em Câmara de Neubauer e centrifugadas a 850xg durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio de cultura (ver item 4.7), de forma a atingir a concentração desejada para cada experimento. Essa suspensão celular foi distribuída em placas de cultivo, incubadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 15 minutos. Passado esse período, as células não aderentes foram removidas através de 3 lavagens com meio de cultura e os macrófagos cultivados sob condições ideais (ver item 4.7) até o final dos experimentos (PIEMONTE e BUCHI, 2001).

4.7 CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR DOS MACRÓFAGOS

Os macrófagos foram cultivados em placas descartáveis de cultivo, mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante todo o período determinado para cada experimento. Como meio de cultura padrão, foi utilizado o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) termoinativado, 1 U/ml de Penicilina, 1 µg/ml de Streptomicina e 2,5 µg/ml de Amphotericina. Para a realização de alguns experimentos, entretanto, foi utilizado meio de cultura sem SFB (PIEMONTE, 2000).

4.8 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADESÃO E ESPRAIAMENTO

Para os ensaios de adesão celular e espraio foram utilizados macrófagos tratados *in vivo* durante 7 dias, cultivados em placas de 96 poços de fundo chato cobertas ou não com matrigel (10µg/ml), cedido pelo Laboratório de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

O matrigel é um composto representativo da membrana basal, sendo constituído de diversas glicoproteínas, incluindo colágeno IV, laminina, entactina e proteoglicanos. As fontes mais convenientes para purificação de proteínas da membrana basal são tumores murinos, entre os quais podemos citar o tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongos. O EHS caracteriza-se por apresentar agregados de células tumorais circundadas por uma camada de membrana basal com vários micrômetros de diâmetro, cuja extração e purificação resulta na preparação do matrigel. Em alguns experimentos de adesão celular foram realizados ensaios com a utilização de superfícies recobertas com soro albumina bovina (BSA), normalmente utilizada como controle negativo nesse tipo de experimento (TIMPL *et al.*, 1987).

4.8.1 Determinação da Taxa de Adesão

Após a coleta, as células foram contadas em Câmara de Neubauer, centrifugadas a 850xg durante 5 minutos e ressuspensas em meio de cultura sem SFB, de maneira a atingir a concentração de 3×10^6 células/ml. Foram então adicionadas, a cada poço, alíquotas de 100 μ l da suspensão celular (3×10^5 células/poço) e as placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 5 min, 15 min, 1 hora ou 2 horas. Após os tempos determinados, as células não aderidas foram removidas através de 3 lavagens com PBS (pH 7,4).

Em seguida, as células que permaneceram aderidas foram fixadas e a taxa de adesão foi estimada com a utilização do corante Cristal Violeta (Protocolo 1). A absorbância das amostras foi determinada em 550nm, com a utilização de um leitor de microplacas. Para cada experimento, foram realizados ensaios em quadruplicata dentro de cada grupo de tratamento.

4.8.2 Determinação da Porcentagem de Espreadimento

As células foram coletadas, contadas em Câmara de Neubauer, centrifugadas a 850xg durante 5 minutos e ressuspensas em meio de cultura sem SFB, de maneira a atingir a concentração de 3×10^6 células/ml. Alíquotas de 100 μ l da suspensão celular foram então adicionadas a cada poço (3×10^5 células/poço) e as placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 1 ou 3 horas. Passado esse período, as células não aderidas foram removidas através de 3 lavagens com PBS (pH 7,4).

A porcentagem de células espreadas após os diferentes tempos de incubação foi determinada para cada amostra de 150-180 células, através de contagem em microscópio invertido, utilizando anéis de contraste de fase. Em cada experimento, foram realizadas quadruplicatas dentro de cada grupo de tratamento.

PROTOCOLO 1

ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

(Placa de 96 poços)

1. Aplicar 100µl da solução de proteína (em PBS estéril) a cada poço;
2. Incubar na estufa a 37°C e 5%CO₂ (1 hora);
3. Incubar "overnight" a 4°C;
4. Aspirar a proteína não aderida;
5. Lavar 3x com PBS estéril;
6. Adicionar 200µl da solução de BSA1% em PBS estéril;
7. Incubar na estufa a 37°C e 5%CO₂ (1 hora);
8. Lavar 2x com PBS estéril (ou meio sem SFB);
9. Plaquear as células (1x10⁵ a 5x10⁵ células/poço) em meio sem SFB;
10. Incubar na estufa a 37°C e 5%CO₂ pelo tempo desejado;
11. Aspirar as células não aderidas;
12. Lavar 3x com PBS estéril;
13. Fixar com metanol P.A. à temperatura ambiente (10 minutos);
14. Lavar 3x com PBS estéril;
15. Adicionar 60 µl da solução de cristal violeta 0,2% em etanol 2% (5 minutos);
16. Lavar 10x com PBS (mesmo volume);
17. Adicionar 150µl da solução citrato de sódio 0,05M em etanol 50%(10 minutos);
18. Homogeneizar e transferir 100µl do sobrenadante para outra placa;
19. Determinar a absorbância em 550nm;

4.9 MICRORGANISMOS

4.9.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Os exemplares de *S. cerevisiae* foram mantidos congelados a -20°C , sendo alíquotas do estoque separadas e descongeladas para a utilização em cada experimento. Durante o processo de preparação, as leveduras foram diluídas e homogeneizadas em 10ml de PBS (pH 7.4), sendo então lavadas 3 vezes por centrifugação a $1500\times g$ durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e substituído a cada etapa. Após a lavagem, o número de leveduras contidas na solução foi determinado através de contagem em Câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio invertido e utilização de anel de contraste de fase (BUCHI *et al.*, 1993).

4.9.2 *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* clone Dm28c (CONTRERAS *et al.*, 1988), cedidas pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). As formas epimastigotas foram mantidas através de repiques semanais em meio LIT (“liver infusion tryptose”) a 28°C . As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas a partir da diferenciação *in vitro* das formas epimastigotas. Para indução do processo de metaciclogênese, epimastigotas de culturas em fase de crescimento exponencial foram incubados em TAU (“triatomine artificial urine” - 190mM NaCl, 17mM KCl, 2mM MgCl_2 , 2mM CaCl_2 , 0.035% NaHCO_3 , 8mM Na_3PO_4 , pH 6.0) durante 2 horas. Isso feito, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultivo contendo TAU3AAG (TAU acrescido de 50mM L-glutamato, 10mM L-prolina, 2mM L-aspartato and 10mM D-glucose) e incubados durante 3 a 4 dias a 28°C . Durante o processo de

diferenciação, grande parte das formas epimastigotas permanecem aderidas à superfície das garrafas de cultura, enquanto que as formas tripomastigotas metacíclicas já diferenciadas desprendem-se e vão sendo liberadas no sobrenadante (CAMARGO, 1964). Após o período de metaciclogênese, o sobrenadante das culturas foi submetido a contagem diferencial em Câmara de Neubauer para determinação do número de tripomastigotas metacíclicos, com o auxílio de microscópio invertido e utilização de anel de contraste de fase.

4.9.3 *Leishmania amazonensis*

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), cepa referência da Organização Mundial da Saúde, cedidas pelo Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná. Os parasitas foram mantidos através de repiques semanais em meio bifásico Tobie & Evans a 24°C. Para a obtenção de culturas em massa, os parasitas foram repicados em meio RPMI 1640 acrescido de 20% de SFB e mantidos sob condições ideais de cultivo por aproximadamente 15 dias, antes da realização de cada experimento. Passado esse período, o número de promastigotas nas culturas foi determinado através de contagem em Câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio invertido e utilização de anéis de contraste de fase (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993).

4.10 INTERAÇÃO MICRORGANISMOS-MACRÓFAGOS

Após a realização da contagem, os microrganismos foram centrifugados até que fosse obtido um precipitado celular, o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em meio de cultura sem SFB. A concentração final da solução foi calculada para que o número de parasitas a ser adicionado em cada experimento estivesse contido em 250 μ l de meio de cultura.

Os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços sob condições ideais durante 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com meio de cultura sem SFB e os parasitas adicionados, na proporção de 10:1 em relação aos macrófagos. As placas de cultivo foram então incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂, durante 2 horas (CARVALHO *et al.*, 1999).

Após o período de interação, os poços foram lavados com meio de cultura sem SFB para remoção dos parasitas não aderidos e as células fixadas ou mantidas em cultura sob condições ideais, conforme o determinado para cada experimento.

4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENDOCÍTICA

Para os ensaios de endocitose foram utilizados macrófagos submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*, sendo a atividade endocítica avaliada a partir da interação dos mesmos com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

As células (1×10^5 células/poço) foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 24 poços e deixadas para interagir com os diferentes microrganismos (ver item 4.10) durante um período de duas horas. Após o período de interação, as células foram lavadas com PBS (pH 7,4) para remoção dos microrganismos não fagocitados, fixadas e processadas para microscopia de luz, com coloração pela técnica de Giemsa (Protocolo 2).

Em cada experimento foram realizadas oito repetições dentro de cada grupo de tratamento, sendo os experimentos repetidos pelo menos 2 vezes. Foram contados de 100 a 150 macrófagos por lamínula, sendo o n.º total de macrófagos, o n.º de macrófagos com microrganismos e o n.º de microrganismos internalizados determinado para cada amostra.

O cálculo do índice endocítico foi realizado segundo BUCHI e DE SOUZA (1992; 1993), a partir da utilização das seguintes equações:

$$\text{Índice Endocítico} = \frac{\text{n.º microrganismos internalizados}}{\text{n.º macrófagos c/ microrganismos}} \times \% \text{ macrófagos c/ microrganismos}$$

$$\% \text{ macrófagos c/ microrganismos} = \frac{\text{n.º macrófagos c/ microrganismos}}{\text{n.º total macrófagos}}$$

PROTOCOLO 2

COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE GIEMSA

1. Fixar em Bouin durante 5 minutos à temperatura ambiente;
2. Lavar em Álcool 70% (3 a 4 vezes);
 - * Pode parar nesse estágio por tempo indeterminado, até a coloração.
3. Lavar rapidamente em água destilada (2 vezes);
4. Incubar com Giemsa 10% de 1 a 3 horas a temperatura ambiente;
 - * Filtrar o corante logo antes de diluir para usar.
5. Lavar rapidamente em água destilada (2 vezes);
6. Passar pela bateria de desidratação (2 vezes):
 - *Retirar o excesso das soluções em um papel filtro entre um passo e outro.
 - Acetona pura 1
 - Acetona pura 2
 - Acetona 3 + 1 Xilol
 - Acetona 1 + 1 Xilol
 - Acetona 1 + 3 Xilol
 - Xilol puro 1
 - Xilol puro 2
7. Montar em lâmina com Entelan;
8. Secar à temperatura ambiente.

4.12 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Para a avaliação da produção de óxido nítrico foram utilizados macrófagos submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*, cultivados em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e colocados para interagir com os seguintes parasitas intracelulares: formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A produção de NO foi também determinada para macrófagos cultivados apenas com meio de cultura sob condições ideais, ou seja, na ausência dos parasitas.

A avaliação da produção de óxido nítrico foi realizada indiretamente, a partir da determinação da concentração de nitrito (NO_2^-), o qual é um produto estável da reação de produção de óxido nítrico, no sobrenadante das culturas (Protocolo 3). Alíquotas de $100\mu\text{l}$ de cada sobrenadante foram centrifugadas a $1500 \times g$ durante 5 minutos, transferidas para placas de 96 poços e misturadas em igual proporção com o reagente de Griess que, na presença de nitrito, reage para produzir uma cor lilás. A densidade óptica (D.O.) de cada amostra foi então determinada em leitor de microplaca (BIO-RAD) em 550nm.

A concentração de nitrito presente no sobrenadante das amostra foi calculada com base nos valores de D.O. obtidos para cada concentração ($10\mu\text{M}$ - $80\mu\text{M}$) de uma curva padrão, confeccionada com a utilização de nitrito de sódio diluído em meio de cultura.

PROTOCOLO 3

DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

1. Plaquear as células (3×10^5 a 5×10^5 células/ poço);
2. Deixar aderir por 15 minutos a 37°C e 5% CO_2 ;
3. Aspirar o sobrenadante para retirar as células não aderentes;
4. Lavar 2 vezes com PBS a 37°C ;
5. Adicionar meio de cultura e incubar no mínimo por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 ;
6. Centrifugar o sobrenadante e transferir $100\mu\text{l}$ para uma outra placa;
7. Adicionar $100\mu\text{l}$ do reagente de Griess e incubar 10 minutos a temperatura ambiente;
8. Proceder a leitura das absorbâncias em 550nm.
9. Calcular a concentração de NO, utilizando a curva padrão de nitrito de sódio.

→Reagente de Griess

Misturar as duas soluções na proporção 1:1, imediatamente antes do uso.

Solução A: naftiletlenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5%

Solução B: Sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5%

Obs.: As soluções separadas podem ser estocadas na geladeira por 1 mês.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) com delineamento em “Blocos ao Acaso com Repetições”, conforme esquema abaixo

ANOVA				
Fonte de Variação	GL	SQ	SQ	F
Tratamentos	$k-1$	$\frac{\sum T^2}{rm} - C$	$\frac{SQTr}{k-1}$	$\frac{SQTr}{SQR}$
Blocos	$r-1$	$\frac{\sum B^2}{km} - C$	$\frac{SQB}{r-1}$	$\frac{SQBl}{SQR}$
Interação (TrxB)	$(k-1)(r-1)$	$\frac{\sum I^2}{m} - C - SQTr - SQBl$	$\frac{SQTrxB}{(K-1)(r-1)}$	$\frac{SQTrxB}{SQR}$
Resíduo	$kr(m-1)$	$SQT - SQTr - SQBl - SQTrxB$	$\frac{SQR}{kr(m-1)}$	
Total	$n-1$	$\sum y^2 - C$		

n = n.º dados	T = total tratamento ($\sum rm$ dados)	$C = \frac{(\sum y)^2}{n}$
y = cada um dos dados	B = total bloco ($\sum km$ dados)	
k = n.º tratamentos	I = total dos tratamentos dentro de cada bloco	
r = n.º blocos	G = total geral ($\sum y; \sum T; \sum B$)	
m = n.º repetições	$CV\%$ = coeficiente de variação	$CV\% = \sqrt{\frac{QMR}{G}} \times 100$

Quando necessário, para a realização de comparação entre as médias, a análise de variância foi complementada com o teste de Tukey, onde a diferença mínima significativa (d.m.s.) foi calculada a partir da seguinte equação:

$$d.m.s. = q \sqrt{\frac{QMR}{m}}$$

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e o nível de significância estatístico estabelecido em 5% (* $p < 0,05$) ou 1% (** $p < 0,01$).

4.14 REAGENTES

Acetona P.A. (Merck)

Ácido acético glacial (Reagen)

Ácido fosfórico (Analítica)

Ácido pícrico (Reagen)

Albumina fração V 99% pó (Sigma)

Álcool etílico (Merck)

Amphotericina/ Penicilina/ Streptomicina (Sigma)

Azul de Tripan (Merck)

Citrato de sódio (Analítica)

Cristal violeta (Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma)

Entellan (Sigma)

Éter etílico (Rhodia)

Formaldeído (Reagen)

Giemsa (Qeel)

Metanol P. A. (Merck)

Método Canova® (Canova do Brasil Ltda.)

Naftilenodiamino (Sigma)

Nitrito de sódio (Sigma)

Sulfonamina p-aminobenzeno (Sigma)

Soro fetal bovino (Gibco BRL)

Xilol (Reagen)

4.15 EQUIPAMENTOS

Leitor de microplacas (BIO-RAD)

Microscópio invertido (Leica)

Estufa úmida de CO₂ (NUAIRE)

Centrífuga (Bering)

Fluxo Laminar (Veco)

Microscópio de Luz (STUDARLab)

Balança Digital (Sartorius)

Capela (Permutation)

Fotomicroscópio Olympus 820 (Espencer)

Microcentrífuga (Bering)

pHmetro (Micronal)

5 RESULTADOS

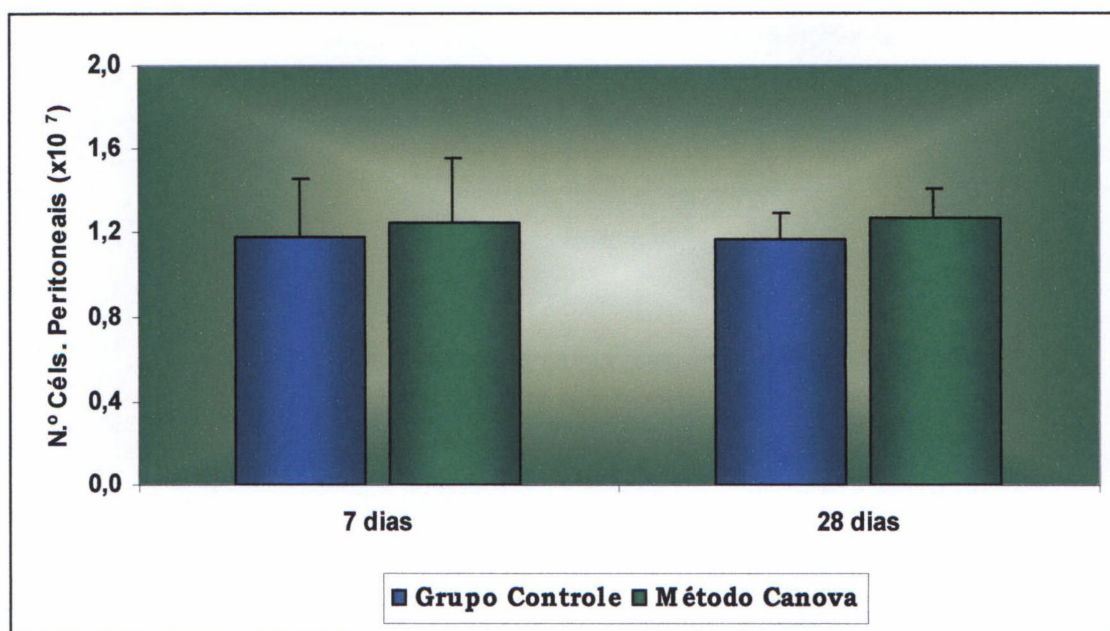
5.1 MOBILIZAÇÃO CELULAR

Não foram observadas alterações significativas na mobilização de células para a cavidade peritoneal dos camundongos em resposta ao tratamento com o Método Canova[®] durante 7 ou 28 dias, embora o número de células peritoneais dos animais tratados tenha sido 6-8% maior do que dos animais controle, em todos os experimentos realizados (Figura 3).

5.2 VIABILIDADE CELULAR

O tratamento com o Método Canova[®], durante 7 ou 28 dias, não acarretou efeitos significativos sobre a viabilidade das células presentes na cavidade peritoneal dos camundongos.

A porcentagem de células viáveis manteve-se acima de 95% em todas as amostras analisadas, tanto para os animais que receberam o tratamento, quanto para os animais controle.

MOBILIZAÇÃO CELULAR**FIGURA 3 - EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A MOBILIZAÇÃO CELULAR**

O lavado peritoneal foi obtido de camundongos submetidos ao tratamento durante 7 ou 28 dias. O número de células peritoneais foi determinado para cada grupo de três animais, através de contagem em Câmara de Neubauer, com a utilização de microscopia de contraste de fase. Os valores estão expressos como média \pm DP de 8 experimentos distintos.

5.3 CAPACIDADE DE ADESÃO

A capacidade de adesão dos macrófagos ao plástico e à matriz extracelular não foi alterada significativamente em resposta ao tratamento com o Método Canova[®], embora a taxa de adesão do grupo tratado tenha sido maior do que a do grupo controle em ambas as condições experimentais (Figura 4).

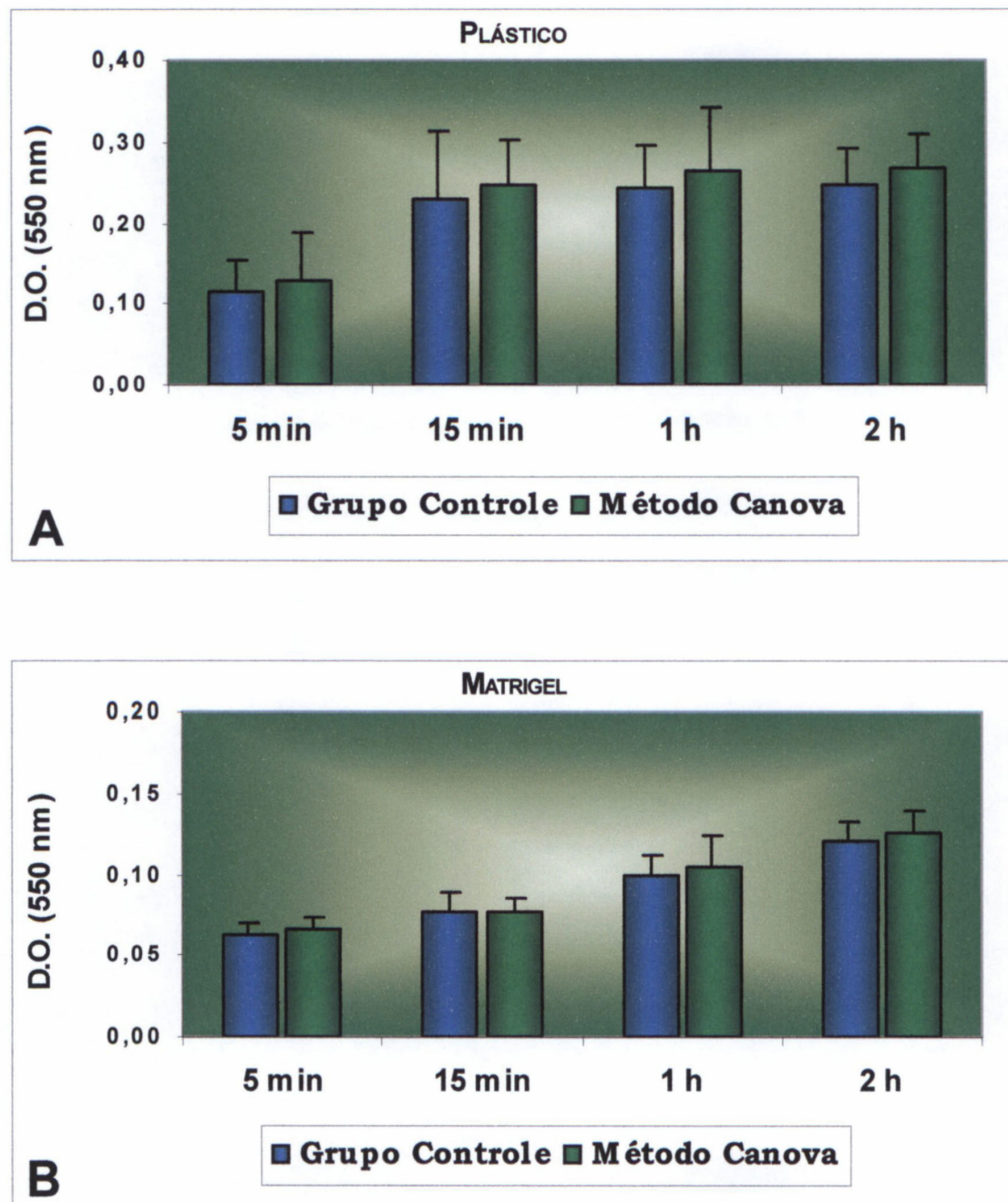
O perfil de adesão dos macrófagos, independente da realização do tratamento, mostrou diferenças qualitativas e quantitativas entre as duas superfícies testadas: plástico e matrigel.

Nos ensaios de adesão ao plástico, observou-se que a taxa de adesão dos macrófagos atingiu um valor máximo por volta dos 15 minutos de incubação (Figura 4a). Já nos ensaios realizados sobre superfícies recobertas com matrigel, essa taxa apresentou uma tendência a aumentar de maneira proporcional ao tempo de incubação (Figura 4b).

Em adição, a adesão dos macrófagos à superfícies plásticas foi significativamente maior do que àquelas recobertas com matrigel, independente do tempo de incubação e do tratamento (Figura 5).

Foi observada ainda, nos ensaios realizados sobre superfícies recobertas com BSA, uma taxa considerável de adesão dos macrófagos. Os resultados foram semelhantes para os grupos tratado e controle (dados não mostrados).

CAPACIDADE DE ADESÃO

**FIGURA 4 - EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A CAPACIDADE DE ADESÃO**

Os macrófagos foram submetidos ao tratamento *in vivo* durante 7 dias, plaqueados (3×10^5 células/poço) sobre (A) superfícies plásticas ou (B) recobertas com matrigel ($10 \mu\text{g/ml}$) e incubados durante os tempos determinados. A taxa de adesão foi avaliada com a utilização do corante Cristal Violeta, sendo a D.O. das amostras determinada em 550nm. Os valores estão expressos como média \pm DP de amostras em quadruplicata e são representativos de três experimentos distintos.

ADESÃO: PLÁSTICO X MATRIGEL

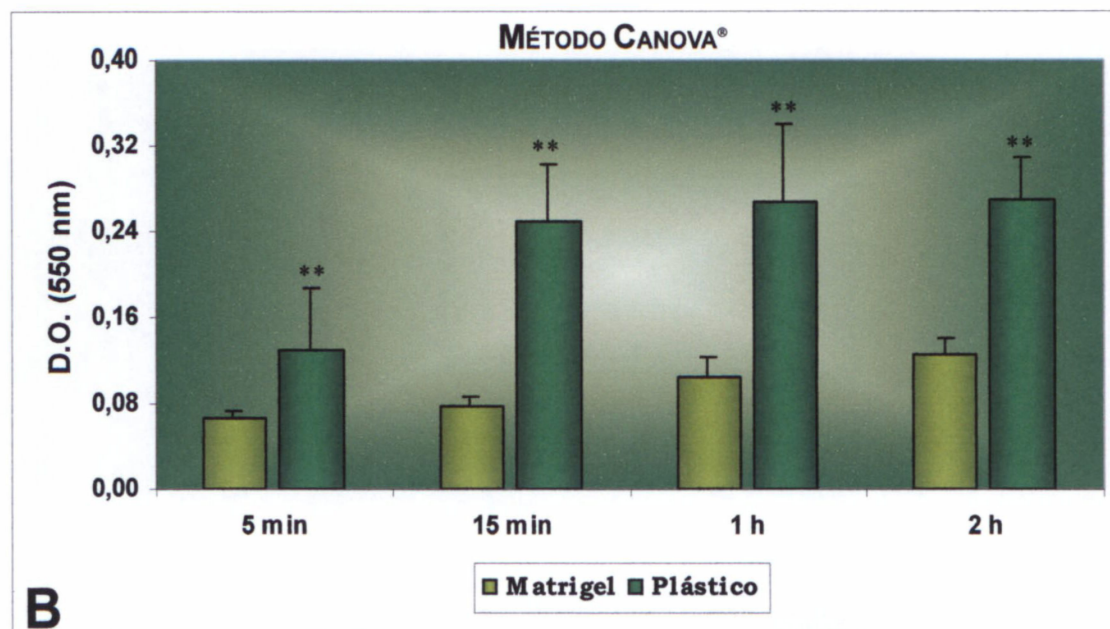
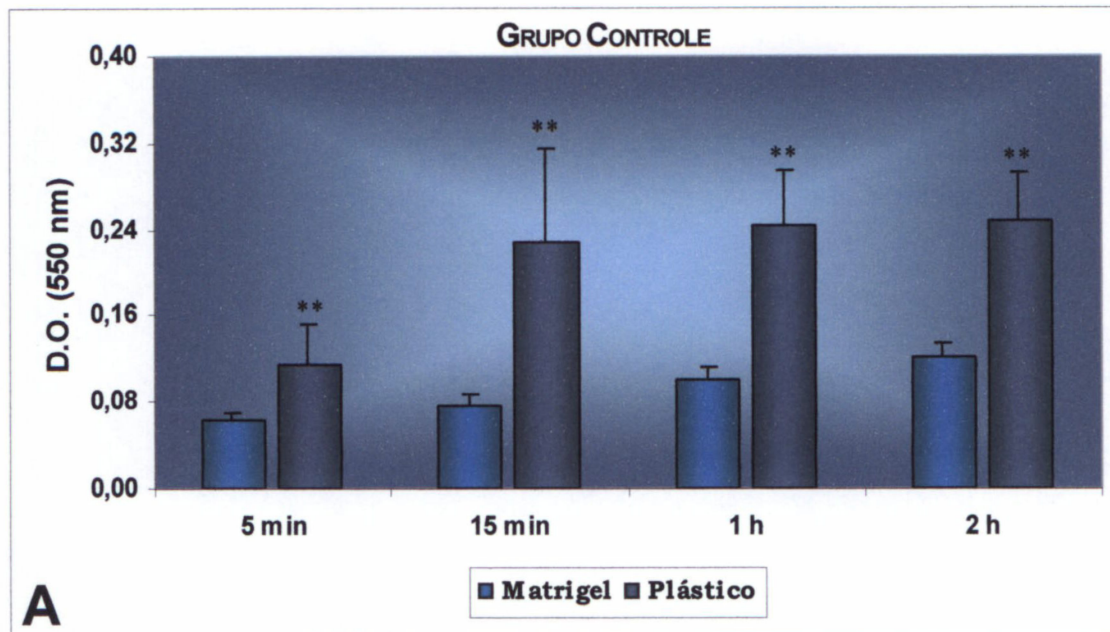


FIGURA 5 - CAPACIDADE DE ADESÃO: PLÁSTICO X MATRIGEL

Os macrófagos foram submetidos ao tratamento *in vivo* durante 7 dias, plaqueados (3×10^5 células/poço) sobre superfícies plásticas ou recobertas com matrigel ($10 \mu\text{g/ml}$) e incubados durante os tempos determinados. A taxa de adesão foi avaliada com a utilização do corante Cristal Violeta, sendo a D.O. das amostras determinada em 550nm. Os valores estão expressos como média \pm DP de amostras em quadruplicata e são representativos de 3 experimentos distintos. **A**, Grupo Controle; **B**, Método Canova®. ** $p < 0,01$ quando comparado ao matrigel.

5.4 CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO

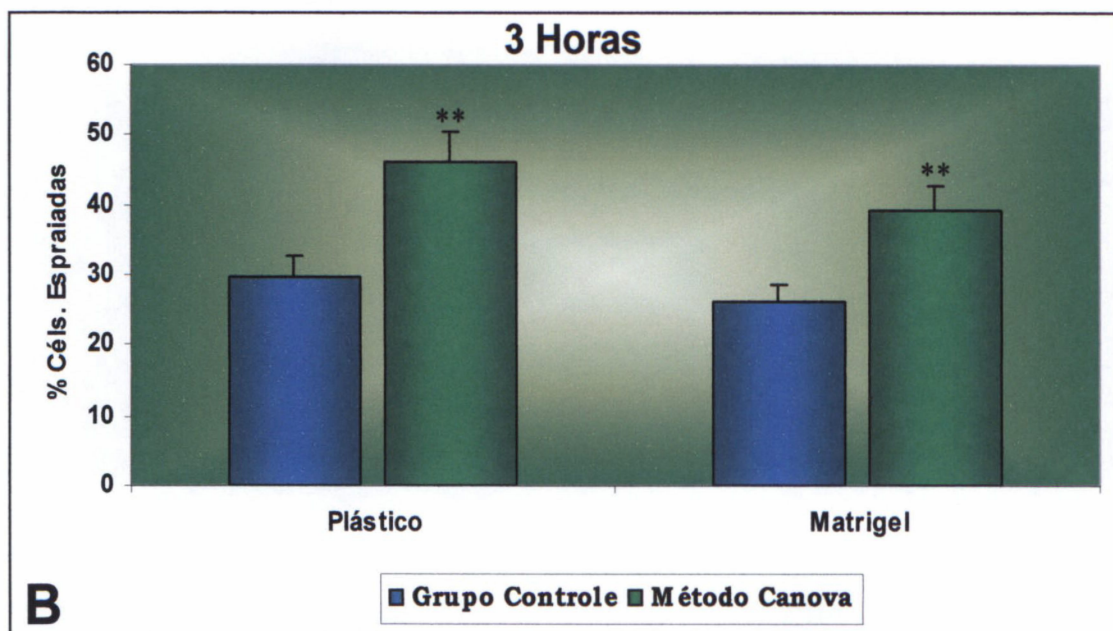
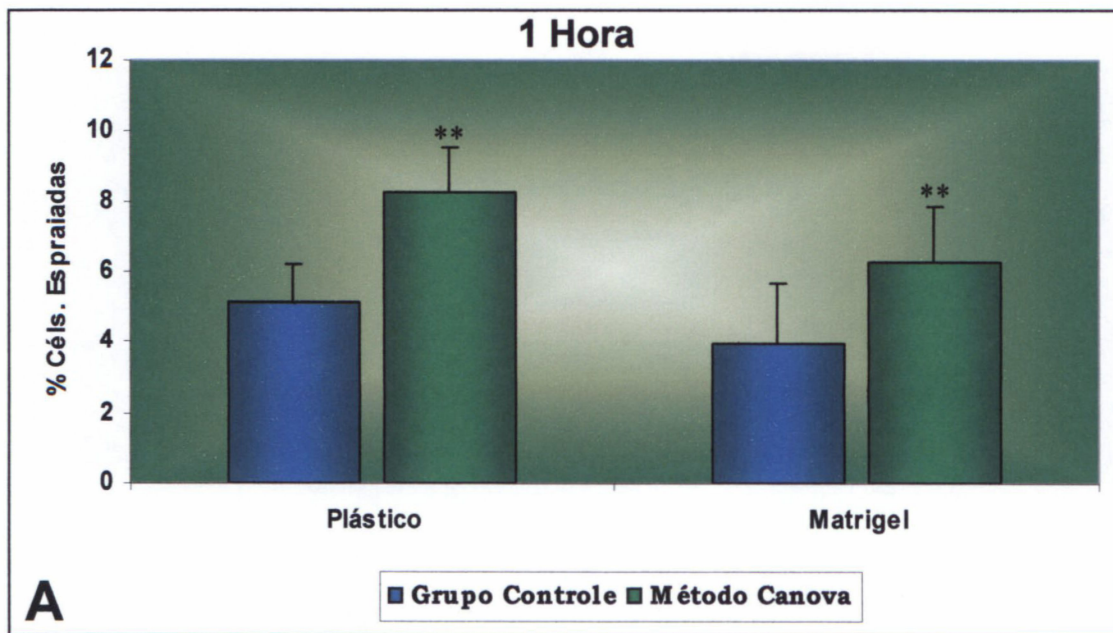
O tratamento com o Método Canova[®] por via subcutânea durante 7 dias promoveu um aumento significativo na capacidade de espraiamento dos macrófagos, tanto para o plástico quanto para o matrigel (Figuras 6 a 8).

Após 1 hora de cultivo, a porcentagem de macrófagos espraiados sobre superfícies plásticas mostrou-se cerca de 61% maior no grupo tratado em relação ao controle. Já para os macrófagos cultivados sobre o matrigel, foi observado um aumento de 58% na taxa de espraiamento em resposta ao tratamento (Figura 6a).

Nos experimentos realizados após 3 horas de cultivo, foram observados resultados semelhantes. Sob essas condições, a taxa de espraiamento dos macrófagos do grupo tratado apresentou um aumento de 56% para as superfícies plásticas e de 50% para as superfícies cobertas com matrigel, quando comparada ao grupo controle (Figura 6b).

Independente do tratamento, a taxa de espraiamento dos macrófagos sobre superfícies plásticas foi significativamente maior do que sobre aquelas recobertas com matrigel, para todos os tempo de incubação (Figura 9).

CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO

**FIGURA 6 - EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO**

Os macrófagos foram submetidos ao tratamento *in vivo* durante 7 dias, plaqueados (3×10^5 células/poço) sobre superfícies plásticas ou recobertas com matrigel ($10 \mu\text{g/ml}$) e incubados durante (A) 1 hora ou (B) 3 horas. A porcentagem de espraioamento foi determinada através de contagem em microscopia de contraste de fase. Os valores estão expressos como média \pm DP de amostras em quadruplicata e são representativos de 2 experimentos distintos. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

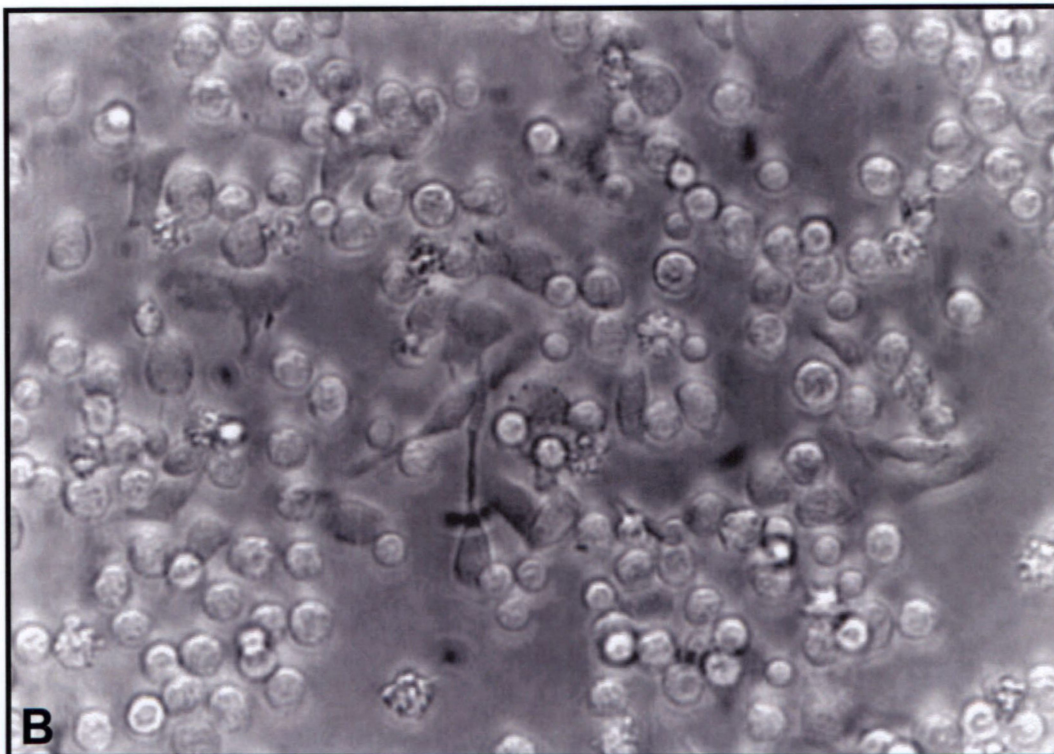
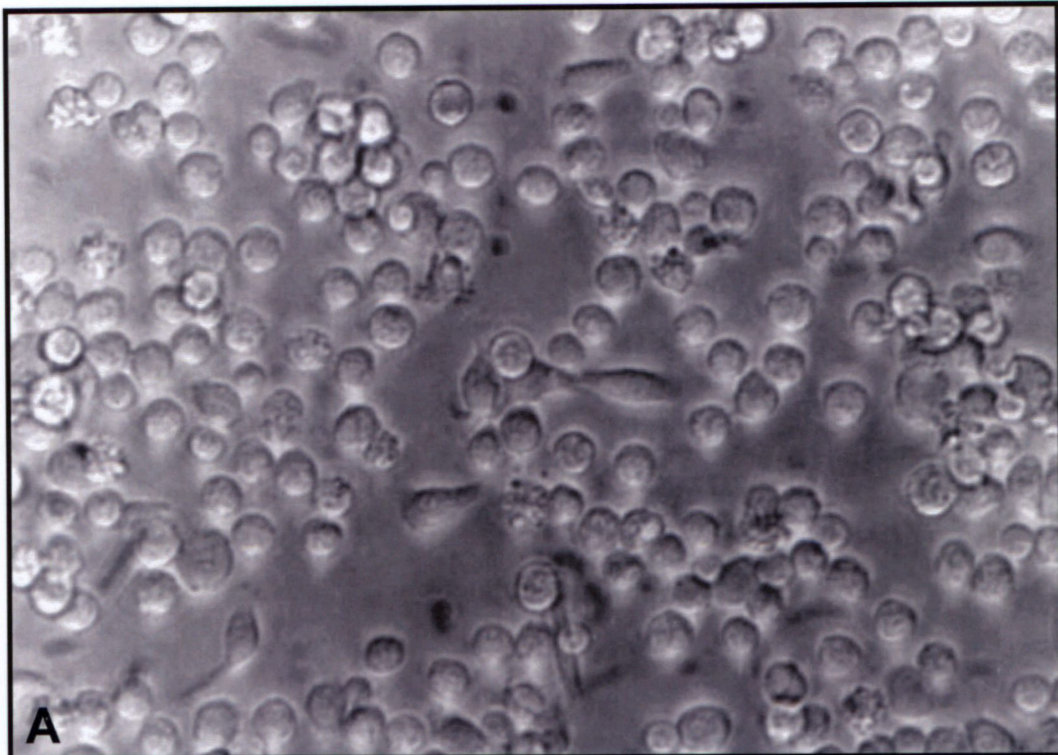


FIGURA 7 - MACRÓFAGOS CULTIVADOS SOBRE PLÁSTICO

Os macrófagos foram submetidos ao tratamento *in vivo* durante 7 dias e plaqueados (3×10^5 células/poço) sobre superfícies plásticas próprias para cultivo celular. As culturas foram fotografadas em microscopia de contraste de fase, após 1 hora de incubação. A, Grupo Controle; B, Método Canova®.

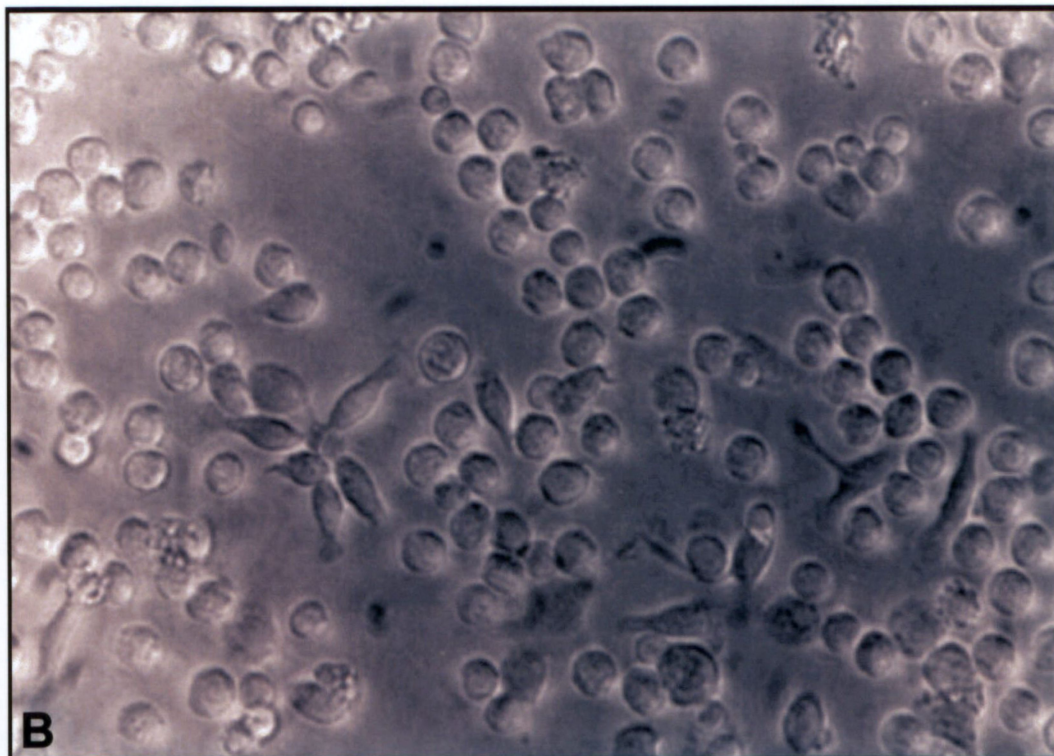
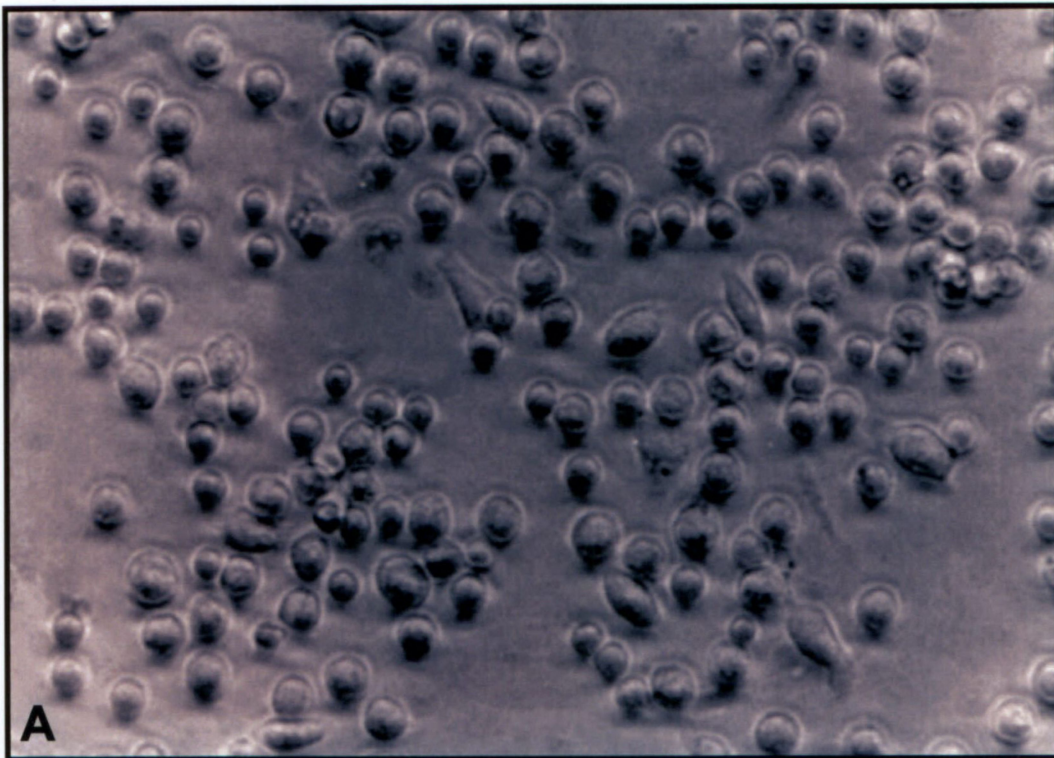
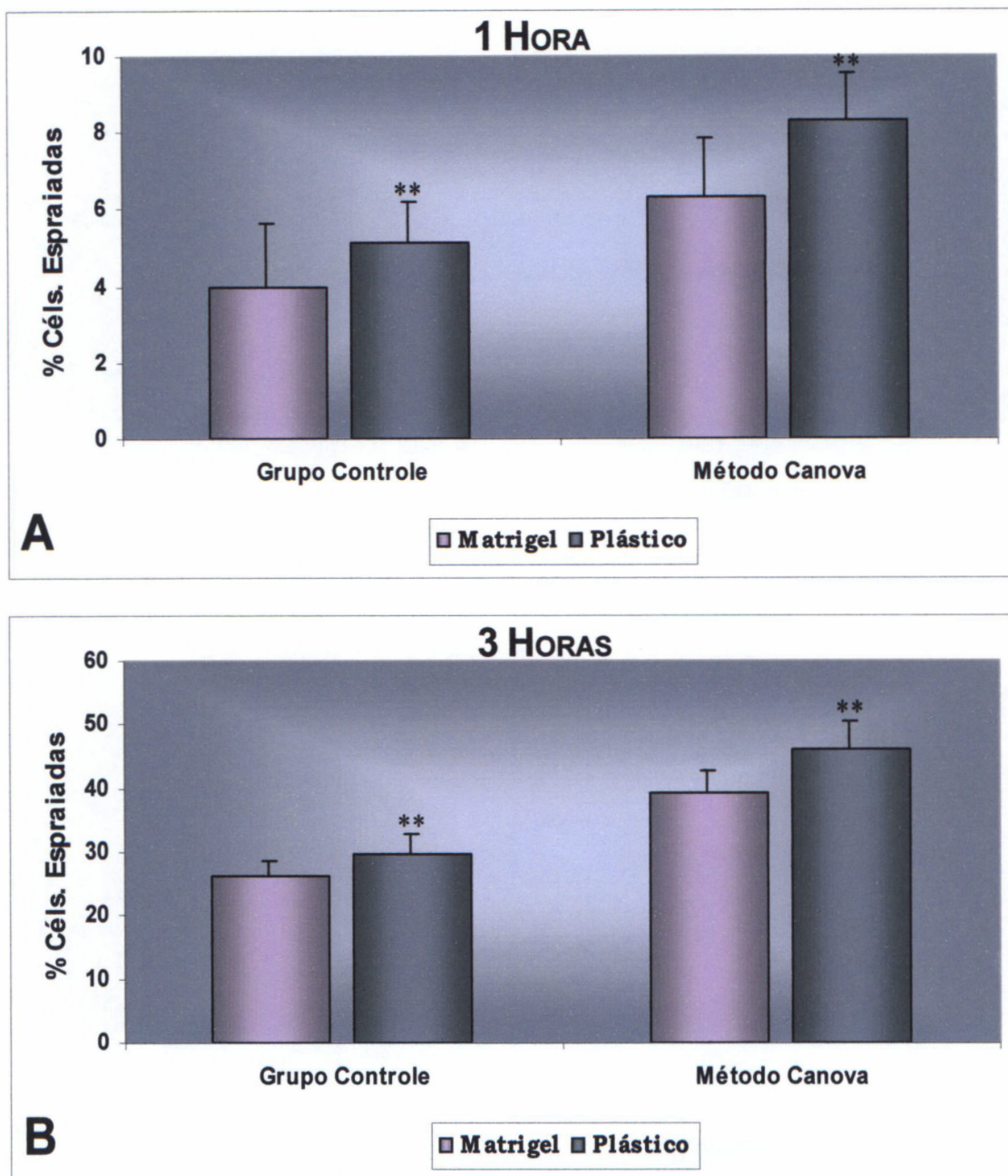


FIGURA 8 - MACRÓFAGOS CULTIVADOS SOBRE MATRIGEL

Os macrófagos foram submetidos ao tratamento *in vivo* durante 7 dias e plaqueados (3×10^5 células/poço) sobre superfícies recobertas com matrigel ($10 \mu\text{g/ml}$). As culturas foram fotografadas em microscopia de contraste de fase, após 1 hora de incubação. **A**, Grupo Controle; **B**, Método Canova®.

ESPRAIAMENTO: PLÁSTICO X MATRIGEL**FIGURA 9 - CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO: PLÁSTICO X MATRIGEL**

Os macrófagos foram submetidos ao tratamento *in vivo* durante 7 dias, plaqueados (3×10^5 células/poço) sobre superfícies plásticas ou recobertas com matrigel ($10 \mu\text{g/ml}$) e incubados durante (A) 1 hora ou (B) 3 horas. A porcentagem de espreado foi determinada através de contagem em microscopia de contraste de fase. Os valores estão expressos como média \pm DP de amostras em quadruplicata e são representativos de 2 experimentos distintos. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

5.5 ATIVIDADE ENDOCÍTICA

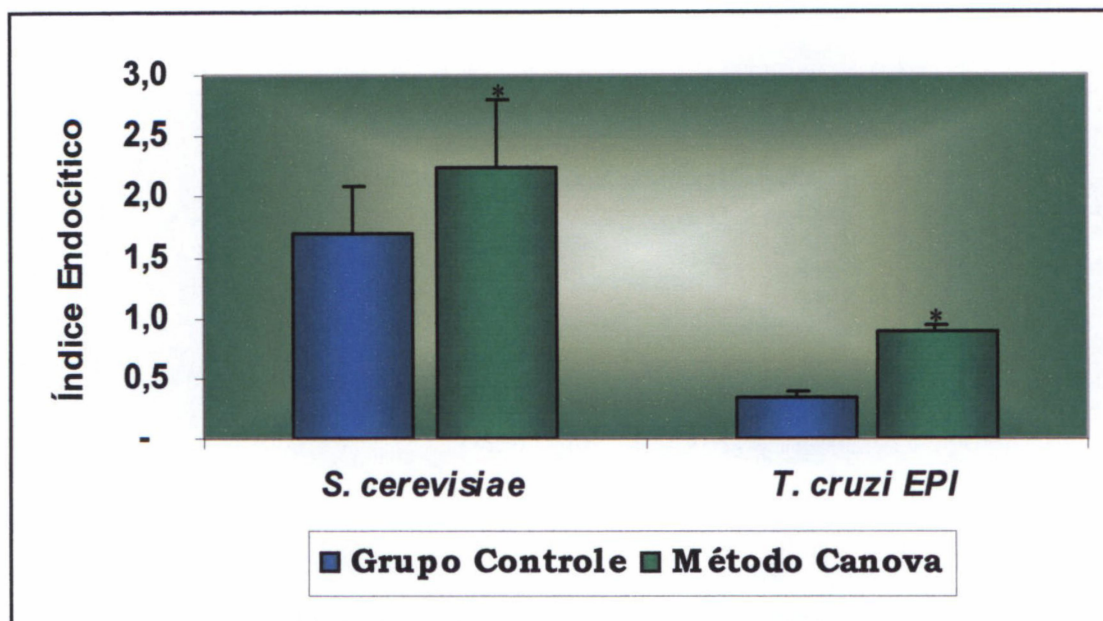
O tratamento com o Método Canova[®] resultou em um aumento significativo da capacidade de fagocitose de ambas as formas não infectivas: leveduras *S. cerevisiae* (36%) e formas epimastigotas de *T. cruzi* (185%) (Figuras 10 a 12).

Já para as formas infectivas, não foram encontradas diferenças significativas, embora tenha sido observada uma leve diminuição na taxa de infecção dos macrófagos do grupo tratado, tanto para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (25%), quanto para as formas promastigotas de *L. amazonensis* (16%) (Figuras 13 a 15).

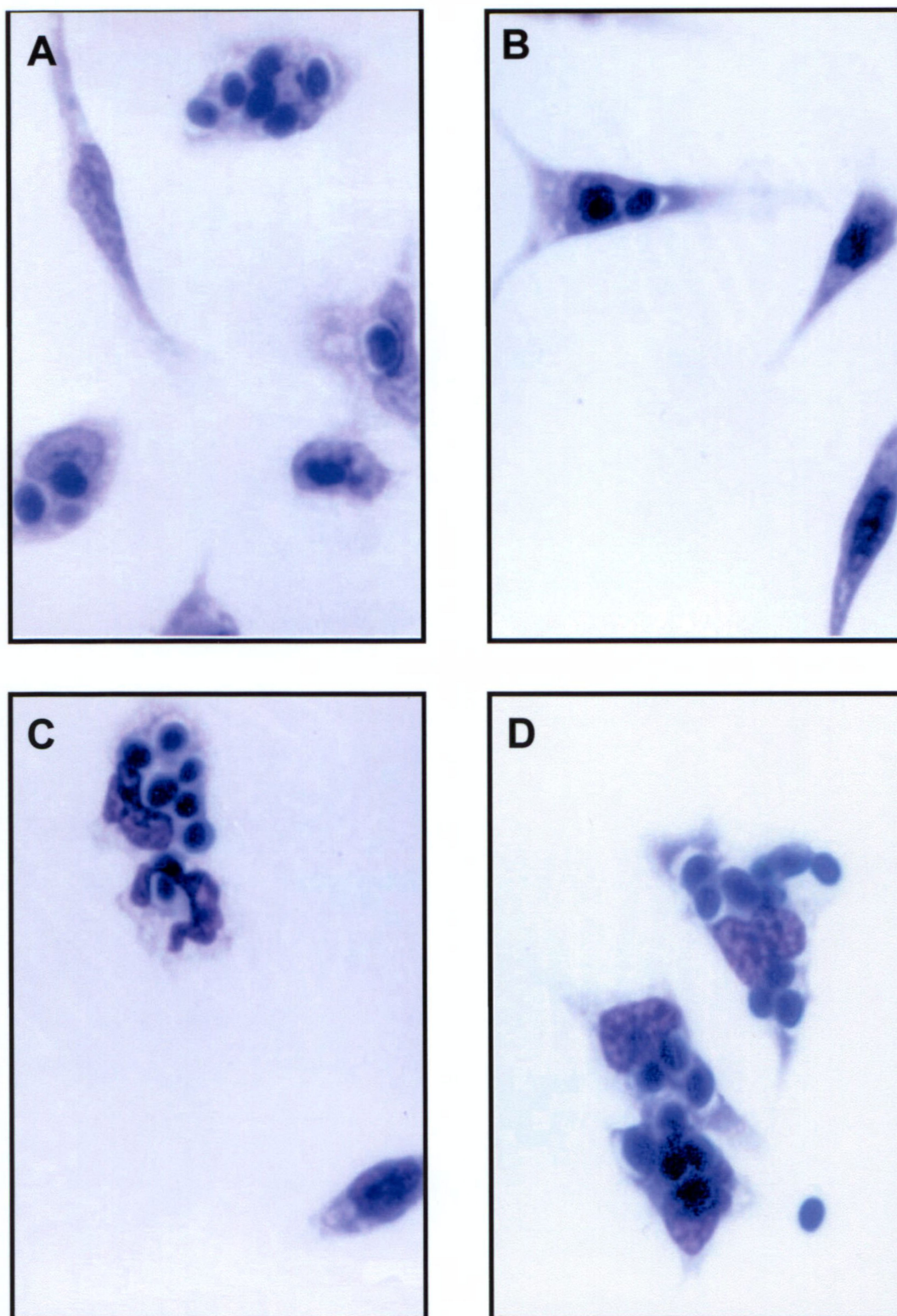
Na Tabela 1, estão representados os valores (média \pm DP) obtidos para cada grupo de tratamento, a partir da interação com os diferentes microrganismos utilizados:

TABELA 1 - ATIVIDADE ENDOCÍTICA APÓS INTERAÇÃO COM MICRORGANISMOS INFECTIVOS E NÃO INFECTIVOS

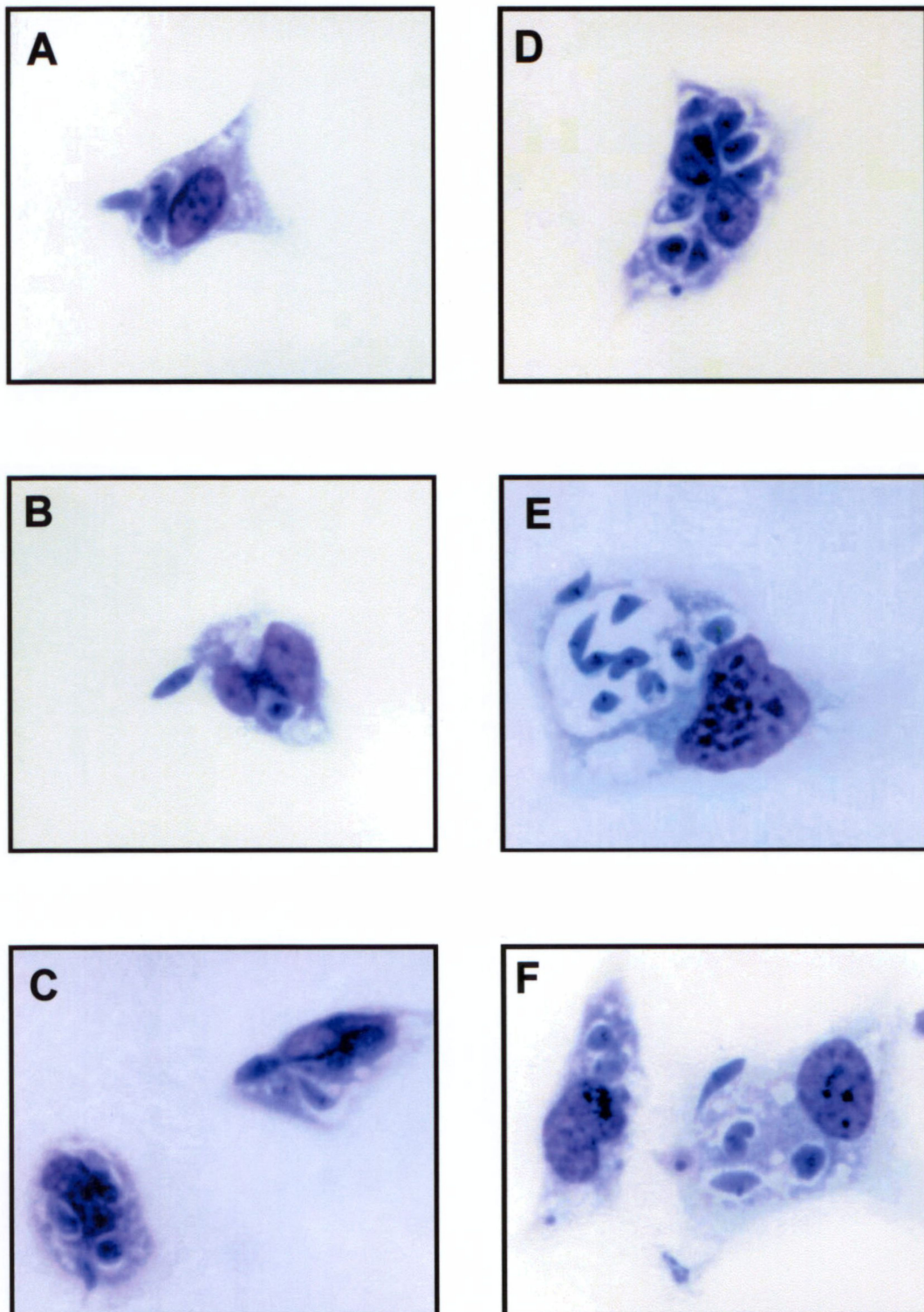
	% macrófagos com microrganismos		nº microrganismos por macrófago		Índice Endocítico	
	Grupo Controle	Método Canova	Grupo Controle	Método Canova	Grupo Controle	Método Canova
<i>S. cerevisiae</i>	68 \pm 15	89 \pm 6,0	2,4 \pm 0,18	2,5 \pm 0,40	163	223
<i>T. cruzi EPI</i>	31 \pm 4,0	46 \pm 3,0	1,1 \pm 0,16	2,1 \pm 0,19	34	97
<i>T. cruzi TRIPO</i>	8,0 \pm 1,0	6,0 \pm 1,0	1,0 \pm 0,01	1,0 \pm 0,1	8	6
<i>L. amazonensis</i>	28 \pm 3,0	27 \pm 2,0	1,33 \pm 0,35	1,15 \pm 0,22	37	31

**ATIVIDADE ENDOCÍTICA
FORMAS NÃO INFECTIVAS****FIGURA 10 - EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A ATIVIDADE ENDOCÍTICA PARA FORMAS NÃO INFECTIVAS**

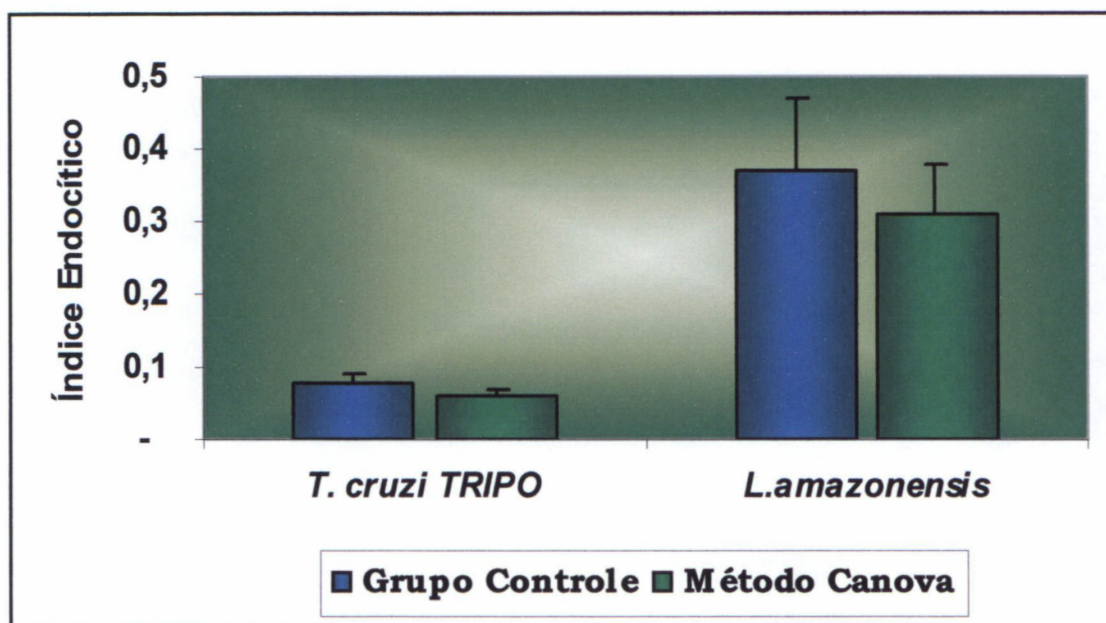
Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro* e cultivados sobre lamínulas na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas, sendo então processados e corados pela técnica de Giemsa. O índice endocítico foi determinado através de contagem com o auxílio de microscópio de luz. Os valores estão expressos como média \pm DP de amostras em triplicata e são representativos de 4 experimentos distintos. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

**FIGURA 11 - FAGOCITOSE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

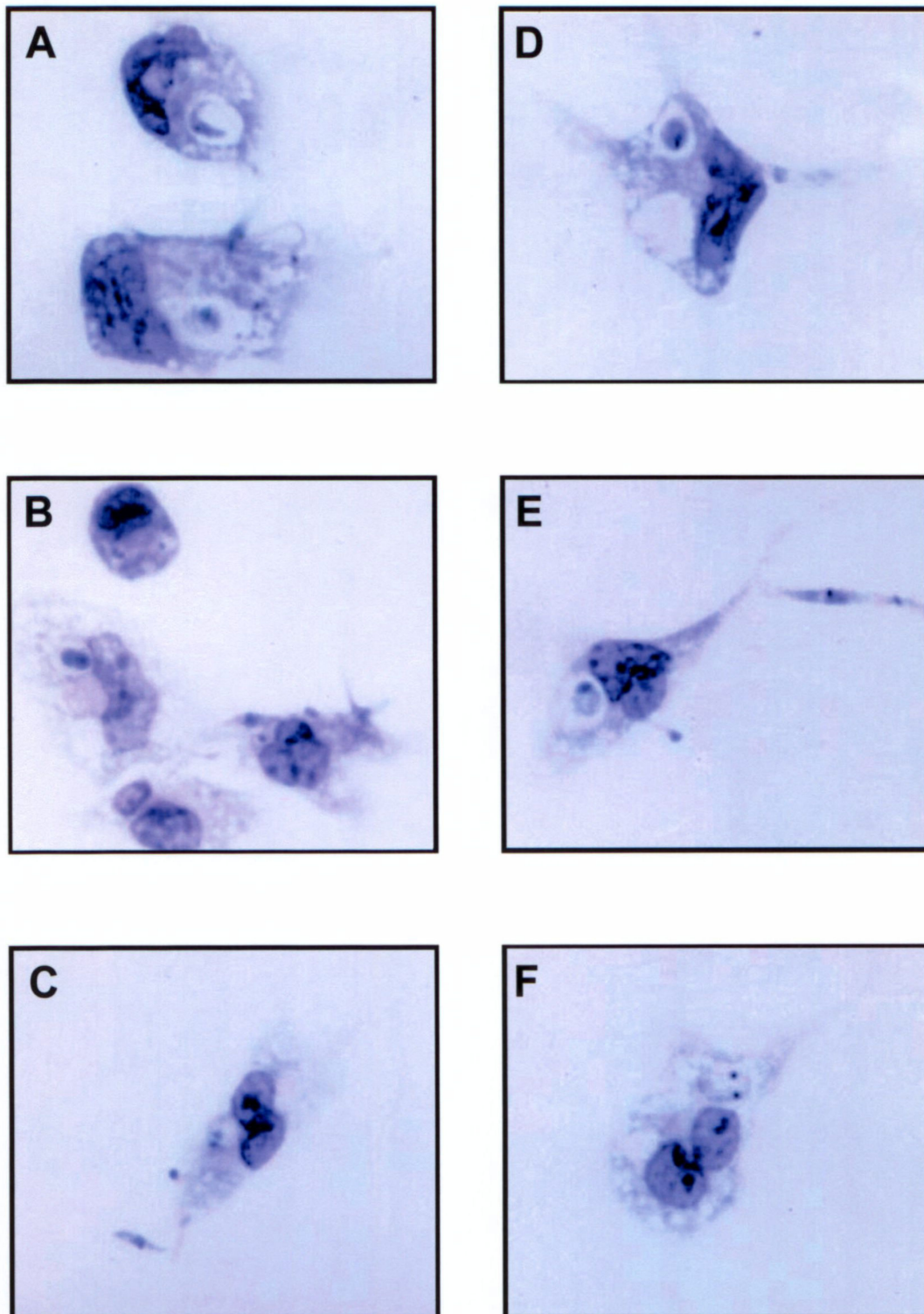
Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*, cultivados na presença das leveduras (10:1) durante 2 horas e processados para microscopia de luz. **A e B**, Grupo Controle; **C e D**, Método Canova®.

**FIGURA 12 - FAGOCITOSE *TRYPANOSOMA CRUZI* EPIMASTIGOTA**

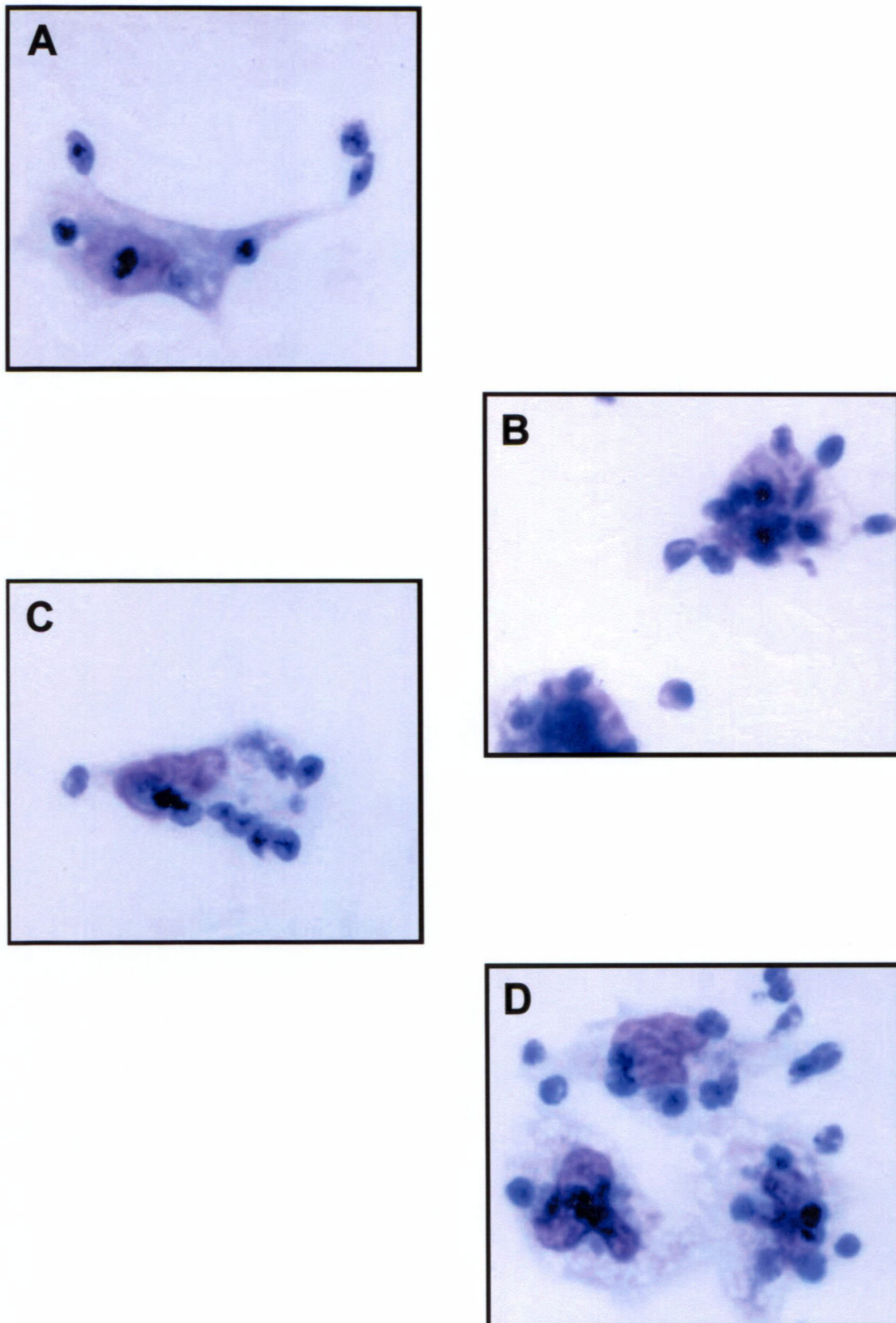
Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*, cultivados na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas e processados para microscopia de luz. A-C, Grupo Controle; D-F, Método Canova®.

**ATIVIDADE ENDOCÍTICA
FORMAS INFECTIVAS****FIGURA 13 - EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A ATIVIDADE ENDOCÍTICA PARA FORMAS INFECTIVAS**

Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro* e cultivados sobre lamínulas na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas, sendo então processados e corados pela técnica de Giemsa. O índice endocítico foi determinado através de contagem com o auxílio de microscópio de luz. Os valores estão expressos como média \pm DP de amostras em triplicata e são representativos de 4 experimentos distintos.

**FIGURA 14 - FAGOCITOSE *TRYPANOSOMA CRUZI* TRIPOMASTIGOTA**

Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*, cultivados na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas e processados para microscopia de luz. **A-C**, Grupo Controle; **D-F**, Método Canova®.

**FIGURA 15 - FAGOCITOSE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* PROMASTIGOTA**

Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*, cultivados na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas e processados para microscopia de luz. **A e B**, Grupo Controle; **C e D**, Método Canova®.

5.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Para a avaliação da produção de óxido nítrico foram utilizados macrófagos cultivados sob condições ideais ou colocados para interagir com diferentes parasitas intracelulares (Figuras 17 a 20).

O tratamento com o Método Canova[®] estimulou a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, na presença ou não de diferentes parasitas intracelulares (Figura 16).

Quando os macrófagos foram cultivados apenas em meio de cultura, sob condições ideais, o tratamento resultou em um aumento de 18% na produção de NO. O perfil observado mostrou-se semelhante após 24 horas (Figura 16a) e 72 horas de cultivo (Figura 16b).

Após 24 horas de interação com os parasitas, a produção de NO nos grupos tratados aumentou cerca de 44% para os *T. cruzi* epimatigotas, 32% para os *T. cruzi* tripomastigotas e 46% para as *L. amazonensis* promastigotas, quando comparada ao grupo controle (Figura 16a). Resultados semelhantes foram observados após 72 horas de interação, embora a amplitude da diferença tenha sido um pouco menor. Nessas condições, foi observado, em resposta ao tratamento, um aumento na produção de NO em torno de 18% para os *T. cruzi* epimastigotas, 5% para os *T. cruzi* tripomastigotas e 32% para as *L. amazonensis* promastigotas (Figura 16b)

Foi observada ainda, a diminuição da produção de NO após a interação com todos os parasitas testados, quando comparada àquela encontrada para os macrófagos cultivados apenas em meio de cultura. O perfil observado mostrou-se semelhante após 24 horas (Figura 16a) e 72 horas de interação (Figura 16b).

PRODUÇÃO ÓXIDO NÍTRICO

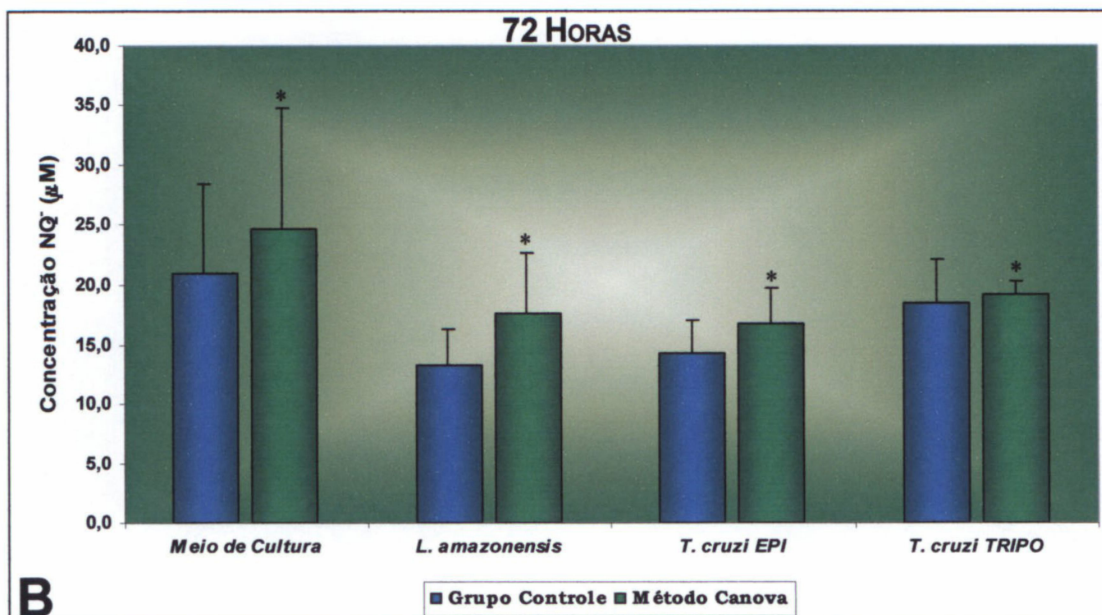
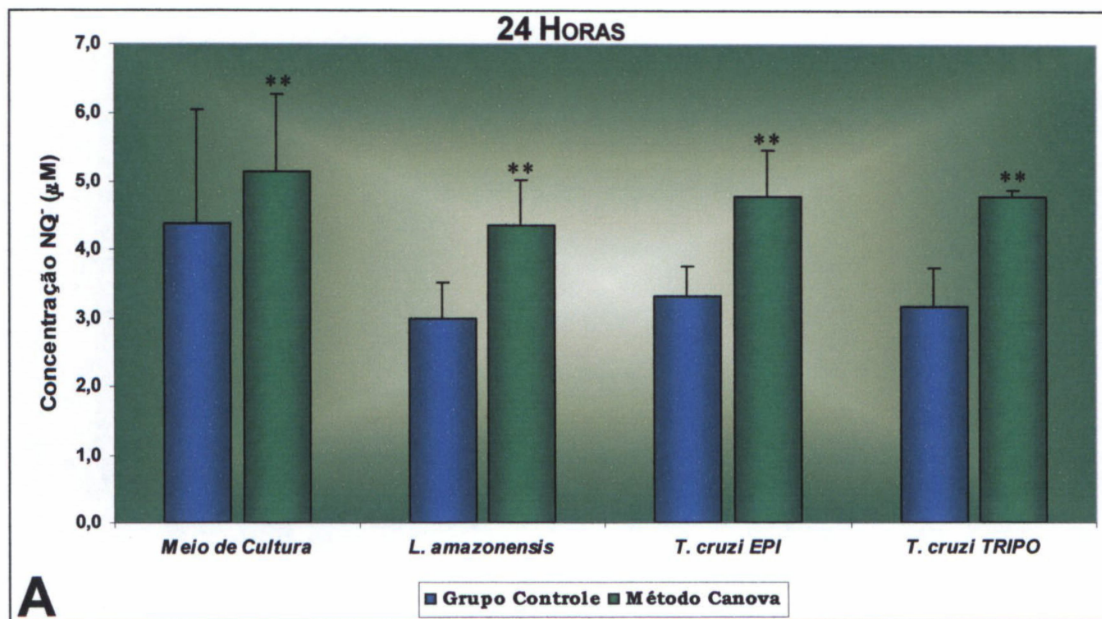


FIGURA 16 - EFEITO DO MÉTODO CANOVA® SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Os macrófagos (5×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro* durante 7 dias e cultivados sob condições ideais ou na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas. A concentração de NO_2^- no sobrenadante das culturas foi determinada com a utilização do reagente de Griess e leitura em 540nm, (A) 24 horas e (B) 72 horas após terminado o período de interação. Os valores estão expressos como média \pm DP de amostras em quadruplicata e são representativos de 3 experimentos distintos.

** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao Grupo Controle.

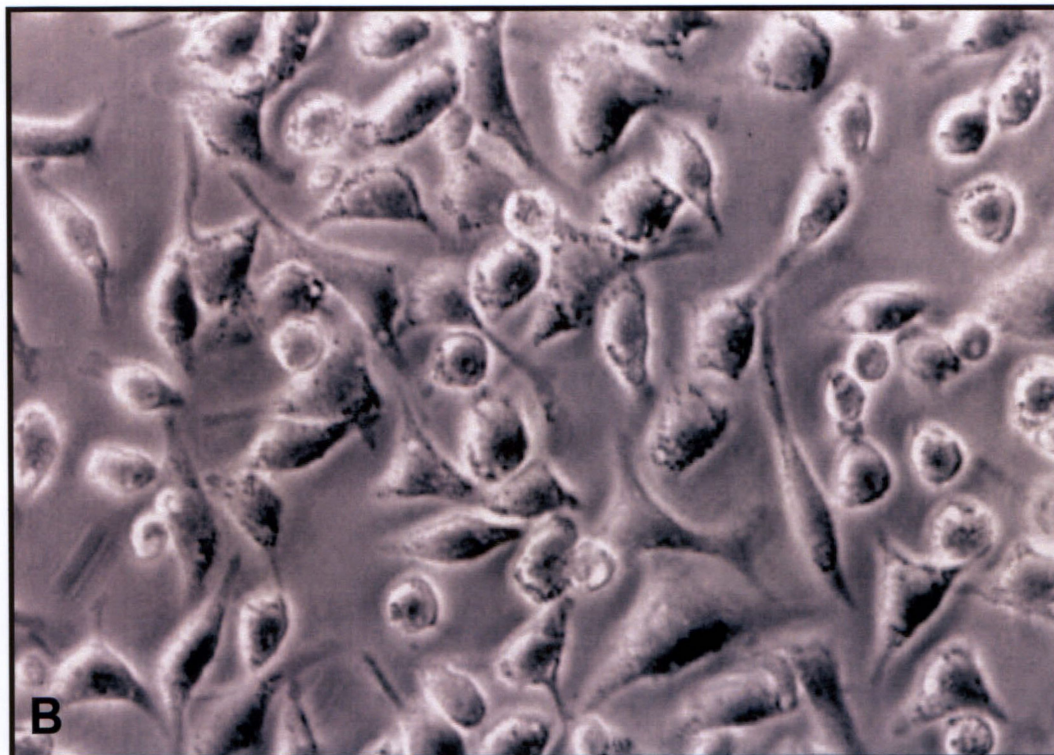
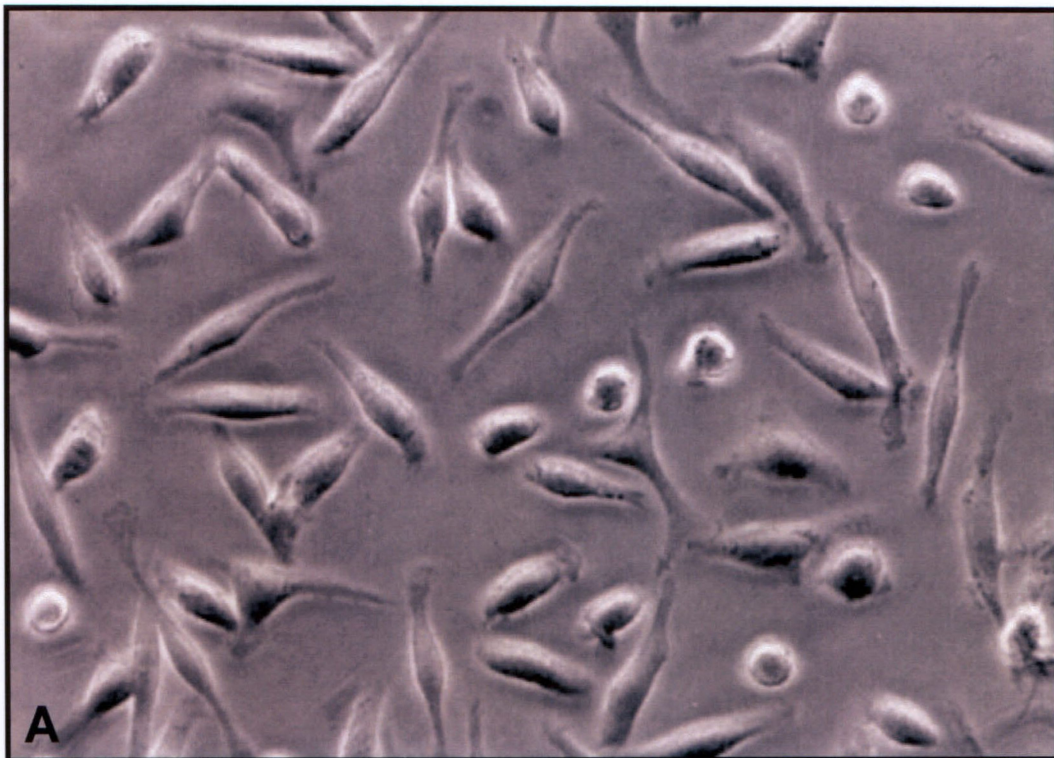


FIGURA 17 - MACRÓFAGOS CULTIVADOS SOB CONDIÇÕES IDEAIS

Os macrófagos (5×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro* e mantidos em cultivo sob condições ideais. As culturas foram fotografadas em microscopia de contraste de fase, após 24 hora de incubação.

A, Grupo Controle; B, Método Canova®.

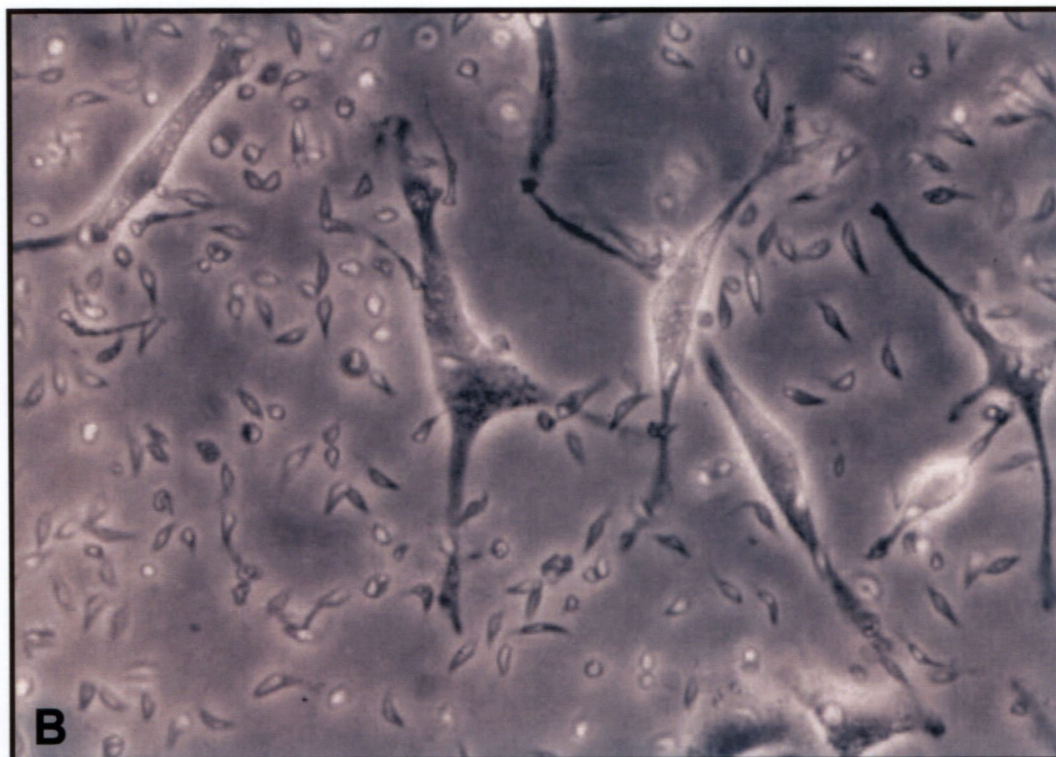
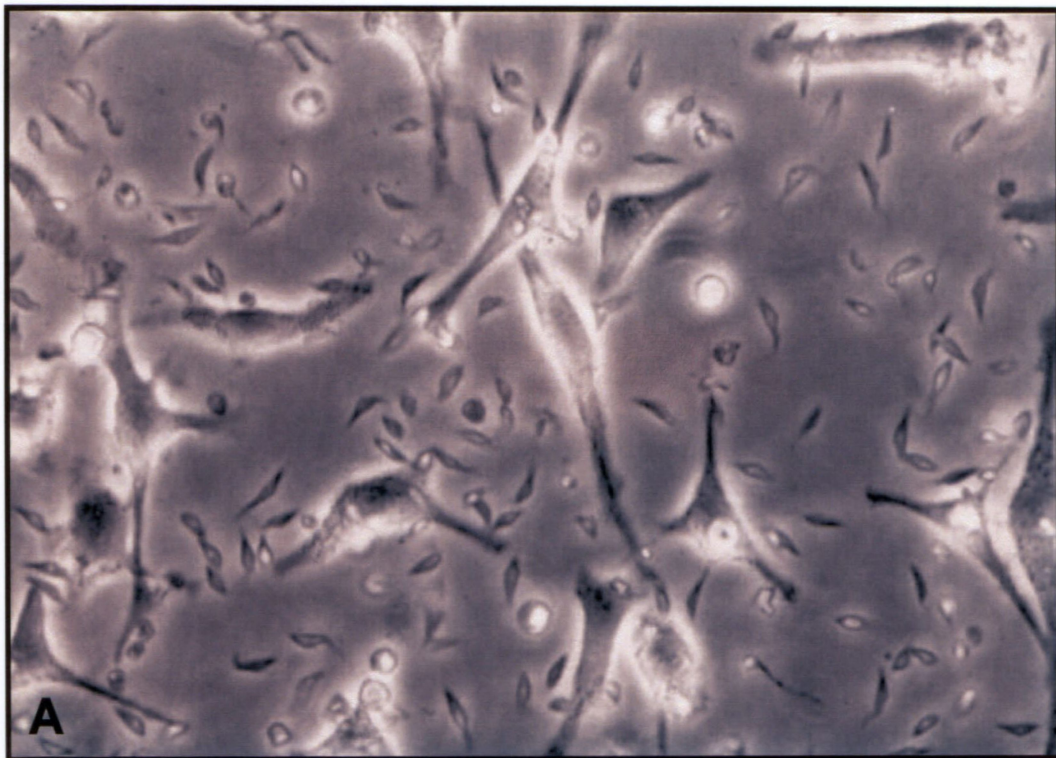


FIGURA 18 - INTERAÇÃO MACRÓFAGOS X *TRYPANOSOMA CRUZI* EPIMASTIGOTA
Os macrófagos (5×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro* e cultivados na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas. As culturas foram fotografadas em microscopia de contraste de fase, durante o período de interação.
A, Grupo Controle; B, Método Canova®.

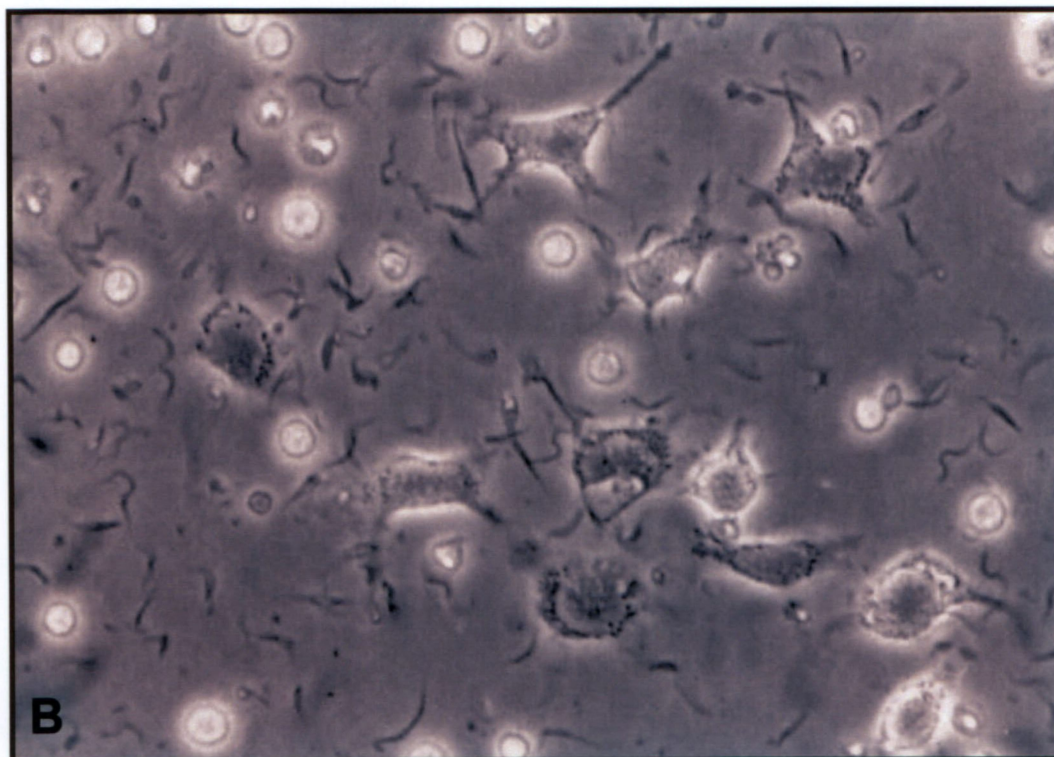
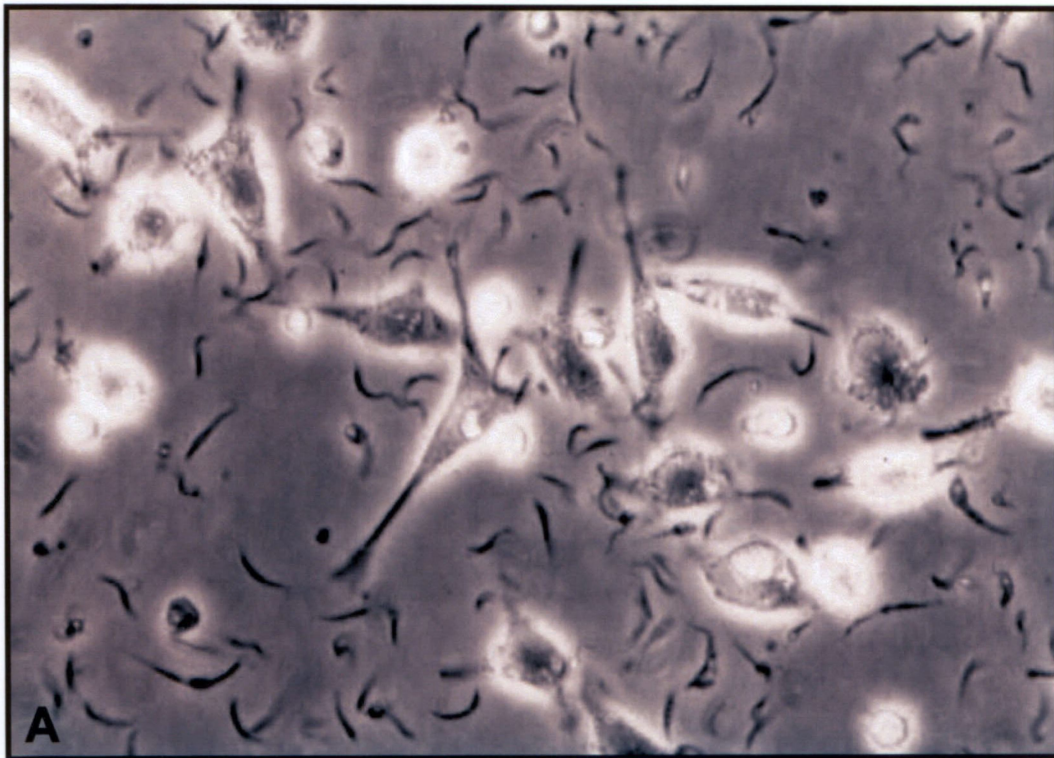


FIGURA 19 - INTERAÇÃO MACRÓFAGOS X *TRYPANOSOMA CRUZI* TRIPOMASTIGOTA
Os macrófagos (5×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro* e cultivados na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas. As culturas foram fotografadas em microscopia de contraste de fase, durante o período de interação. **A**, Grupo Controle; **B**, Método Canova®.

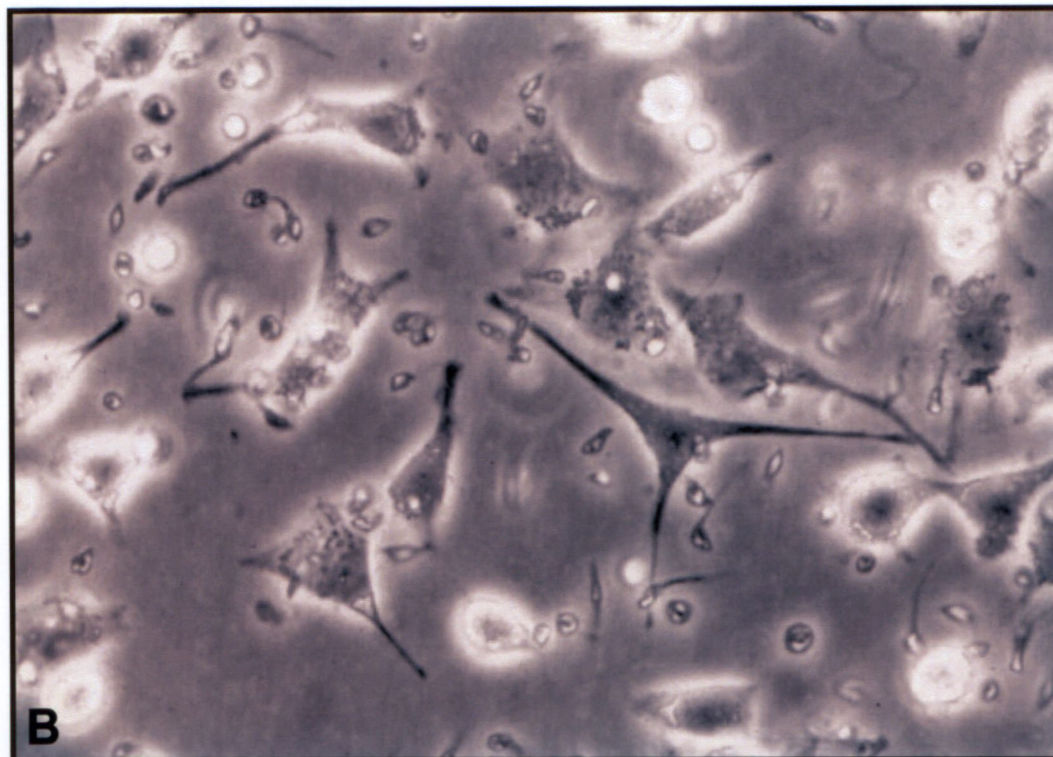
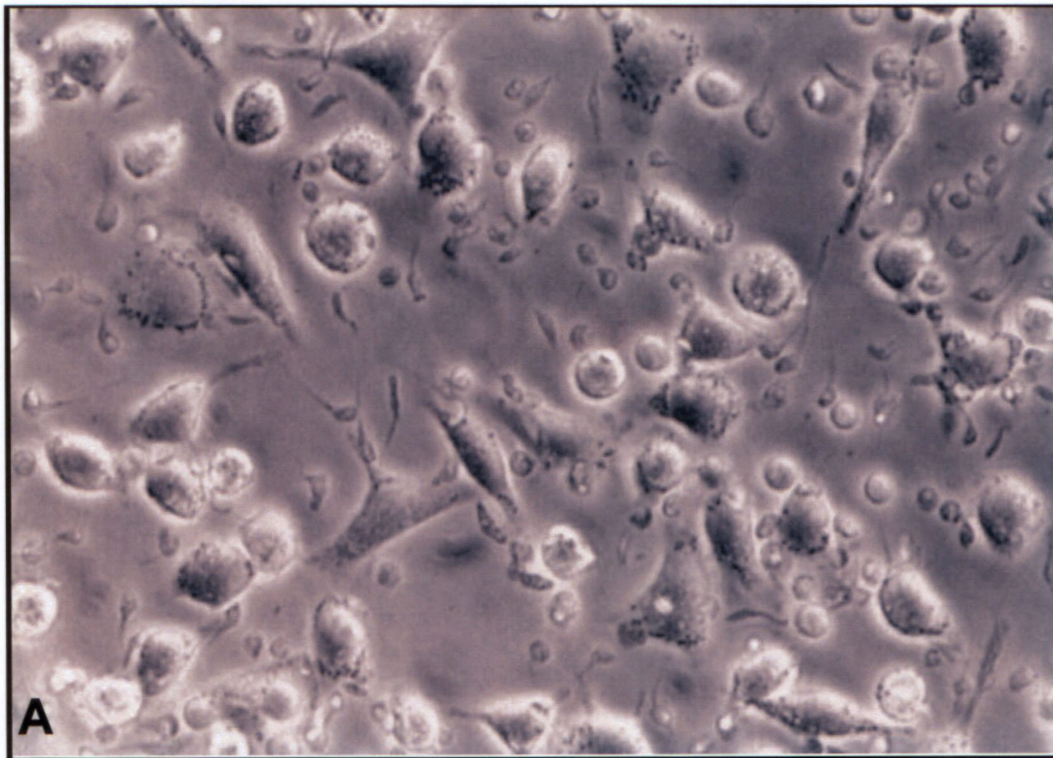


FIGURA 20 - INTERAÇÃO MACRÓFAGOS X *LEISHMANIA AMAZONENSIS* PROMASTIGOTA

Os macrófagos (5×10^5 células/poço) foram submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro* e cultivados na presença dos parasitas (10:1) durante 2 horas. As culturas foram fotografadas em microscopia de contraste de fase, durante o período de interação. **A**, Grupo Controle; **B**, Método Canova®.

6 DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstraram que o Método Canova® atua sobre macrófagos, provocando alterações estruturais que indicam um processo de ativação celular (PIEMONTE e BUCHI, 2001). Esses dados sugerem uma via de atuação do medicamento através dessas células, entretanto, os mecanismos e processos envolvidos nessa via não foram ainda completamente caracterizados. Pensando nesse sentido, o presente trabalho foi desenvolvido para avaliar os efeitos do Método Canova® sobre parâmetros funcionais de macrófagos peritoneais de camundongo, no intuito de ampliar os conhecimentos acerca de seus mecanismos de ação.

Parâmetros como viabilidade celular, mobilização, capacidade de adesão e espraiamento vêm sendo utilizados para avaliar o efeito de diferentes substâncias sobre a funcionalidade de macrófagos (SAMPAIO *et al.*, 2001; HOPPER, 1986). Estudos indicam que substâncias tóxicas ou agressivas, são capazes de provocar um efeito inibitório sobre tais processos, interferindo no desencadeamento da resposta imune e contribuindo para o desenvolvimento de um quadro patológico (SOUSA e SILVA, 1996; KREOFISKY *et al.*, 1990). Por outro lado, moléculas como PMA, LPS e IFN- γ , conhecidas por desencadarem o processo de ativação dos macrófagos, provocam o aumento de sua capacidade de adesão, área de espraiamento e atividade migratória (GORDON, 1995; PHAIRE-WASHINGTON *et al.*, 1980b).

No presente trabalho foram avaliados, primeiramente, os efeitos do medicamento sobre a viabilidade celular e capacidade de mobilização. Para tais experimentos, foi realizado o tratamento *in vivo* com o Método Canova® durante um período de 7 ou 28 dias. A porcentagem de células viáveis, tanto para o grupo tratado, quanto para o grupo controle, manteve-se acima de 95% em todas as amostras analisadas, independente do tempo de tratamento. Da

mesma forma, o número de células peritoneais, embora levemente aumentado nos grupos tratados, não foi significativamente alterado em resposta ao tratamento (Figura 3).

Os resultados descritos até então demonstraram que o medicamento não apresentou efeitos tóxicos ou deletérios sobre os macrófagos, complementando os dados previamente obtidos por SELIGMANN *et al* (2000), onde foi demonstrado que o Método Canova® não apresenta efeitos genotóxicos sobre linfócitos humanos.

Em seguida, foram avaliadas as capacidades de adesão e espraiamento sobre superfícies plásticas e recobertas com matrigel, com a utilização de macrófagos submetidos ao tratamento *in vivo* com o Método Canova® durante um período de 7 dias. O tratamento não acarretou diferenças significativas na capacidade de adesão dos macrófagos sobre ambas as superfícies, embora a taxa de adesão dos grupos tratados tenha sido maior que a dos grupos controle em ambas as condições experimentais, plástico e matrigel, para todos os tempos testados (Figura 4). Em contrapartida, a capacidade de espraiamento foi estimulada de forma considerável em resposta ao tratamento, tanto para superfícies plásticas, quanto para o matrigel (Figuras 6 a 8).

O fenômeno de espraiamento envolve alterações morfológicas e estruturais dos macrófagos. Nesse processo, é descrita a participação de elementos do citoesqueleto, como microtúbulos e microfilamentos. Glicoproteínas presentes na matriz extracelular, como a fibronectina e seus respectivos receptores de membrana, as integrinas, estão igualmente envolvidos (WOJCIAK-STOTHARD *et al.*, 1997). Dessa forma, o aumento na capacidade de espraiamento em resposta ao tratamento com o Método Canova®, observado no presente trabalho, é um indicativo do processo de ativação celular dos macrófagos, podendo ser relacionado com a redistribuição dos filamentos de actina e das integrinas $\alpha_5\beta_1$ na membrana dos macrófagos, demonstrada por PIEMONTE e BUCHI (2001).

Nos experimentos de adesão e espraiamento foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas no comportamento dos macrófagos em relação ao plástico e ao matrigel, independentemente da realização do tratamento. Para um mesmo tempo de incubação, as taxa de adesão e espraiamento sobre as superfícies plásticas foram maiores do que aquelas encontradas para o matrigel (Figuras 5 e 9). Além disso, a análise do perfil de adesão dos macrófagos ao longo do tempo também permitiu observar que, para as superfícies plásticas, a taxa de adesão atingiu um valor máximo por volta de 15 minutos, enquanto que, para aquelas recobertas com matrigel, essa taxa tendeu a aumentar de maneira proporcional ao tempo de incubação (Figura 5).

A adesão das células à moléculas da matriz extracelular é dependente da realização de uma série de interações essas moléculas e receptores presentes na membrana celular. Durante esse processo, as células necessitam, além de possuir receptores específicos para tais moléculas em quantidade suficiente, redistribuí-los ao longo da membrana e reorganizar seu citoesqueleto afim de promover a formação dos contatos focais, o que demanda tempo e energia. Em contrapartida, a adesão à superfícies como vidro ou plástico não tem como fator limitante a presença de receptores específicos para determinadas moléculas, acontecendo, em grande parte, devido a um processo de adsorção celular. Assim, esses fatores, somados ao fato de terem sido usadas superfícies plásticas próprias para cultivo celular, tratadas para propiciar maior adsorção das células, podem ter sido determinantes para as maiores taxas de adesão e espraiamento sobre o plástico em relação ao matrigel, observadas no presente trabalho. Outro ponto a ser considerado é o fato dos macrófagos não apresentarem, na ausência de estímulos específicos, aderência à laminina (MERCURIO e SHAW, 1988; SHAW *et al.*, 1990), uma das principais moléculas constituintes da membrana basal e por conseqüência, do matrigel.

Foi observada, ainda, uma considerável taxa de adesão dos macrófagos à superfícies recobertas com BSA. Esse fato indica que o uso dessa molécula é inadequado em experimentos de adesão realizados com esse tipo celular, o que confirma os resultados já descritos na literatura por MERCURIO e SHAW (1988).

Em continuidade à análise dos parâmetros funcionais já apresentados, foram avaliados os efeitos do Método Canova® sobre a atividade microbicida dos macrófagos. Para tanto, foram realizados ensaios de fagocitose e mensuração da produção de óxido nítrico, a partir da interação de macrófagos submetidos ao tratamento *in vivo* e *in vitro*, com formas infectivas e não infectivas de diferentes microrganismos.

Microrganismos extracelulares e formas não infectivas de parasitas intracelulares são reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos, sendo destruídos de maneira eficiente através de diferentes mecanismos microbicidas. Entretanto, formas infectivas de parasitas intracelulares podem apresentar um papel ativo na infecção da célula hospedeira, ganhando acesso aos macrófagos através de mecanismos fagocíticos e não fagocíticos. Além disso, esses parasitas desenvolveram a capacidade de evadir os mecanismos de defesa das células hospedeiras, podendo sobreviver e se multiplicar no interior das mesmas e dificultando, dessa forma, o controle da infecção (CARVALHO *et al.*, 1999; HALL e JOINER, 1991).

A capacidade de fagocitose dos macrófagos tratados com o Método Canova® aumentou significativamente para ambas as formas não infectivas, leveduras *S. cerevisiae* e de *T. cruzi* epimastigota (Figuras 10 a 12). Já para as formas infectivas dos parasitas, *T. cruzi* tripomastigota e *L. amazonensis* promastigota, o índice endocítico não foi alterado de maneira significativa em resposta ao tratamento, embora tenha sido observada uma leve diminuição da taxa de infecção dos macrófagos do grupo tratado (Figuras 13 a 15).

O fenômeno de fagocitose está intimamente relacionado ao de espraiamento celular, uma vez que esse é um passo importante para a interação da célula fagocitária com a partícula a ser fagocitada. Assim, várias substâncias capazes de interferir com o espraiamento, influenciam igualmente o processo de fagocitose (KREOFISKY *et al.*, 1990; RABINOVITCH, 1975). Drogas que bloqueiam a polimerização de microfilamentos, tais como a citocalasina B, são capazes de inibir o espraiamento e a fagocitose mediada por receptores Fc (SWANSON e BAER, 1995). Em contrapartida, o tratamento dos macrófagos com PMA estimula a polimerização de microtúbulos e a redistribuição de lisossomos (PHAIRE-WASHINGTON *et al.*, 1980a), além de provocar o aumento da capacidade de espraiamento e atividade endocítica dos mesmos (PHAIRE-WASHINGTON *et al.*, 1980b). Dessa forma, o aumento na capacidade de espraiamento em resposta ao tratamento, descrito anteriormente, pode estar atuando como um fator determinante para o incremento da fagocitose de microrganismos não infectivos pelos macrófagos tratados.

Durante o processo de fagocitose pelos macrófagos a produção de metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio é estimulada, sendo que esses metabólitos variam em quantidade conforme o estágio de ativação dessas células (JOHNSTON, 1981). Assim, macrófagos residentes provêm um habitat seguro para parasitas intracelulares que desenvolveram a habilidade de evadir aos mecanismos de ataque, enquanto que macrófagos ativados são capazes de destruir esses organismos de maneira eficiente a partir da produção de uma variedade de mediadores (LIEW e COX, 1991). Dentre esses mediadores, o óxido nítrico é uma das principais moléculas efetoras na defesa de macrófagos contra parasitas intracelulares, sendo sua produção considerada uma característica típica de macrófagos ativados (NIBBERING *et al.*, 1991; DING *et al.*, 1988; STUEHR e MARLETTA, 1987).

O NO é capaz de atuar diretamente sobre os parasitas, provocando efeitos tóxicos e inibitórios sobre diversos processos celulares, como crescimento e multiplicação (ADHUNA *et al.*, 2000; BOURGUINON, *et al.*, 1997). A capacidade de provocar inibição na produção de óxido nítrico vem sendo demonstrada para diversos parasitas intracelulares, tais como *Leishmania* spp (LIEW *et al.*, 1997), *Toxoplasma gondii* (SEABRA *et al.*, *in press*) e *T. cruzi* (PAKIANATHAN, 1994; FABRINO, 2001). Esse fenômeno pode atuar como um mecanismo de defesa dos parasitas em questão, auxiliando na sua sobrevivência dentro da célula hospedeira.

Em resposta ao tratamento, foi observado um incremento na produção de NO por macrófagos cultivados apenas em meio de cultura. A produção de NO pelos macrófagos do grupo controle na presença dos diferentes parasitas testados, mostrou-se diminuída em relação àqueles cultivados na ausência dos mesmos. Já para os grupos tratados com o Método Canova[®], essa diminuição não foi observada. O medicamento estimulou a produção de óxido nítrico pelos macrófagos durante a infecção experimental com *L. amazonensis* e *T. cruzi*, revertendo o efeito inibitório dos parasitas (Figura 16).

PIEMONTE e BUCHI (2001), através da avaliação de critérios morfológicos e estruturais, sugeriram que o Método Canova[®] provocava a ativação de macrófagos. O aumento na produção de óxido nítrico em resposta ao tratamento, observada no presente estudo, fornece evidências bioquímicas que confirmam a atuação do medicamento como um agente ativador dessas células. É importante salientar que, apesar desse aumento, os níveis de produção de NO não chegaram a atingir valores muito elevados em relação aos valores basais, não provocando, portanto efeitos tóxicos ou agressivos para os próprios macrófagos.

Assim, os resultados presentemente obtidos com o Método Canova[®], além de demonstrarem que o medicamento não apresentou efeitos tóxicos ou deletérios sobre os macrófagos, indicaram também um processo estimulatório dos mesmos em resposta ao tratamento. Tais resultados corroboram os estudos previamente obtidos e somam-se aos relatos clínicos de médicos e pacientes, demonstrando que o Método Canova[®] atua como um medicamento imunomodulador, tendo como um dos seus mecanismos de ação a ativação de macrófagos, sem produzir, no entanto, os efeitos colaterais experimentados por muitos tratamentos convencionais.

7 CONCLUSÕES

- ➔ A viabilidade das células presentes na cavidade peritoneal de camundongos não é afetada pelo tratamento com o Método Canova®;
- ➔ O Método Canova® não provoca alterações significativas sobre a mobilização celular para a cavidade peritoneal dos camundongos, embora tenha sido observado um leve aumento no número de células peritoneais dos animais tratados;
- ➔ A capacidade de adesão sobre superfícies plásticas e recobertas com matrigel não é alterada significativamente em resposta ao tratamento com o Método Canova®, embora a taxa de adesão dos grupos tratados tenha sido maior para ambas as condições experimentais;
- ➔ Para um mesmo tempo de incubação, a taxa de adesão ao plástico é maior que aquela observada para o matrigel, tanto para os macrófagos tratados com o Método Canova®, quanto para aqueles do Grupo Controle;
- ➔ O perfil de adesão dos macrófagos ao longo do tempo, difere entre o plástico e o matrigel. Para as superfícies plásticas, a taxa de adesão atinge um valor máximo por volta de 15 minutos, enquanto que para aquelas recobertas com matrigel, essa taxa tende a aumentar de maneira proporcional ao tempo de incubação;
- ➔ Os macrófagos são capazes de aderir a superfícies recobertas com BSA;
- ➔ O tratamento com o Método Canova® promove o aumento da capacidade de espraiamento dos macrófagos sobre superfícies plásticas e recobertas com matrigel;
- ➔ Para um mesmo tempo de incubação, a porcentagem de células espraiadas sobre o plástico é maior que aquela observada para o matrigel, tanto para os macrófagos tratados com o Método Canova®, quanto para aqueles do Grupo Controle;

- ➔ O Método Canova® promove o aumento da capacidade de fagocitose de leveduras *S. cerevisiae* e formas epimastigotas de *T. cruzi* ;
- ➔ A taxa de infecção dos macrófagos por formas tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. amazonensis* não é alterada de maneira significativa após o tratamento com o Método Canova®, embora apresente-se ligeiramente diminuída nos grupos tratados;
- ➔ A produção de NO diminui na presença de *T. cruzi* e *L. amazonensis*, quando comparada àquela encontrada para os macrófagos cultivados na ausência de parasitas.
- ➔ O Método Canova® estimula a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, na presença ou não de diferentes parasitas intracelulares, evidenciando um processo de ativação celular.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.O. and HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984.
- ADAMS, L. B.; HIBBS JR, J. B.; TAINTOR, R. R. and KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 144, p. 2725-2729, 1990.
- ADAMS, D.O. and HAMILTON, T.A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: **The natural Immune System: The macrophage**. Eds C. E. Lewis & J.O.D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p. 75-105, 1992.
- ADHUNA, A.; SALTORA, P. and BHATNAGAR, R. Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*. **Immunol. Lett.**, v. 71, p. 171-176, 2000.
- ARAKI, N.; JOHNSON, M. T. and SWANSON, J. A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 135, p. 1249-1260, 1996.
- AUGER, M. J. and ROSS, J. A. The biology of the macrophages. In: **The natural immune system: The macrophage**. Eds. C.E. Lewis e J. O'D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p. 1-57, 1992.
- BAROLLO, C. R. **Aos que se tratam pela Homeopatia**. 7ª ed., São Paulo, Typus ed., 1995.
- BERON, W.; ALVAREZ-DOMINGUEZ, C.; MAYORGA, L. and STAHL, D. P. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 100-104, 1995.
- BIANCHI, M.; SACERDOTE, P. and PANERAI, A.E. Cytokines and cognitive function in mice. **Biol. Signals Receptors**, v. 7, n. 1, p. 45-54, 1998.
- BOGDAN, C. and ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 121-134, 1998.
- BOURGUIGNON, S. C.; ALVES, C. R. and GIOVANNI-DE-SIMONE, S. Detrimental effect of nitric oxide on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* like cells. **Acta Tropica**, v. 66, p. 109-118, 1997.

- BUCHI, D.F. and DE 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.
- BUCHI, D. F. and DE SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Struc. Funct.**, v. 18, p. 399-407, 1993.
- BUCHI, D.F.; SOUTO-PADRON, T.C.B.S. and DE SOUZA, W. Internalization of lectin-binding sites during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **Biocell**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 1993.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.
- CAO, H.; WOLFF, R.G.; MELTZER, M.S. and CRAWFORD, R.M. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN- γ and IL-4. **J. Immunol.**, v. 143, n. 11, p. 3524-3531, 1989.
- CARVALHO, L. and DE SOUZA, W. Internalization of surface anionic sites and phagosome-lysosome fusion during interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 51, p. 211-219, 1990.
- CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W. and COIMBRA, E. S. Internalization of components of the host cell plasma membrane during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, suppl. 1, p. 143-147, 1999.
- CHEN, Q.; LIN, T. H.; DER, C. J. and JULIANO, R. L. Integrin-mediated activation of MEK and mitogen-activated protein kinase is independent of RAS. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 18122, 1996.
- COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy and future. **J Immunol.**, v. 121, p. 813-816, 1978.
- CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. S. and GOLDENBERG, S. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 123-133, 1988.
- DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; MANHÃES, L. and DE SOUZA, W. Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages. **Parasitol. Res.**, v. 86, p. 239-243, 2000.

- DEBRICK, J.E.; CAMPBELL, P.A. and STAERZ, U.D. Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses. **J. Immunol.**, v. 147, n. 9, p. 2846-2851, 1991.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F. and STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.
- ERWIG, L.P.; KLUTH, D.C. and REES, A.J. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J. Immunol.**, v. 161, n. 4, p. 1983-1998, 1998.
- FABRINO, D. L.; PARREIRA, G. G.; LEON, L. L. and MELO, R. C. N. Peripheral blood monocytes: nitric oxide evaluations and ultrastructure during the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. In: XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise - SBMM, Águas de Lindóia, São Paulo, 2001.
- EZEKOWITZ, R. A.B. and STAHL, P. D. The structure and function of vertebrate mannose lectin-like proteins. **J. Cell Sci.**, v. 9, p. 121-133, 1988.
- GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L. and SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.
- GOODMAN, M.G.; CHENOWETH, D.E. and WEIGLE, W.D. Induction of interleukin 1 secretion and enhancement of humoral immunity by binding of human C5a to macrophage surface C5a receptors. **J. Exp.**, v. 156, p. 912, 1982.
- GORDON, S.; PERRY, V.H.; RABINOWITZ, S.; CHUNG, L.P. and ROSEN, H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **J. Cell. Sci.**, suppl. 9, p. 1-26, 1988.
- GORDON, S. Biology of the macrophages. **J Cell Sci.**, v. 4, p. 267-286, 1986.
- GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**, v. 17, p. 977-986, 1995.
- GORDON, S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. **Immunol. Lett.**, v. 65, p. 1-2, 5-8, 1999.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS JR, J. B. and NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, v. 144, p. 278-283, 1990.

- GREENBERG, S. Signal transduction of phagocytosis. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 93-99, 1995.
- HALL, B. F. and JOINER, K. A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. **Imunol. Today**, v. 12, p. A22-A27, 1991.
- HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial interactions. **Blood**, v. 65, p. 513-525, 1985.
- HOOPER, K.E. Kinetics of macrophage recruitment and turnover in peritoneal inflammatory exudates induced by *Salmonella* or thioglycolate broth. **J. Leukocyte Biol.**, v. 39, p. 435-446, 1986.
- HYNES, R. O. Integrin: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11, 1992.
- JOHNSTON, R. B. Enhancement of phagocytoses-associated oxidase metabolism as a manifestation of macrophage activation. **Lymphokines**, v. 3, p. 33-56, 1981.
- JORENS, P.G.; MATTHYS, K.E. and BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators of inflammation**, v. 4, p. 75-89. 1995.
- KAPLAN, B. Homeopathy: What is it? **Prof. Care Mother Child**, v. 4, n. 5, p. 151-152, 1994.
- KOHN, F.R. and KLINGEMANN, H.G. Regulation of fibronectin receptor ($\alpha_5\beta_1$) mRNA expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages by activation/differentiation signals. **Exp. Hematol.**, v. 19, p. 653-658, 1991.
- KREOFKY, T. J.; RUSSEL, J. A. and ROHRBACH, M. S. Inhibition of alveolar macrophage spreading and phagocytosis by cotton bract tannin. **Am. J. Phatol.**, v. 137, p. 263-274, 1990.
- KWON, N. S.; NATHAN, C. F.; GILKER, C.; GRIFFTH, O. W.; MATTHEWS, D. E. and STUEHR, D. J. L-citruline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 13442-13445, 1990.
- LAOUAR, L. A.; COLART, F. R.; CHUBB, C. B. H.; XIE, B. and HUBERMAN, E. Interaction between $\alpha_5\beta_1$ integrin and secreted fibronectin is involved in macrophage differentiation of human HL-60 myeloid leukemia cells. **J. Immunol.**, v. 162, p. 407-414, 1999.
- LEONE, A. M.; PALMER, R. M.; KNOWLES, R. G.; FRANCIS, P. L.; ASHTON, D. S. and MONCADA, S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 23790-23795, 1991.

- LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. J. and MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol**, v. 144, p. 4794-4797, 1990.
- LIEW, F. Y. and COX, F. E. G. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol. Today**, v. 12, p. A17-A21, 1991.
- LIEW, F. Y.; WEI, X. and PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 352, p. 1311-1315, 1997.
- LIN, T. H.; YUROCHKO, A.; KOMBERG, L.; MORRIS, J.; WALKER, J.; HASKILL, S. and JULIANO, R. L. The role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes. **J. Cell Biol.**, v. 126, p. 1585, 1994.
- LIN, T. H.; ROSALES, C.; MONDAL, K.; BOLEN, J. B.; HASKILL, S. and JULIANO, R. L. Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells: a possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 16189, 1995.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12231-12234, 1993.
- MERCURIO, A. M. and SHAW, L. M. Macrophage interactions with laminin: PMA selectively induces adherence and spreading of mouse macrophages on laminin substratum. **J. Cell Biol.**, v. 107, p. 1873-1880, 1988.
- METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. **J. Cell Physiol.**, v. 77, p. 277-280, 1971.
- METCHNIKOFF, E. *Apud* AUGER e ROSS, 1992.
- MIAO, J. Y.; ARAKI, S.; KAJI, K. and HAYASHI, H. Integrin β_4 is involved in apoptotic signal transduction in endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 233, p. 182, 1997.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A. and FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* throughout a nitric oxide-dependent mechanism. **Eu. J. Immunol.**, v. 22, p. 301-307, 1992.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p.319-326, 1987.
- NATHAN, C. and XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tools and controls. **Cell**, v. 78, p. 915-918, 1994.

- NELSON, D.J. and JOW, F. Whole-cell currents in macrophage: Human monocytes-derived macrophages. **J. Membr. Biol.**, v. 117, p. 29-44, 1990.
- NEVEU, P.J. The mononuclear phagocyte system. **Bull. Inst. Pasteur**, v. 84, p. 24-66, 1986.
- PAKIANATHAN, D. R. and KUHN, R. E. *Trypanosoma cruzi* affects nitric oxide production by murine peritoneal macrophages. **J. Parasitol.**, v. 80. N. 3, p. 432-437, 1994.
- PALMER, R. M.; ASTHON, D. S. and MONCADA, S., Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.
- PHAIRE-WASHINGTON, L.; WANG, E. and SILVERSTEIN, S. C. Phorbol myristate acetate stimulates pinocytosis and membrane spreading in mouse peritoneal macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 86, p. 634-640, 1980a.
- PHAIRE-WASHINGTON, L.; SILVERSTEIN, S. C. and WANG, E. Phorbol myristate acetate stimulates microtubule and 10-nm filament extension and lysosome redistribution in mouse macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 86, p. 641-655, 1980b.
- PIEMONTE, M. R. Alterações estruturais em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com o Método Canova. 79p. [Tese mestrado em morfologia, Universidade Federal do Paraná] 2000.
- PIEMONTE, M.R. and BUCHI, D.F. Analysis of IL-2, IFN- γ and TNF- α production, $\alpha_5\beta_1$ integrins and actin filaments distribution in intraperitoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 4, 2001.
- RABELLINO, E.M.; ROSS, G.D. and POLLEY, M.J. Membrane receptors of mouse leukocytes. Two types of complement receptors for different regions of C3. **J. Immunol.**, v. 120, p. 871-879, 1981.
- RABINOVITCH, M. Macrophage spreading *in vitro*. In: van Furth, R. ed., **Mononuclear Phagocytes in Immunity Infection and Pathology.**, Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 369-385, 1975.
- RAPPOLEE, D.A. and WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 1, p. 47-55, 1988.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5^a ed., Ed. Manole Ltda., São Paulo, 1999.
- SAMPAIO, S. C.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; BORELLI, P.; CURI, R. and CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leuk. Biol.**, v. 70, p. 551-558, 2001.

- SCHNELLER, M.; VUORI, K. and RUOSLAHTI, E. $\alpha_v\beta_3$ integrin associates with activated insulin and PDGF β receptors and potentiates the biological activity of PDGF. **EMBO J.**, v. 16, p. 5600, 1997.
- SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W and DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Exp. Parasitol.**, *in press*.
- SELIGMANN, I. C.; LIMA, P. D. L.; BAHIA, M. O.; KHAYAT, A. S.; BUCHI, D. F. and BURBANO, R. R. Absence of genotoxic effects of Método Canova[®] in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. **Gen. Mol. Biol.**, v. 23, n. 3, suppl. P. 677, 2000.
- SHAW, L. M.; MESSIER, J. M. AND MERCURIO, A. M. The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the $\alpha_5\beta_1$ integrin. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 2167-2174, 1990.
- SILVA, M. H. C. e QUELUZ, T.H.A.T. Macrófagos pulmonares. **J. Pneumol.**, v. 22, n. 1, p. 45-48, 1996.
- SOEIRO, M.N.C.; SILVA-FILHO, F.C. and MEIRELLES, M.N.L. The nature of anionic sites and endocytic pathway in heart muscle cells. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 26, n. 1, p. 121-130, 1994.
- SOUSA E SILVA, M. M. C.; GONÇALVES, L. R. C. and MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Mediators Inflamm.**, v. 5, p. 18-23, 1996.
- SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p. 425-434, 1990.
- STUEHR, D. J. and MARLETTA, M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ . **J. Immunol.**, v. 139, p. 518-525, 1987.
- SWANSON, J. A. and BAER, S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 89-93, 1995.
- TAKEMURA, R. and WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological function. **Am. J. Physiol.**, v. 246, C1-C9, 1984.
- TIMPL, R.; PAULSSON, M., DZIADEK, M. and FUJIWARA, S. Basement membranes. **Meth. Enzymol.**, v. 145, p. 363-39, 1987.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MARTINI-DUMAS, A. and SERRES, E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. **Annals de parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, p. 104-106, 1993.

ULLMAN, D. A. **Homeopatia – Medicina para o Século XXI**. São Paulo, Ed. Cultrix, 1995.

UNANUE, E.R. and ALLEN, P.M. The basis for the immuno-regulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v. 236, p. 551-557, 1987.

UNKELESS, J.C.; SGIGLIONO, E. and FREEDMAN, V. H. Structure and function of human and murine receptors for IgG. **Ann. Rev. Immunol.**, v.6, p. 251-281, 1988.

Van FURTH, R.; DIESSELHOFF-den DULK, M.M.C. and MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med.**, v. 138, p. 1314-1330, 1973.

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q. and SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 5177-5182, 1994.

WERB, Z.; HEMBRY, R.M.; MURPHY, G. and AGGELER, J. Commitment to expression of metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J Cell Biol.**, v. 102, p. 697-702, 1986.

WOJCIAK-STOTHARD, B.; DENYER, M.; MISHIRA, M. and BROWN, R. A. Adhesion, orientation and movement of cells cultured on ultrathin fibronectin fibers. **In vitro Cell Dev. Biol.**, v. 33, p. 110-117, 1997.