

ANA PAULA RESSETTI ABUD

**AÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO CANOVA EM CÉLULAS DE
MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

CURITIBA 2005

ANA PAULA RESSETTI ABUD

**AÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO CANOVA EM CÉLULAS DE
MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular do
Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná, para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular
Orientadora: Dra. Dorly de Freitas Buchi**

CURITIBA 2005

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e me confortar nas horas difíceis.

A minha orientadora Professora Dorly, pelos importantes ensinamentos tanto científicos quanto pessoais, pela amizade e apoio, e pelo conforto nas horas difíceis. Obrigada por ser minha “mãe científica”!

Aos meus pais, Angela e Brazílio, por todo amor, carinho e apoio incondicionais, vocês são os melhores pais do mundo! Amo muito vocês!

Ao meu irmão Neto, pela amizade e compreensão. Obrigada por você existir perto de mim!

Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor e paciência nos meus “maus” momentos. Amo você demais! Graças a sua presença foi mais fácil transpor os dias de desânimo e cansaço!

A todos os meus amigos, pelo apoio e momentos de alegria! Especialmente, às minhas “irmãs de coração” Carolina, Fernanda, Luciana e Mariana, pelo apoio, companheirismo e sólida amizade que construímos, a qual tenho certeza que será para sempre! Amo vocês, amigas!

Aos meus colegas de laboratório Beatriz, Elenice, Fernando, Felipe, Mônica, Plínio, Raffaello e Simone, pela ajuda constante, carinho e pela certeza de que após esses dois anos de convivência deixamos de ser colegas para nos tornarmos amigos, obrigada! Agradeço, em especial, a Beatriz e ao Felipe, já que iniciamos esse projeto juntos e compartilhamos muitas dúvidas! Por serem grandes companheiros de viagem e pelo auxílio nos experimentos! Obrigado Fe, pelos cultivos que fizemos nas suas horas de almoço...

A Carolina, pelas nossas discussões científicas, pelo auxílio nos experimentos e redação do artigo! Amiga, obrigada por tudo, essas palavras são pouco para demonstrar toda a ajuda que me ofereceu!

A Luciana, pela amizade e presença constantes, por me escutar e me acompanhar nas arrumações do laboratório...Obrigada, amiga!

Ao Raffaello, por me ceder seus resultados da curva padrão do soro sanguíneo de camundongos!

Ao professor Juarez Gabardo e seus alunos, pelo auxílio na execução das análises estatísticas, pela amizade e apoio.

Aos profissionais do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR especialmente Iselen, Cândido, Júlio e Luís, pela atenção e auxílio constantes.

A Canova do Brasil pelo apoio financeiro para a execução desse projeto.

A CAPES e ao Paraná Tecnologia, pelo apoio financeiro para a execução desse projeto.

As secretárias Gerizalda, do Departamento de Biologia Celular, e Marlene, do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo auxílio nas questões administrativas.

Ao Felipe Leite, aluno de pós-graduação do Departamento de Histologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela atenção e carinho com que esclareceu minhas dúvidas!

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná, em especial ao Franco Cardoso, pelo fornecimento do fator de diferenciação M-CSF.

Aos integrantes do laboratório de Imunofenotipagem do Hospital de Clínicas da UFPR, pela atenção nos momentos que os procurei.

Aos integrantes do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela ajuda na preparação do material.

Ao professor Marco Randi, pelo auxílio constante com os equipamentos.

Ao senhor Herculano Salviano dos Reis Filho (Nino), pela ajuda com as técnicas e corantes.

Ao professor Sílvio Sanches, pelo fornecimento do corante DAPI e aos integrantes do Laboratório de Matriz Extracelular, pela amizade e carinho.

À professora Célia Regina Franco e à Kátia, pelo auxílio com as técnicas e protocolos, além da amizade.

Aos professores Almeriane Maria Weffort Santos e Alexander Biondo, pela participação na banca avaliadora e pelas críticas e comentários valiosos.

Aos camundongos, por suas células, sem eles não seria possível a realização desse trabalho!

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade!

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MEDULA ÓSSEA E HEMATOPOIESE	1
1.1.1 CÉLULAS TRONCO OU <i>STEM CELLS</i>	1
1.1.1.1 CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (HSCs) - 1º COMPARTIMENTO	2
1.1.2 CÉLULAS COMPROMETIDAS COM ALGUMA LINHAGEM CELULAR - 2º COMPARTIMENTO)	7
1.1.2.1 PROGENITORAS DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS E GRANULÓCITOS	7
1.1.2.2 PROGENITORAS DE LINFÓCITOS T E B	7
1.1.2.3 PROGENITORAS DE ERITRÓCITOS	8
1.1.3 CÉLULAS DIFERENCIADAS E SUAS FUNÇÕES - 3º COMPARTIMENTO	9
1.1.3.1 LINFÓCITOS	10
1.1.3.2 MONÓCITOS/MACRÓFAGOS	12
1.1.3.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS	12
1.1.3.4 GRANULÓCITOS	14
1.1.3.5 ERITRÓCITOS	14
1.1.4 MICROAMBIENTE OU ESTROMA MEDULAR	16
1.1.5 FATORES DE CRESCIMENTO E INTERLEUCINAS	17
1.1.5.1 FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS - M-CSF	20
1.2 TRATAMENTO HOMEOPÁTICO	21
1.3 MEDICAMENTO CANOVA	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27

3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 ANIMAIS	28
4.2 COLETA CELULAR	28
4.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS OBTIDO	29
4.4 CULTIVO CELULAR	29
4.5 TRATAMENTO COM CANOVA E COM M-CSF <i>IN VITRO</i>	29
4.4.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS - CULTURA LÍQUIDA	30
4.4.1.1 MORFOLOGIA	30
4.4.1.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	30
4.4.1.3 MICROSCOPIA CONFOCAL	31
4.4.1.4 IMUNOFENOTIPAGEM	31
4.4.1.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1 MORFOLOGIA	33
5.1.1 CÉLULAS ADERENTES	33
5.1.2 CÉLULAS DO SOBRENADANTE DA CULTURA (CITOGRAV)	38
5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	40
5.3 MICROSCOPIA CONFOCAL	45
5.4 IMUNOFENOTIPAGEM	48
5.4.1 POPULAÇÕES CELULARES QUE NÃO APRESENTARAM ALTERAÇÃO, NA QUANTIDADE DE MARCADORES, DURANTE OS EXPERIMENTOS	49
5.4.1.1 CD11B (MAC-1)	49
5.4.1.2 LY-6G (GR-1)	50
5.4.2 POPULAÇÕES CELULARES QUE APRESENTARAM ALTERAÇÃO, NA QUANTIDADE DE MARCADORES, DURANTE OS EXPERIMENTOS	51
5.4.2.1 CD45R	52
5.4.2.2 CD11c	53
5.4.2.3 CD3E	54
5.4.2.4 TER-119 (LY-76)	55
5.5 QUANTIFICAÇÃO CELULAR DAS POPULAÇÕES ANALISADAS	57
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	58
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8. ANEXOS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

BCL-2 - proteína anti-apoptótica que sustenta as células hematopoiéticas *in vitro*

BFU-E - unidades formadoras de blastos de eritrócitos

CFC - unidades formadoras de colônias

CFU-E - unidades formadoras de colônias de eritrócitos

GM-CFC - unidade formadora de colônias de granulócitos/monócitos/macrófagos

CFU-B unidades formadoras de blastos

CFU-MIX - unidades formadoras de colônias misturadas (geralmente monócitos/macrófagos e granulócitos)

CFU-GM - unidades formadoras de colônias de monócitos/macrófagos e granulócitos

CXCR4 (receptor de quimioatração) - receptor da quimiocina SDF-1

EPO - eritropoetina

Flt3/FLk2L - ligante do receptor Flt3

GM-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos/monócitos/macrófagos)

G-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos

GPA - glicoforina A

HSC - células tronco hematopoiéticas

INF- α β γ - interferon α , β ou γ

Integrinas VLA-4 e VLA-5 - *very late antigen group*

IL-3 - interleucina 3

IL-4 - interleucina 4

IL-8 - interleucina 8

IL-11 - interleucina 11

MEC - moléculas de matrix extracelular

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 α - macrophage inflammatory protein 1 α

NK - células *natural killer*

SCF - *stem cell factor* ou ligante do *c-kit*

SDF-1 - quimiocina *stromal cell-derived factor* –1

TCR - receptor de célula T

TFR - receptor da transferina

TGF- β - fator de crescimento transformador β

TNF α - fator de necrose tumoral α

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diferenciação das células hematopoiéticas a partir de uma HSC.....	6
FIGURA 2. Imagens das células aderentes da medula óssea após 48 horas de cultivo.....	34
FIGURA 3. Imagens das células aderentes da medula óssea após 72 horas de cultivo.....	35
FIGURA 4. Imagens das células aderentes da medula óssea após 96 horas de cultivo.....	36
FIGURA 5. Imagens das células aderentes da medula óssea após 96 horas de cultivo.....	37
FIGURA 6. Células do sobrenadante da cultura de medula óssea.....	39
FIGURA 7. Eletromicrografias de varredura das células aderentes da medula óssea após 72 horas de cultivo.....	41
FIGURA 8. Eletromicrografias de varredura das células aderentes da medula óssea após 72 horas de cultivo.....	42
FIGURA 9. Eletromicrografias de varredura das células aderentes da medula óssea após 72 horas de cultivo.....	43
FIGURA 10. Células controle da marcação nas quais omitiu-se o anticorpo primário.....	45
FIGURA 11. Marcação do receptor CD11b, preferencialmente monócitos/macrófagos.....	46
FIGURA 12 Marcação do receptor CD11c, preferencialmente células dendríticas.....	47
GRÁFICOS 1A e 1B. Perfil característico encontrado nas células CD11b ⁺	49
GRÁFICOS 2A e 2B. Perfil característico encontrado nas células Ly-6G ⁺	50
GRÁFICOS 3A e 3B Perfil característico encontrado nas células CD45R ⁺	52
GRÁFICOS 4A e 4B Perfil característico encontrado nas células CD11c ⁺	53
GRÁFICOS 5A e 5B Perfil característico encontrado nas células CD3e ⁺	54
GRÁFICOS 6A e 6B Perfil característico encontrado nas células TER-119 ⁺	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Citocinas importantes na hematopoiese e no desenvolvimento de suas células.....	18
TABELA 2. Sumário dos resultados da microscopia de luz.....	33
TABELA 3. Contagem das células aderentes sob microscopia de luz.....	33
TABELA 4. Sumário dos resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
TABELA 5. Valores que indicam alteração na expressão dos marcadores ao longo do tempo de permanência na cultura.....	51
TABELA 6. Quantificação das células pertencentes a cada população celular analisada, presentes no sobrenadante das culturas, analisadas no citômetro de fluxo.....	58
TABELA 7. Quantificação das citocinas do sobrenadante das culturas comparada à curva padrão do soro sanguíneo de camundongos.....	58

RESUMO

A medula óssea vermelha presente em ossos como o esterno, ossos ilíacos, costelas e fêmures, é altamente vascularizada e apresenta uma estrutura anatômica especial que permite a proliferação e diferenciação das células pluripotentes. Esse microambiente especial é formado pelas células do estroma medular, que sustentam a sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação das células tronco e seus sucessores e são produtoras de citocinas. Esse microambiente também contém moléculas de matriz extracelular. Existe então um verdadeiro sistema regulador que garante a hematopoiese *in vivo*. O medicamento Canova é uma especialidade farmacêutica desenvolvida a partir de tinturas conhecidas na farmacopéia: *Aconitum napellus*, *Bryonia alba*, *Thuja occidentalis*, *Lachesis muta* e *Arsenicum album* diluídos em água destilada e menos de 1% de álcool. Os fêmures de camundongos suíços, apresentando três meses de idade, foram dissecados e limpos. As epífises foram removidas e a medula óssea foi obtida através de lavagem com Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal com antibióticos. As células foram contadas em câmara de Neubauer. Esse trabalho tem como objetivo verificar os efeitos do composto medicamentoso homeopático Canova sobre células da medula óssea de camundongos, cultivadas *in vitro*. O Canova agiu sobre as células aderentes da medula óssea promovendo a ativação e o espraiamento. Também foram encontrados, em grande quantidade, agrupamentos de células sobre as aderentes (ninhos) nas culturas tratadas. O tratamento com o Canova não alterou a expressão dos marcadores de superfície analisados, CD45R, CD11b, CD11c, Ly-6G, CD3e e TER-119. O que ocorreu foi uma flutuação de alguns desses marcadores (CD45R, CD11c, CD3e e TER-119) ao longo do desenvolvimento da cultura, indicando diferenciação celular. Esse medicamento também não alterou a concentração de citocinas presentes no sobrenadante da cultura. Nesse trabalho não encontramos alterações em vários tipos celulares com exceção dos macrófagos. Essas células são a primeira linha de defesa do organismo, sendo mais suscetíveis a responderem a alguns estímulos. O medicamento imunomodulador Canova atua comprovadamente sobre macrófagos.

palavras-chave: medula óssea, Canova.

ABSTRACT

The medullar cavity of long bones and the interstices between trabeculae of spongy bones house the soft, gelatinous, highly vascular and cellular tissue known as marrow. It shows a special anatomic structure that allows proliferation and differentiation of progenitors cells. This microenvironment is composed by marrow stromal cells, extracellular matrix, progenitors cells which differentiate into mature blood cells and growth factors. *Canova* is a homeopathic medication resulted from the combination of widely used homeopathic tinctures derived from the following substances: *Aconitum napellus*, *Thuja occidentalis*, *Bryonia alba*, *Lachesis muta* and *Arsenicum album* in alcoholic solution. Femurs from three months swiss mice were dissected and cleaned. Epiphyses were removed and the marrow was flushed with Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum with antibiotics. Cells were counted in Neubauer chamber. This study aimed to know the effects of *Canova* medication on *in vitro* mice bone marrow cells. This medication acts on bone marrow adherent cells improving its activation and spread. *Canova* seems to increase cell clusters on adherent cells. Flow cytometry analysis showed no differences on the expression of tested surface markers among the groups. It was observed that culture periods have influences on expression of some markers. CD11c and CD3 increased the expression after 72 hours and decreased after 96 hours. CD45R decreased expression after 72 and increased after 96 hours. TER-119 increased the expression after 72 hours and it was maintained after 96 hours of culture, and this is an indication of cell differentiation. This medication did not modify the cytokines concentration on culture supernatant. In this work no alterations in some cellular lineages were detected except for the monocytic lineage. Macrophages are the first defense line of an organism thus being more susceptible to respond a stimulus. The immunomodulator medication called *Canova* acts on macrophages.

Key Words: bone marrow, *Canova*

1. INTRODUÇÃO

1.1 MEDULA ÓSSEA E HEMATOPOIESE

A medula óssea vermelha de um animal adulto se situa dentro dos ossos esponjosos que compõe o esqueleto axial, como o esterno, ossos ilíacos, costelas e fêmures. Essa medula funcionante, produtora de células, é muito vascularizada, apresentando cor vermelha escura. À medida que deixa de ser ativa vai se tornando amarela, rica em células gordurosas (LORENZI, 1999).

Apresenta uma estrutura anatômica especial que permite a sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação das células hematopoiéticas pluripotentes e suas descendentes. Esse microambiente especial é constituído pelas células estromais que, além de fornecerem sustentação e promoverem a sobrevivência das células tronco, são produtoras de citocinas, e pela matriz extracelular. É esse sistema regulador que garante a hematopoiese *in vivo* (MÜLLER-SIEBURG & DERYUGINA. 1995; WHETTON & GRAHAM. 1999), quando as células tronco e suas descendentes encontram-se aí instaladas.

1.1.1 Células tronco ou *stem cells*

Um organismo multicelular origina-se a partir de uma única célula totipotente (zigoto). Essa célula totalmente indiferenciada é chamada de célula tronco ou *stem cell*. Após sua formação, inicia-se um processo de divisão, que irá resultar na formação do embrião. Até oito células, continuam totipotentes, ou seja, capazes de dar origem a qualquer célula de um organismo multicelular (plasticidade) (EVANS & KAUFMAN. 1981), mas quando esse número é ultrapassado, essas células passam a ser pluripotentes, ou seja, capazes de dar origem a muitas células, mas não a todas de um organismo multicelular, já estando comprometidas com alguma linhagem celular. As células tronco embrionárias pluripotentes humanas foram inicialmente isoladas da massa interna de blastocistos (THOMSOM et al. 1995; KONDO et al. 2003) e apresentam a capacidade de dar origem às células dos três folhetos embrionários – endoderme, ectoderme e mesoderme. Essas células continuam se dividindo e mantendo sua pluripotencialidade até o momento em que se tornam multipotentes. As células multipotentes são linhagem específicas e

incluem as células tronco hematopoiéticas (KONDO et al. 2003). As células multipotentes continuam se dividindo e/ou diferenciando até que algumas resultam nas células unipotentes, capazes de dar origem à somente um tipo celular. Essa diferenciação é desencadeada devido à ação de citocinas e sua interação com receptores, que desencadeiam vários mecanismos moleculares. Durante a diferenciação celular, a presença das moléculas envolvidas nesses mecanismos, pode ser verificada pela análise da expressão gênica das células tronco e progenitoras (WOLPERT et al. 2000; KONDO et al. 2003).

Há células tronco presentes na medula óssea de organismos adultos que são capazes de originar as células sanguíneas, além das células que formam e mantêm o estroma medular.

Desde o momento em que foram isoladas, as células tronco embrionárias mereceram grande atenção já que se expandem em seu estado primitivo não diferenciado *in vitro* e, mesmo após longos períodos de cultivo, mantêm sua pluripotencialidade (PERA et al. 2000). Essa descoberta foi muito importante já que propiciou novas possibilidades de estudos embrionários e de desordens, como erros inatos e tumores embrionários, além do estudo de genes de embriões e abriu caminho para estudos de regeneração e reparo de tecidos, bem como para o tratamento de doenças degenerativas (PERA et al. 2000), mas foi a partir do desenvolvimento das células tronco de camundongos que se tornou possível o desenvolvimento de tecnologias, propiciando o estudo das células tronco humanas (EVANS & KAUFMAN. 1981). Já as células tronco adultas podem ser isoladas de uma grande variedade de tecidos e se diferenciam de acordo com o microambiente que se encontram (BARRY & MURPHY. 2004).

1.1.1.1 Células tronco hematopoiéticas (HSCs) - 1º compartimento

As células tronco hematopoiéticas apresentam extensivo potencial de auto-renovação e proliferação associado com a capacidade de se diferenciar em progenitoras e manter todas as linhagens sanguíneas (eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, monócitos, macrófagos, linfócitos T, B e NK, células dendríticas, megacariócitos e plaquetas). Essas características são demonstradas pela capacidade de reconstituir a hematopoiese completa, após

transplante, em um recipiente cuja medula óssea foi destruída completamente ou se encontra incapaz de produzir hematopoiese (QUESEMBENY & COLVIN. 2001).

As HSCs representam uma pequena fração celular da medula óssea, cerca de 0,5% das células nucleadas (LORD. 1997). Em cultura, na presença de determinadas citocinas, podem se diferenciar em linhagens celulares específicas (BARRY & MURPHY. 2004).

Para se entender o desenvolvimento e maturação das células da medula óssea, tanto humanas quanto de camundongos, é necessário conhecer seus antígenos de superfície os quais são proteínas que podem ser utilizadas como marcadores de populações celulares e que permitem a seleção dessas populações. O surgimento dessas moléculas de membrana durante o desenvolvimento celular é regulado, sendo que não aparecem ou desaparecem abruptamente durante a maturação e sim apresentam uma expressão e uma perda gradual, dependendo do estágio de maturação no qual a célula se encontra (CIVIN & LOKEN. 1987). Esses marcadores também permitem a seleção de células primitivas as quais se comportam como células tronco hematopoiéticas em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Exemplos desses marcadores, CD34, c-kit e Thy1, sendo que camundongos apresentam o c-kit (CD117) em maior quantidade e humanos, o CD34 (QUESEMBENY & COLVIN. 2001). Essas células não apresentam ou apresentam em pequena quantidade os marcadores de linhagens ($\text{Lin}^{-/lo}$). Existe também o marcador Sca-1, que é específico para células de camundongos e um marcador da família CD59, o qual é específico para células humanas (www.stemcells.nih.gov/index.asp). Quando as HSC expressam $\text{Thy1.1}^{lo} \text{Lin}^{-} \text{c-kit}^{+}$ e Sca-1^{+} apresentam capacidade de se multiplicar podendo reconstituir as linhagens celulares hematopoiéticas de um camundongo (KONDO et al. 2003). A partir do momento que essas células se diferenciam, sua capacidade de auto-renovação diminui (WOLPERT & cols. 2000).

No microambiente medular é mais difícil encontrar as células CD34^{+} (totalmente indiferenciadas), já que estão em pequena quantidade; isso indica que a maioria dessas células já está em processo de diferenciação. À medida que a célula se diferencia, perde a expressão de CD34 e adquire outros marcadores, mais específicos das linhagens celulares descendentes (HAYLOCK et al. 1994).

Até o momento sabe-se que, o saco vitelínico é o primeiro local de produção de células sanguíneas em murinos e humanos (PALIS & YODER. 2001). Existem estudos relatando que, em embriões de camundongos, essas células também podem se originar na região primitiva da aorta-gônada-mesonéfrons (AGM) (WHETTON & GRAHAM. 1999; TAMURA et al. 2002). Ainda é controverso se a região AGM também representa um local de origem das células tronco hematopoiéticas (HSCs) ou se é um local de passagem entre o saco vitelínico e o fígado fetal, durante o desenvolvimento embrionário. Com o desenvolvimento do embrião, as células sanguíneas primitivas atingem a circulação embrionária e se fixam em locais do embrião, e depois, do feto, onde existe grande vascularização. O fígado é considerado o principal órgão hematopoiético no feto, o timo, responsável pela hematopoiese na vida embrionária e adulta em roedores, o baço, o qual é co-responsável pela hematopoiese no final da vida embrionária, após o nascimento e vida adulta em roedores e, posteriormente, a medula óssea, a qual representa o órgão central formador das células sanguíneas após o nascimento e na vida adulta (MOORE. 1991; WHETTON & GRAHAM. 1999; KONDO et al. 2003). Nos organismos adultos, populações de células tronco hematopoiéticas podem ser encontradas no sangue periférico, baço e fígado, o que sugere um movimento dinâmico, partindo da medula óssea para outros locais do organismo (WHETTON & GRAHAM. 1999).

A célula tronco hematopoiética apresenta capacidade de multiplicação e de diferenciação como qualquer célula tronco. As células tronco hematopoiéticas de camundongos podem ser subdivididas em três subpopulações: HSCs de longa duração (0,005 – 0,01%), que são as mais primitivas e apresentam a capacidade de se auto-renovar por toda a vida do organismo; HSCs de curta duração, que apresentam uma capacidade limitada de auto-renovação; células multipotentes, as quais não apresentam capacidade de auto-renovação (KONDO et al. 1997; WHETTON & GRAHAM. 1999). Essas células estão ligadas ao estroma medular. Existem junções *gap* entre as células estromais e as hematopoiéticas, sendo que a proteína predominante responsável por esse suporte é a conexina 43 (Cx-43) (WHETTON & GRAHAM. 1999; CANCELAS et al. 2000). Enquanto estão aderidas algumas células mantêm-se indiferenciadas, mas outras já se apresentam comprometidas com alguma linhagem celular e, após esse comprometimento, essas

células já poderão se desligar das células estromais e se mobilizar para o sangue periférico (KONDO et al. 2003; FUCHS et al. 2004).

A adesão das HSCs ao estroma é ativada por citocinas como SCF (*stem cell factor - c-kit ligant, steel factor, mast cell growth factor*), GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos) e IL-3 (interleucina 3) que poderão atuar, por exemplo, através da ativação de integrinas, como, VLA-4 e VLA-5 (*very late antigen group*) (WHETTON & GRAHAM. 1999). Como as células periféricas e funcionais apresentam tempo de vida limitado e precisam ser substituídas regularmente, as células tronco hematopoiéticas estão continuamente se proliferando para atender essa demanda fisiológica. Em caso de dano em algum outro tecido do organismo poderá ocorrer mobilização dessas células, sendo o dano um estímulo para que esse tipo celular se diferencie e promova o reparo da estrutura danificada (KONDO et al. 2003; FUCHS et al. 2004). Muitas citocinas estão envolvidas neste fenômeno, como G-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos), GM-CSF, IL-11, IL-3, IL-8, SCF e Flt-3 ligante.

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

Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que as células tronco da medula óssea adulta apresentam a mesma capacidade pluripotente das embrionárias (www.stemcells.nih.gov/index.asp), sendo capazes de promover

reparos de outros tecidos, como tecido muscular cardíaco, muscular esquelético, cerebral, epitelial e células do fígado (JENSEN & DRAPEAU. 2002).

A expansão das HSC *in vitro* ocorre em resposta à combinação de algumas citocinas como, por exemplo, Flt3 ligante e IL-3 e à expressão de alguns genes como o *Notch* e o *Sonic hedgehog* (KONDO et al. 2003). Outra molécula que parece sustentar essas células *in vitro* é a proteína anti-apoptótica BCL-2 (KONDO et al. 2003).

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

A seguir, na Figura 1, está demonstrada a diferenciação das células hematopoiéticas a partir de uma HSC.

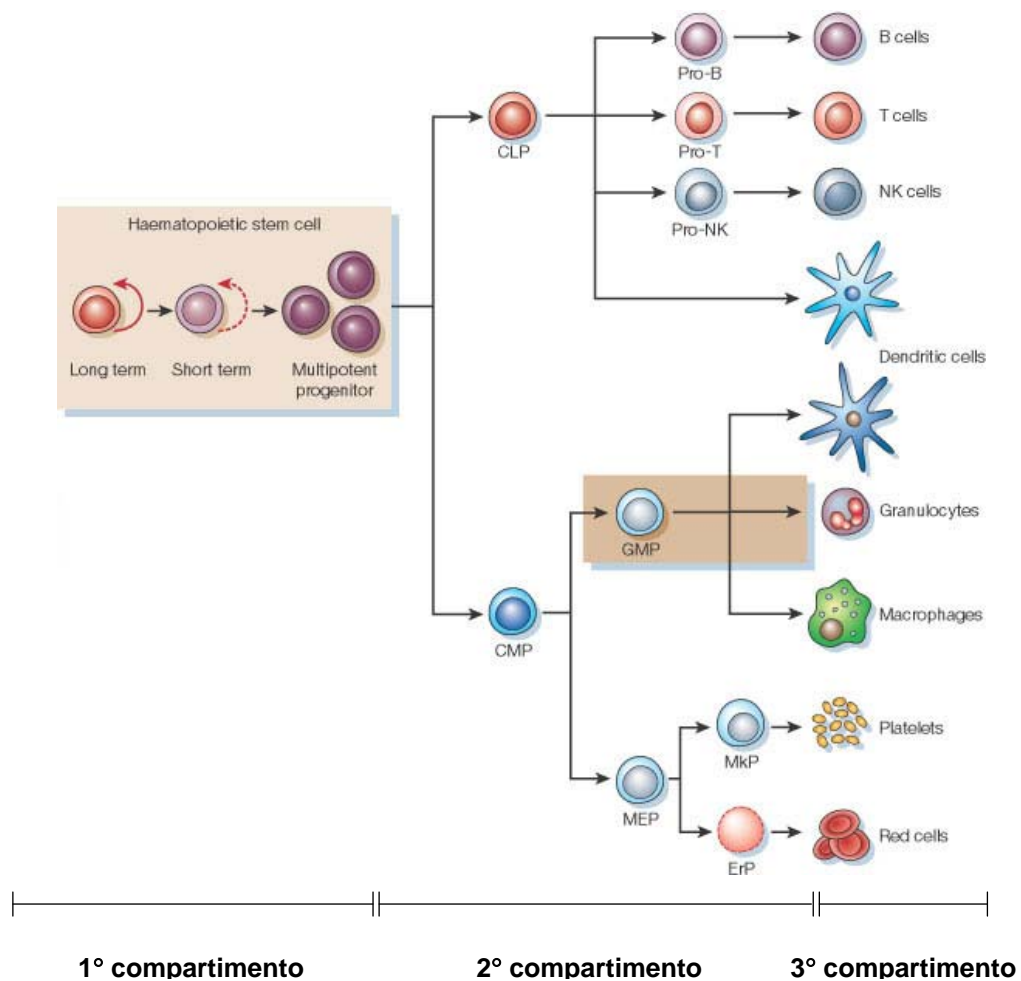


FIGURA 1: Diferenciação das células hematopoiéticas

FONTE: <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>

1.1.2 Células comprometidas com alguma linhagem celular - 2º compartimento)

1.1.2.1 Progenitoras de Monócitos/Macrófagos e Granulócitos

O marcador CD15 está presente em alta quantidade nos granulócitos maduros e em pequena quantidade nos monócitos. É detectado desde o estágio de promielócito e aumenta com a maturação das células granulocíticas. O marcador CD11b está presente em grande quantidade nos monócitos e granulócitos maduros e sua expressão se inicia no estágio de promielócito. Nenhuma dessas moléculas está presente nas células formadoras de colônia (CIVIN & LOKEN.1987). Em sua maturação, os monócitos expressam primeiramente o CD11b sendo ainda CD15⁻. Com o desenvolvimento celular, apresentam grande quantidade de CD11b e o marcador CD15 em pequena quantidade. Já no desenvolvimento dos granulócitos, o marcador CD15 aparece anteriormente ao CD11b, mas a quantidade desses dois marcadores aumenta com a maturação desse tipo celular. As células que não apresentam esses dois marcadores são blastos e células das séries eritróide e linfóide.

Outros marcadores podem ser considerados no desenvolvimento da linhagem mielóide, como, o CD13 e o CD33 que surgem no início do desenvolvimento dessas células, sendo encontrados nas unidades formadoras de colônias de granulócitos/monócitos. O CD14, que é específico dos monócitos, aparece posteriormente ao CD11b. Já o marcador HLA-DR está expresso na série monocítica inteira, incluindo as unidades formadoras de colônias (CFC). O CD16 aparece tardiamente durante a maturação dos neutrófilos, sendo que as células que o apresentam estão, na sua maioria, no sangue periférico sendo dificilmente encontradas na medula óssea (CIVIN & LOKEN.1987).

1.1.2.2 Progenitoras de Linfócitos T e B

As células T podem ser selecionadas usando algum dos anticorpos monoclonais contra marcadores que são encontrados em todas essas células (pan). Exemplos desses marcadores são CD2, CD3, CD5 e CD7 (CIVIN & LOKEN.1987).

As células B também apresentam marcadores do tipo pan, como o CD19, que é encontrado desde as células imaturas até as células B maduras. O marcador CD20 também é característico desse tipo celular sendo específico para identificar células que já estão no estágio final de maturação. CD10 está presente em um pequeno número dos linfócitos B imaturos na medula óssea.

As células CD19⁺, CD20⁺ e CD10⁻ apresentam morfologia de linfócitos maduros e expressam antígenos de células B maduras, como CD22 e CD21, podendo não mais estar presente na medula óssea.

Já as células CD19⁺, CD20⁺ e CD10⁺ apresentam características morfológicas de células menos maduras e as células CD10⁺ e CD20⁻ são as células, efetivamente, menos maduras (CIVIN & LOKEN.1987).

1.1.2.3 Progenitoras de Eritrócitos

As moléculas características da população eritrocítica são, principalmente, receptor da transferina (TFR), glicoforina A (GPA) e CD45 (CIVIN & LOKEN.1987). As células eritróides maduras podem ser identificadas, primeiramente, pela presença da GPA, que é a maior glicoforina presente na membrana dos eritrócitos a qual se expressa somente nessa série (KINA et al. 2000).

Os reticulócitos se distinguem dos eritrócitos maduros pelo baixo nível de expressão do TFR. Células que são intensamente GPA⁺ e TFR⁺ apresentam morfologia de normoblasto. Eritroblastos são caracterizados pela baixa quantidade de GPA (são quase essencialmente GPA⁻), mas expressam TFR. Unidades formadoras de blastos e colônias de eritrócitos (BFU-e e CFU-e respectivamente) são GPA⁻/TFR⁺. Finalmente, a população celular GPA⁻/TFR⁻ inclui poucos eritroblastos e contém predominantemente células de outras linhagens (CIVIN & LOKEN.1987).

A maioria da série eritróide apresenta pouca ou nenhuma unidade do marcador CD45 o qual é um antígeno comum de leucócitos (CIVIN & LOKEN.1987), dessa maneira esse marcador é utilizado para selecionar as células dessa série.

1.1.3 Células diferenciadas e suas funções - 3º compartimento

Existem duas principais linhagens derivadas das células tronco hematopoiéticas (HSCs) e, para o desenvolvimento dessas populações celulares, ocorrem muitas proliferações ao longo da diferenciação celular (KATSURA. 2002).

Linhagem mielóide: Inclui a série dos monócitos/macrófagos e a série dos granulócitos ou células polimorfonucleadas (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). Essas populações correspondem à maioria das células medulares (LORENZI. 1999). Os macrófagos são considerados os fagócitos mais eficientes apresentando também uma importante função na imunidade adaptativa, cooperando com as células T e B como apresentadoras de antígenos e como produtoras de citocinas. Os macrófagos e as células dendríticas apresentam origem comum (KATSURA. 2002). Essa linhagem também inclui a série eritróide que é composta pelos eritrócitos (células vermelhas do sangue) e seus precursores. Os eritrócitos apresentam a função de transportar o oxigênio através dos vasos sanguíneos (KATSURA. 2002). A série megacariocitóide também se origina dessa linhagem e inclui as plaquetas derivadas dos megacariócitos. As plaquetas operam na homeostasia do sistema vascular (KATSURA. 2002).

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

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

Estudos *in vitro* das células medulares de camundongos demonstraram que, na presença de GM-CSF, predominam os neutrófilos na população sobrenadante, enquanto os macrófagos encontram-se altamente aderidos aumentando seu número após uma semana e, as células dendríticas encontram-se em agregados fixados ao estroma medular as quais soltam-se facilmente (INABA et al. 1992).

Já na presença de M-CSF, um grande número de macrófagos prolifera e se encontra firmemente aderido à superfície plástica. Células dendríticas ou agregados desse tipo celular não aparecem. Se for realizada uma cultura misturando o GM-CSF

com o M-CSF células aderentes e agregados de granulócitos e células dendríticas se desenvolvem (INABA et al. 1992).

As células pré B e B correspondem a 50% da suspensão inicial da medula óssea (INABA et al. 1992).

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

1.1.3.1 Linfócitos

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

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

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

O marcador definitivo das células T é o TCR – receptor de antígeno das células T. Existem dois tipos bem definidos de TCR: o TCR-2, um heterodímero com dois peptídeos ligados por pontes dissulfeto (α e β) e o TCR-1, que é estruturalmente semelhante, mas consiste de polipeptídeos γ e δ . Ambos receptores estão associados a um conjunto de 5 polipeptídeos, o complexo CD3, importante na transdução de sinal após o reconhecimento do antígeno pelo heterodímero TCR, formando o complexo receptor TCR-CD3 da célula T. A grande maioria dos linfócitos circulantes (90 – 95%) corresponde a linfócitos T $\alpha\beta$. As células T $\alpha\beta$ podem ainda ser subdivididas em duas subpopulações: uma apresentando o marcador CD4 que tem como principal função “auxiliar” ou “induzir” as respostas imunes (T_a) e outra

apresentando o marcador CD8 a qual é predominantemente citotóxica (Tc). Existem evidências de que ambas populações de células T (CD4 e CD8) podem suprimir as respostas imunes e essa atividade supressora poderia operar-se através de uma citotoxicidade direta das células apresentadoras de antígeno via citocinas “supressoras”. Como as células T precisam reconhecer uma ampla variedade de antígenos diferentes, os genes das cadeias $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ do TCR sofrem recombinação somática durante o desenvolvimento tímico, originando genes funcionais para os diferentes receptores das células T. O fator de crescimento das células T é a IL-2 e seu receptor específico é o CD25 (ROITT. 1999).

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

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

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

1.1.3.2 Monócitos/Macrófagos

Os monócitos e macrófagos murinos e humanos possuem receptores para manosil-fucosil, que se ligam aos açúcares presentes na parede celular de alguns microorganismos e em células velhas ou desgastadas do organismo. Apresentam também três receptores distintos para a porção Fc de IgG: Fc γ RI (CD64) (células humanas) com alta afinidade para IgG e homologia para o receptor Fc γ RIIa do camundongo; Fc γ RII (CD32), de média afinidade e equivalente ao receptor Fc γ RIIb/1 do camundongo; e Fc γ RIII (CD16), equivalente ao Fc γ RIo de camundongos, de baixa afinidade e presente em um subgrupo de monócitos. Estes receptores para Fc, provavelmente, possuem funções diversas que incluem desencadeamento da destruição extracelular e fagocitose dos microorganismos opsonizados. O CD11b/Mac-1 é o principal receptor dessas células, sendo caracterizado como uma importante molécula de adesão e está envolvido na migração celular transendotelial até a região da inflamação. A expressão desse marcador está intimamente relacionada com a capacidade de polimerização da actina, o principal componente do citoesqueleto envolvido na fagocitose (BROM et al. 1995).

1.1.3.3 Células dendríticas

As células dendríticas apresentam papel importante na regulação de respostas imunológicas contra vários antígenos incluindo alérgenos, agentes infecciosos e tumores (CITTERIO et al. 1999). São apresentadoras de antígenos profissionais e quando ativadas por um estímulo inflamatório, migram para os órgãos linfóides e regulam as respostas mediadas pelas células T (MA et al. 2004). Durante a migração, aumenta em sua superfície, a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimulatórias além de tornarem-se competentes para ativar células B e T (CITTERIO et al. 1999). As células imaturas apresentam uma aderência fraca e quando maduras, encontram-se em suspensão. Como apresentam capacidade de aderência, expressam altos níveis de moléculas de adesão (CITTERIO et al. 1999). Essas células podem ser derivadas das linhagens mielóide e linfóide (KATSURA. 2002).

Culturas de tecidos hematopoiéticos de camundongos, como baço e medula óssea, podem dar origem a esse tipo celular. As células imaturas expressam

grandes quantidades de moléculas MHC de classe I e baixas quantidades de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias, além de apresentarem alta capacidade fagocítica. No estágio maduro, perdem sua capacidade fagocítica, adquirem alta atividade coestimulatória de células T, altos níveis de moléculas MHCII e de moléculas coestimulatórias (CITTERIO et al. 1999).

O fator estimulador de colônia de granulócitos/monócitos/macrófagos (GM-CSF) apresenta um profundo efeito na viabilidade, função e crescimento das células dendríticas, sendo considerado um fator estimulante de granulócitos, monócitos/macrófagos e células dendríticas (INABA et al. 1992). Outras citocinas também apresentam ação sobre esse tipo celular, como IL-4, TNF α e *stem cell factor* (SCF) (CITTERIO et al. 1999). Administração do FL (Flk2 ligante) ao camundongo, aumenta a formação de células dendríticas (MARASKOVSKY et al. 1996). Nesta ação, o FL apresenta ações comuns ao *stem cell factor* (METCALF. 1997).

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

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

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

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

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

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

1.1.3.4 Granulócitos

Os granulócitos apresentam este nome porque contêm abundantes grânulos citoplasmáticos. São conhecidos também como leucócitos polimorfonucleares (núcleos multilobados). Esses leucócitos podem ser chamados de células inflamatórias porque desempenham papéis importantes na inflamação e imunidade inata, eliminando microorganismos e tecidos mortos. Do mesmo modo que os macrófagos, os granulócitos são estimulados pelas citocinas derivadas das células T e fagocitam partículas opsonizadas, dessa maneira também servem a importantes funções efetoras nas respostas imunes específicas (ABBAS. 2000). São três os tipos dos granulócitos, classificados de acordo com o conteúdo dos seus grânulos predominantes, os quais podem ser distinguidos após fixação e coloração.

Neutrófilos: perfazem cerca de 95% dos granulócitos circulantes, possuem núcleo multilobado característico e compõem a principal população celular na resposta inflamatória aguda.

Eosinófilos: perfazem 2 a 5% dos leucócitos sanguíneos, em indivíduos saudáveis, agindo na defesa contra certos tipos de agentes infecciosos. São também abundantes nos sítios de reações de hipersensibilidade imediata (alérgica), contribuindo para a lesão e inflamação teciduais.

Basófilos: correspondem a menos de 0,2% dos leucócitos da circulação, apresentando funções semelhantes à dos mastócitos teciduais. Quando estimulados, secretam seu conteúdo granular, que contém os mediadores químicos da hipersensibilidade imediata. Portanto, são células efetoras da hipersensibilidade imediata (ROITT. 1999; ABBAS. 2000).

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

O marcador característico dessas células de camundongos é o Ly-6G (Gr-1) (www.bdbiosciences.com).

1.1.3.5 Eritrócitos

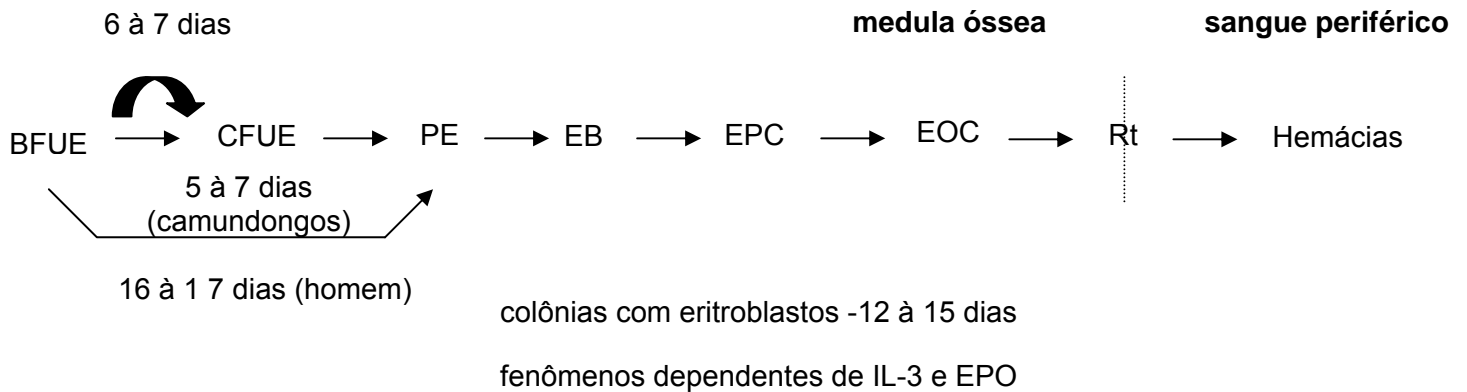
As células eritrocíticas precursoras encontram-se em pequena quantidade na medula óssea, sendo que, aproximadamente, 0,1% corresponde a unidades

formadoras de colônias de células vermelhas e 0,5% equivale ao total de proeritroblastos (ZHANG et al. 2001).

O marcador TER-119 é altamente específico das células eritróides maduras e está presente desde o estágio de proeritroblasto até o eritrócito maduro, não estando presente nas unidades formadoras de blastos (BFU-E) e de colônias (CFU-E) (KINA et al. 2000). Em camundongos adultos, as células TER-119⁺ correspondem a 20-25% das células da medula óssea (KINA et al. 2000). Essas células também expressam um nível significativo de CD45, mas não apresentam CD11b, Ly-6G ou CD45R em sua superfície. Como o marcador CD45 exerce um papel na regulação da sinalização das células hematopoiéticas, sugere-se que o CD45 está funcionalmente envolvido na regulação dos estágios posteriores de diferenciação das células eritróides da medula óssea adulta (KINA et al. 2000).

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

A seguir está exemplificada a diferenciação das células progenitoras eritróides.



In vitro existe um alto nível de células TER-119⁻ em 24 horas de cultura, um alto nível de TER119⁺ entre 24 e 36 horas de cultura e um baixo nível de TER119⁺ entre 40 e 48 horas de cultura, indicando que as células estão em diferentes estágios de diferenciação (ZHANG et al. 2001). Já foi demonstrado que progenitores de células eritróides provenientes da medula óssea, cordão umbilical ou sangue periférico, podem se expandir por extensos períodos em cultura na presença de dexametazona e β -estradiol além de SCF e eritropoetina (EPO), apresentando alta expressão do c-kit (VON LINDERN et al. 1999 *apud* ZHANG et al. 2001). A partir de 10 ml de sangue do cordão umbilical, aproximadamente 10^8 células podem ser geradas após duas ou três semanas de cultura (PANZENBOCK et al. 1998 *apud* ZHANG et al. 2001).

1.1.4 Microambiente ou estroma medular

Como já foi citado, para que ocorra a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células tronco, é necessário que exista um local em que possam se fixar. Esse parênquima de sustentação que inclui várias moléculas de matrix extracelular (MEC), apresenta grande vascularização e é composto por células tronco mesenquimais e células originadas desse tipo celular (CROFT & PRZYBORSKI. *in press*), que darão origem a células ósseas e cartilagosas. Apresenta também adipócitos, células reticulares, fibroblastos e células endoteliais (<http://www.nih.gov/news/stemcells/scireport.htm>). Contém também macrófagos e linfócitos (HAYLOCK et al. 1994). Os adipócitos aparecem após algumas semanas, em culturas de longa duração (cultura de Dexter) (DEXTER et al. 1976), e

apresentam um papel positivo no suporte e na proliferação das unidades formadoras de colônias de granulócitos/monócitos (GM-CSF) de camundongos, mas não apresentam a mesma função para essas células humanas (TOUW & LOWENBERG. 1983).

Esse sistema permite que ocorram interações entre as células tronco, células hematopoiéticas e estromais, através do contato direto célula-célula (por meio de receptores específicos) ou por interações com citocinas produzidas e/ou presentes no estroma (HAYLOCK et al. 1994). A sobrevivência das células tronco *in vitro* é dependente do seu contato direto com o microambiente medular ou da adesão dessas células com moléculas de matriz extracelular produzidas pelas células estromais (PAUL et al. 1991). As células estromais interagem de maneira diferente com células tronco diferentes, apresentando um funcionamento heterogêneo (MÜLLER-SIEBURG & DERYUGINA. 1995).

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

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

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

1.1.5 Fatores de crescimento e interleucinas

São glicoproteínas que agem em pequenas concentrações sobre moléculas receptoras regulando a sobrevivência, morte, proliferação e diferenciação celular (QUESEMBENY & COLVIN. 2001). Aqui o enfoque será sobre as citocinas envolvidas na hematopoiese. Essas substâncias são os fatores de crescimento ou fatores estimuladores de colônia (CSFs) e as interleucinas (ILs) (ABBAS, 2000). Estão presentes em quantidades mínimas no microambiente medular, atuando sobre células-alvo através de receptores celulares de membrana, capazes de reconhecê-las. Uma vez fixadas à superfície da membrana das células indiferenciadas, iniciam

sua ação por meio de receptores específicos presentes no citoplasma e núcleo da célula-alvo (ABBAS, 2000). Existe uma ação conjunta dos fatores de crescimento sobre as células e a ligação dessas células ao estroma medular através das moléculas de adesão ali presentes, propiciando então a proliferação e/ou a diferenciação celular (ABBAS, 2000).

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

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

TABELA 1: CITOCINAS IMPORTANTES NA HEMATOPOIESE E NO DESENVOLVIMENTO DE SUAS CÉLULAS.

NOME	FONTE (células)	CÉLULAS-ALVO	EFEITOS BIOLÓGICOS
G-CSF	células do estroma medular (linfócitos, macrófagos e fibroblastos)	células granulocíticas jovens	estimula a diferenciação e formação de colônias de granulócitos
GM-CSF	células do estroma medular (linfócitos, macrófagos e fibroblastos)	células granulocíticas/monocíticas jovens	estimula a diferenciação e formação de colônias de granulócitos e monócitos
M-CSF	células do estroma medular (linfócitos, macrófagos e fibroblastos)	células monocíticas jovens	estimula a diferenciação e formação de colônias de monócitos
IL-2	células T	células T, B e NK	crescimento e produção de citocinas; crescimento e síntese de anticorpos; crescimento e ativação, respectivamente
IL-3	linfócitos T e NK, células mielóides e macrófagos	células tronco	estimula a hematopoiese como um todo (todas as linhagens derivadas das células tronco)
IL-4	células T CD4 ⁺ , mastócitos	células B, T e endotelial	troca de isótipo para IgE; crescimento e diferenciação; ativação respectivamente

IL-5	células T	eosinófilos	ativação e produção
IL-6	vários tipos celulares	células B, T e CFU-B	estimula a megacariopoiese e age em sinergismo com IL-1, 2, 3, 4 e GM-CSF
Trombopoetina	células endoteliais	megacariócitos e plaquetas	proliferação e diferenciação dos megacariócitos
IL-7	células do estroma medular (fibroblastos)	linfócitos B	estimula o crescimento e diferenciação dos linfócitos B na medula óssea
Ligante do c-kit (SCF)	células do estroma da medula óssea	células tronco	aderência das células tronco ao estroma medular
INFγ	Células T e NK	fagócitos mononucleares, células endoteliais, todas do sistema imune	ativação; ativação; aumento das moléculas do MHC de classe I e II, respectivamente
Eritropoetina (EPO)	células intersticiais do córtex renal externo e macrófagos	células eritrocíticas jovens	estimula a diferenciação dos eritroblastos e a produção de hemoglobina no citoplasma
MIP-1α	células mononucleares	células progenitoras	inibe a formação de colônias de células multipotentes mas, concomitantemente, estimula as colônias precursoras
INF-α, β e γ	células mononucleares	células progenitoras	inibem CFU-MIX, CFU-GM, BFU-E e inibem ou estimulam a produção de citocinas
TGF-β	células mononucleares	células progenitoras	suprime as células progenitoras iniciais mas estimula as progenitoras tardias
TNFα	fagócitos mononucleares e células T	células progenitoras	similar ao TGF- β mas com efeito mais pronunciado sobre BFU-E e CFU-E

Existem outras funções atribuídas a essas moléculas, quando associadas. Por exemplo, IL-3 e IL-6 juntamente com a molécula ligante do c-kit ou com o G-CSF, permitem que as células tronco sobrevivam mais tempo *in vitro*. Verificou-se também que a molécula ligante do c-kit é importante na diferenciação, mas não na proliferação dessas células (MÜLLER-SIEBURG & DERYUGINA. 1995).

1.1.5.1 Fator estimulador de colônia de monócitos/macrófagos - M-CSF

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

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

O receptor do M-CSF (CD115) é uma proteína tirosino-quinase que se expressa nas células da série monocítica, sendo utilizado também, para separar essas células da série granulocítica (GUILBERT et al. 1980). A ativação desse receptor desencadeia, intracelularmente, uma cascata de fosforilação e desfosforilação que culmina no desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular (BARREDA et al. 2004).

No tecido hematopoiético, esse receptor é encontrado somente nas células da série monocítica. A produção desse fator pelas células estromais da medula óssea facilita o desenvolvimento dessas células progenitoras em nichos especializados (BYRNE et al. 1981). A ação desse fator pode ser visualizada *in vivo* pelo aumento do número de macrófagos no fígado e na cavidade peritoneal de camundongos (HUME et al. 1988). Em experimentos realizados em camundongos *knock out*, onde foi inibida a produção do M-CSF, os animais apresentaram deficiência de osteoclastos e macrófagos, ausência de dentes, desenvolvimento anormal dos ossos, diminuição do peso corporal, da fertilidade e do período de vida. Muitos desses efeitos podem ser revertidos com a administração de M-CSF recombinante em camundongos recém-nascidos. Esse fator está envolvido também na atividade quimiotática e fagocítica dos macrófagos (BARREDA et al. 2004).

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

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

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

1.2 TRATAMENTO HOMEOPÁTICO

A homeopatia é um sistema da medicina desenvolvido pelo médico alemão Dr. Samuel Hahnemann, entre 1796 e 1842. O termo homeopatia deriva do grego e significa “sofrimento semelhante”. O vocábulo *Pathos* corresponde a “sofrimento ou doença” e *Homoios* significa “semelhante” (HAHNEMANN. 2001).

Em sua principal obra, Hahnemann estipula o mecanismo de ação das drogas sistematizando-o: “toda droga causa uma certa alteração no estado de saúde humano pela sua ação primária; a esta ação primária do medicamento, o organismo opõe sua força de conservação, chamada ação secundária ou reação, no sentido de neutralizar o distúrbio inicial” (ADVERTISE AT HPATHY - [www. hpathy.com/homeopathy _ fags _ d_ asp](http://www.hpathy.com/homeopathy_fags_d.asp) – 30K). A homeopatia é um sistema de tratamento que usa substâncias derivadas de plantas, animais, minerais além de substâncias sintéticas e drogas convencionais, todas em quantidades mínimas, especialmente preparadas (dinamizadas) e altamente diluídas, que são usadas para colocar em ação os mecanismos de cura do próprio corpo, de forma abrangente (JONAS, JACOBS; 1996). Devido à alta diluição, não apresenta efeitos tóxicos, produzindo pouco ou nenhum efeito colateral (JONAS, JACOBS; 1996).

Nesta mesma obra literária, Hahnemann descreve o princípio da semelhança e, observando que a ação secundária, citada acima, poderia ser empregada como reação curativa, desde que direcionada no sentido correto, propôs um modelo terapêutico. Esse modelo utiliza medicamentos que produzissem, em sua ação primária no organismo, sintomas semelhantes à doença natural, no intuito de

despertar uma reação orgânica para anular essa doença artificial. Daí surgiu o princípio terapêutico pela similitude: "todo medicamento capaz de despertar determinados sintomas no indivíduo sadio é capaz de curar esses mesmos sintomas no indivíduo doente" (HAHNEMANN. 2001). Dessa maneira, surgiu também o princípio da experimentação no indivíduo saudável (RUIZ. 1999). Este relato mostra que a meta da terapia homeopática é promover e orientar a reação de auto-cura inata do corpo. Um organismo que elimina uma doença por conta própria tem mais chance de continuar saudável, pois curou o problema, evitando a recorrência. Esse tipo de tratamento pode levar mais tempo que os da medicina tradicional, já que se dá de acordo com a velocidade natural do próprio organismo (JONAS, JACOBS; 1996).

Uma das maiores polêmicas causadas pela homeopatia é a de utilizar o medicamento tão diluído que, teoricamente, as soluções estariam desprovidas de moléculas ativas ou de princípio ativo. A potencialização de substâncias combina diluição em água e álcool e agitação ou sucussão da solução. Com esse procedimento, acredita-se que as moléculas da substância medicinal atritar-se-iam com as do diluente e, essa operação combinada à diluição, promoveria a liberação dos poderes medicinais latentes no interior da substância bruta (RUIZ. 1999).

Hahnemann também utilizou substâncias tóxicas e venenosas, em doses diluídas e sucussionadas, com finalidade terapêutica, já que pelo princípio de Paracelso (1493-1541), toda substância possui uma parte boa e uma má e que a parte boa tem a capacidade de curar uma enfermidade (RUIZ. 1999).

Vários estudos demonstram o efeito da homeopatia na imunologia, como, por exemplo, no tratamento de infecções e alergias (GRIMMER, 1948; BOWEN, 1981; TAYLOR-SMITH, 1950; SHEPHERD, 1967 *apud* JONAS, JACOBS; 1996). Madeleine Bastide e outros pesquisadores relataram que diluições, de interferon e dos hormônios timulina e bursina, agitadas em série, aumentam a taxa de glóbulos brancos e outras funções imunológicas em animais (DAURAT, 1986; BASTIDE, 1985; 1987 *apud* JONAS, JACOBS; 1996).

1.3 MEDICAMENTO CANOVA

O medicamento Canova é uma especialidade farmacêutica desenvolvida a partir das seguintes tinturas conhecidas na farmacopéia homeopática brasileira 2ª edição - 1997: *Aconitum napellus*, *Bryonia alba*, *Thuja occidentalis*, *Lachesis muta* e *Arsenicum album* diluídos em água destilada e menos de 1% de álcool (www.canovado brasil.com.br).



Aconitum napellus



Bryonia alba



Thuja occidentalis



Lachesis muta



Arsenicum album

Esse medicamento vem sendo estudado em nosso laboratório desde 1997, quando tomamos conhecimento que pacientes o estavam utilizando e obtendo resultados clínicos, que serão citados a seguir, os quais sugeriam uma possível atuação em macrófagos. Desde então, experimentos vêm sendo realizados com o intuito de obter esclarecimentos sobre suas propriedades e mecanismo de ação.

Estudos com animais de experimentação demonstraram que o medicamento Canova é totalmente inócuo, não sendo detectada dose letal média (DL50), mesmo quando uma dose injetável 100 vezes maior que a dose habitual foi utilizada. Esse medicamento também não apresenta genotoxicidade nem mutagenicidade identificável em nível cromossômico (SELIGMANN et al. 2002). Outros estudos em animais demonstraram que esse medicamento é eficaz no controle de infecções causadas por certos protozoários, controlando a progressão e limitando a disseminação (PEREIRA et al. 2004 *in press*). No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que o medicamento não atua diretamente contra bactérias, fungos, parasitas e células cancerosas mantidas em cultura. Isso sugere que o produto atua no organismo como um todo, aumentando as defesas, evitando as infecções de diversos tipos e atuando através de um mecanismo imunomodulador.

Estudos realizados em nosso laboratório, em animais normais e portadores de sarcoma 180, demonstraram que camundongos tratados com o Canova *in vivo* apresentaram um aumento dos leucócitos totais, elevando significativamente o número de linfócitos, entre eles os subtipos B, T (CD4 e CD8) e NK (*natural killer*), no sangue periférico (SATO et al. 2005).

Foi demonstrado também que camundongos tratados com o Canova apresentaram retardo na pega tumoral do sarcoma 180, além de diminuição no volume do tumor, com 30% de regressão. Também ocorreu aumento do infiltrado inflamatório peritumoral além de fibrose peritumoral (WAL. 2002; SATO et al. 2005).

Outros estudos indicaram que o tratamento com o medicamento Canova em macrófagos peritoneais de camundongos tratados *in vitro* e *in vivo* resultou no aumento significativo da relação macrófagos ativados/residentes em comparação ao grupo controle; alterou a expressão e a distribuição de integrinas de membrana, diminuiu a produção da citocina TNF α (PIEMONTE, 2000 e 2002), além de estimular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, evidenciando um processo de ativação celular (GODOY, 2002). Logo, esse medicamento apresenta ação comprovada sobre macrófagos, provavelmente atuando através desse tipo celular.

Estudos clínicos fundamentam a ação imunomoduladora desse medicamento, pois demonstraram diminuição da carga viral e de doenças oportunistas de pacientes portadores de HIV/AIDS (SASAKI et al. 2001).

O Laboratório Canova do Brasil é uma empresa totalmente nacional e paranaense, que detém a patente internacional do medicamento desde 8 de maio de 2001, garantindo os direitos de produção e comercialização do Canova no Brasil e em outros países (DEL VECCHIO, M; BUCHI, D.F, 2002).

Sua preparação e comercialização são regidas pela Lei n° 6360 de 23/09/76, em seu artigo 23, alíneas I e II, parágrafo único, e regulamentadas pelo Decreto n° 79094 de 05/01/77, em seu artigo 28, alíneas I e IV, parágrafo único, que determinam que sejam fornecidos ao Ministério da Saúde, informações e dados elucidativos sobre seus produtos (CANOVA DO BRASIL, 2001).

O Canova é produzido e comercializado nas formas de gotas, inalante e injetável apenas por farmácias e laboratórios autorizados, sob rigoroso controle de qualidade.

Já que apresenta ação imunomoduladora, o medicamento Canova é indicado em patologias em que o sistema imunológico do indivíduo encontra-se comprometido, tais como hepatite C, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e neoplasias, podendo ser utilizado sozinho ou em associação a outros medicamentos terapêuticos.

2. JUSTIFICATIVA

Resultados clínicos positivos em tratamentos de câncer e AIDS, além do aumento de certas populações celulares hematopoiéticas, após o tratamento com o Canova e resultados laboratoriais positivos em macrófagos tornam pertinente testar esse medicamento em outras células do sistema imune. A medula óssea contém grande quantidade de monócitos, bem como macrófagos diferenciados no estroma, sendo um órgão crítico para o sistema imune, já que é a fonte de todas as células sanguíneas. Portanto, é necessário o estudo da ação do Canova sobre esse sistema, bem como sobre as células que aí se diferenciam.

Como o Canova é um medicamento imunomodulador, fazendo com que o organismo retorne a parâmetros normais quando alterado, é importante primeiramente estudar a ação desse medicamento na medula óssea de animais saudáveis.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo verificar os efeitos do composto medicamentoso homeopático Canova sobre células da medula óssea de camundongos, cultivadas *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a morfologia das células presentes no sobrenadante e das aderentes, nas culturas de medula óssea de camundongos;
- Verificar a morfologia detalhada das células aderentes, utilizando microscopia eletrônica de varredura;
- Verificar a presença de receptores de membrana, na população aderente, indicativos de linhagens celulares específicas, na microscopia confocal;
- Verificar diferenças nas populações celulares presentes no sobrenadante das culturas, utilizando citometria de fluxo;
- Quantificar citocinas presentes no sobrenadante dos cultivos, utilizando citometria de fluxo;
- Verificar se o tratamento com o Canova modifica os parâmetros citados acima.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), machos, de 3 meses de idade, pesando entre 25 e 35g, mantidos sob temperatura ideal e que receberam água e ração *ad libitum*. Estes animais foram cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA N° 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N° 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, certificou que os procedimentos utilizando animais neste trabalho estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)” (Anexo 1).

Neste trabalho foram usados, aproximadamente 150 animais, sendo que em cada experimento foi utilizado um *pool* de células da medula óssea de, no mínimo, 5 camundongos.

4.2 COLETA CELULAR

Para cada coleta foram utilizados, no mínimo, 5 camundongos para que se obtivesse um *pool* celular, os quais foram anestesiados com éter etílico 98% e então sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Os fêmures direito e esquerdo foram retirados, levados para o fluxo laminar, as epífises cortadas e a medula retirada com 2 ml de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), acrescido de soro bovino fetal 10%. Essa suspensão celular foi transferida para tubo de centrífuga, os grumos despeitados e então centrifugada a 2.800 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 10 ml de meio de cultura. Foi realizada então a contagem celular.

4.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS OBTIDO

Para determinação do número de células obtido foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão celular obtida na coleta em líquido de Turck - ácido acético 2% (v/v) com violeta genciana - Newprov[®]. Após a hemólise, foi determinado o número de células em cada amostra, através da contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz - Nikon[®].

4.4 CULTIVO CELULAR

As células foram cultivadas em garrafas ou placas multiposos estéreis - TPP[®] e os cultivos celulares mantidos em estufa *Hotpack*[®] a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, durante o período determinado para cada experimento. Como meio de cultura padrão, foi utilizado DMEM, acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) termoinativado, 200 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2,6 µg/ml de anfotericina.

4.5 TRATAMENTO COM CANOVA E COM M-CSF *in vitro*

O tratamento com o Canova, na forma injetável, foi efetuado após o término do plaqueamento, na concentração de 20% (v/v) em relação ao meio de cultura. Após 24 horas, foi feito o reforço do tratamento, adicionando-se mais 1% do medicamento em relação ao meio de cultura. Estas doses de reforço foram adicionadas diariamente até o término do experimento. Controles: a) como controle positivo, utilizou-se o tratamento com o fator estimulador de colônia de monócito/macrófago, M-CSF, da mesma maneira que para o Canova, mas estas células não receberam doses reforço diárias; b) o grupo considerado controle constituiu-se de células que não receberam tratamento algum.

O fator de crescimento M-CSF foi produzido por fibroblastos tumorigênicos de camundongos (células L929) e cedido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

4.4.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS - CULTURA LÍQUIDA

4.4.1.1 Morfologia

Para estes experimentos, as culturas foram estabelecidas em placas de 24 poços e a concentração celular foi ajustada para $2,5 \times 10^5$ células/ml, por poço. Como o objetivo desse experimento foi a análise de todas as populações celulares, tanto as presentes no sobrenadante, quanto as aderidas, lamínulas estéreis foram colocadas nos poços, no início do experimento, o que permitiu a análise das células aderentes.

As placas foram subdivididas para que contivessem todos os tempos propostos para análise (24, 48, 72 e 96 horas). Foram preparados poços controles, tratados com o Canova e tratados com M-CSF, em duplicata. A cada dia de experimento, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram montadas, o que permitiu a análise das células do sobrenadante da cultura e das células aderentes.

Para a análise das células do sobrenadante da cultura, utilizou-se o método do citograv (DAY et al. 1995). Sua montagem está descrita no Anexo 3.

Após o período de incubação, as lamínulas com as células aderentes foram retiradas dos poços, lavadas com PBS, fixadas com Bouin`s Fixative – Electron Microscopy Sciences[®] - por 5 minutos e lavadas com água destilada. A coloração foi a mesma utilizada para as células do sobrenadante (Anexo 4). Após a montagem das lâminas, as células foram analisadas ao microscópio Nikon[®] Eclipse E-200 e as imagens foram capturadas pela máquina fotográfica digital Nikon[®] Coolpix 4.500.

4.4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Novamente a cultura foi realizada em uma placa de 24 poços. Como o objetivo deste experimento era a análise das células aderentes, os poços continham lamínulas de vidro estéreis.

O tempo de cultura escolhido para este experimento foi o de 72 horas, já que a análise dos experimentos de microscopia de luz havia demonstrado diferenças entre os grupos, após esse tempo. As células foram então preparadas para a microscopia eletrônica de varredura seguindo o protocolo de rotina (Anexo 5), e

analisadas com auxílio do microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV SEM, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.4.1.3 Microscopia Confocal

Para esse experimento, foi montada uma placa de 24 poços da mesma maneira que para a microscopia eletrônica de varredura já que o objetivo aqui, também era análise da população medular aderente. Diferentemente da microscopia eletrônica, o ensaio foi realizado após 12 dias de cultura, porque, após a realização de experimentos pilotos, verificou-se que, nesse tempo de cultura, as células não se soltavam após as lavagens necessárias para esse experimento. Foram montados poços controles e tratados com o Canova e, a cada três dias de cultura, foram adicionados 100µl de DMEM a cada poço.

Foi, então, realizada a imunomarcagem como descrita no Anexo 6.

Nesse ensaio foram utilizados cinco anticorpos do sistema *Mouse Lineage Panel* (BD/Pharmingen) e o anti-CD11c (marcador de células dendríticas) (BD/Pharmingen). Os anticorpos que compõem o sistema são: anti-CD3e (marcador de linfócitos T - o anticorpo CD3e é específico para a cadeia epsilon do complexo CD3); anti-CD45R (B220) (marcador de linfócitos B); anti-CD11b (Mac-1) (marcador de monócitos/macrófagos); anti-Ly-6G (Gr-1) (marcador da série granulocítica); anti-TER-119 (Ly-76) (marcador da série eritrocítica). Todos os anticorpos primários são biotinizados. Como segundo passo, usou-se estreptavidina conjugada ao fluorocromo ficoeritrina. A estreptavidina apresenta afinidade pela biotina presente nos anticorpos primários, funcionando como um revelador. O núcleo das células foi corado com DAPI (4,6 – diamidino – 2 – fenilindole, dihidroxicloride) na concentração de 300nM. Após o experimento, as células foram analisadas com auxílio do Microscópio Confocal Radiance 2001 (Bio-Rad®) acoplado à Eclipse E800 (Nikon®). A ficoeritrina foi excitada pelo laser de íon argônio a 488nm e o DAPI pelo laser *blue diode* a 350 nm.

4.4.1.4 Imunofenotipagem

Após a centrifugação do *pool* de células da medula óssea, uma alíquota foi retirada para verificar quais populações e em quais quantidades estariam presentes na medula óssea *in situ*. Essa alíquota foi considerada como tempo zero.

Para esses experimentos foram utilizadas garrafas de cultivo de 25 cm². Foram montadas garrafas para os tempos de 48, 72 e 96 horas, nas quais as células foram adicionadas na concentração de 8×10^7 células/ml. Precisa ser uma quantidade celular grande, pois se não estiverem próximas umas das outras, não sobrevivem. O objetivo deste experimento foi análise das populações celulares presentes no sobrenadante da cultura.

Após os períodos determinados, as culturas foram interrompidas e imunomarcadas (Anexo 7). Foi realizada, então, a imunofenotipagem pelo Citômetro de Fluxo FACSCalibur equipado com o laser de íon argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho (FSC – *forward scatter*) e complexidade interna (SSC – *side scatter*), detectores de emissão de fluorescência FL1 (515-545 nm), FL2 (564-606 nm) e FL3 (>670 nm). Um total de 10.000 eventos foi verificado pelo aparelho e foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima de 1% da linha limite. Os dados foram analisados pelo *software Cell Quest* e adquiridos na forma linear para o parâmetro dispersão e na forma logarítmica para o parâmetro de fluorescência.

Os anticorpos foram os mesmos utilizados para análise celular por microscopia confocal, sendo que a ficoeritrina foi detectada pelo canal FL2.

4.4.1.5 Quantificação de Citocinas

Para esse experimento também foi utilizada placa de 24 poços, contendo poços controles e tratados com o Canova. Foi realizado apenas em ensaio e a cultura foi interrompida após 96 horas. O objetivo desse experimento foi análise das citocinas produzidas pelas células, presentes no sobrenadante da cultura. Para esse experimento foi utilizado o sistema comercial *Mouse Th1/Th2 cytokine CBA* (BD/Pharmingen), o qual contém anticorpos contra as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, INF- γ e TNF- α . A incubação foi realizada de acordo com o protocolo descrito no Anexo 8 e a presença de citocinas foi verificada pelo FACSCalibur. Os resultados foram adquiridos e analisados de acordo com as instruções do sistema.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MORFOLOGIA

5.1.1 Células aderentes

TABELA 2: SUMÁRIO DOS RESULTADOS DA MICROSCOPIA DE LUZ

ADESÃO E ESPRAIAMENTO	48h	72h	96h
CONTROLE	+	++	+++
CANOVA	++	++++	+++++

TABELA 3: CONTAGEM DAS CÉLULAS ADERENTES SOB MICROSCOPIA DE LUZ

	grupo controle			M	DP	grupo Canova			M	DP
48h	21	16	33	23,33	8,74	37	79	76	64,00	23,43
72h	59	42	50	50,33	8,50	45	82	84	70,33	21,96
96h	36	60	37	44,33*	13,58	77	88	79	81,33*	5,86

#as células quantificadas foram as que apresentaram morfologia ativada; M – média e DP – desvio padrão * $p < 0,05$

Observou-se maior número de células da medula óssea, aderidas (Figuras 2 à 5) e espaiadas, no grupo cultivado em presença do medicamento Canova. Também se observou grande quantidade de pequenas células, em grupos, sobre essas células aderentes (ninhos). As células aderidas e espaiadas correspondem principalmente a macrófagos (ver resultado confocal). A diferença entre as imagens dos grupos é bem evidente e isso pode ser explicado já que os macrófagos são as células sobre as quais o Canova atua. Os grupos de pequenas células aderidas sobre a camada aderente (ninhos) sugerem que as células estromais cultivadas com o Canova produzem mais citocinas necessárias à maturação das células sobrenadantes e essas formam os ninhos, o que pode estar concretizando sua maturação. Como se sabe que o Canova atua em macrófagos, células produtoras de diversas citocinas e fatores de crescimento, um suprimento, pelo menos parcial, de algumas das moléculas necessárias, pode estar ocorrendo.

Apesar das imagens demonstrarem grande diferença entre os grupos a análise estatística mostrou que existe diferença significativa, com relação a quantidade de células ativadas, apenas após 96 horas de cultivo (Anexo 2, Tabela

3). Talvez, se houvesse mais repetições desse experimento, a diferença estatística entre os grupos aparecesse em outros tempos de cultura. A análise estatística utilizada foi o teste *t* com o nível de significância de 5% (Anexo 2).

IMAGENS DAS CÉLULAS ADERENTES DA MEDULA ÓSSEA APÓS 48 HORAS DE CULTIVO

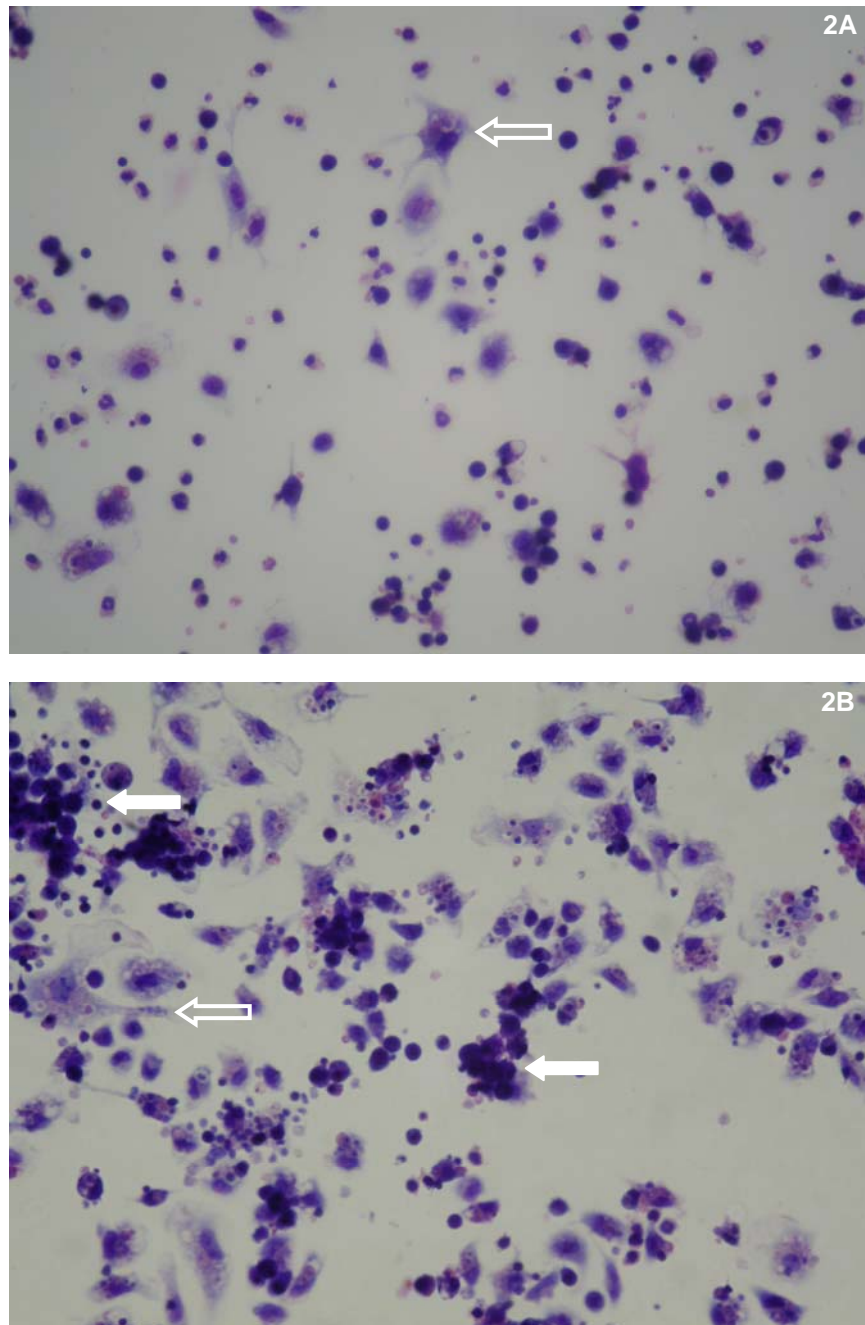


Figura 2: 2A Controle e 2B Canova - 400x; seta vazia - célula espreada e seta cheia - ninho

Após 48 horas de cultura observa-se maior número de células da medula óssea, aderidas e espaiadas (seta vazia), no grupo cultivado em presença do medicamento Canova (Tabela 3). Também se observa grande quantidade de pequenas células, em grupos (ninhos) (seta cheia), sobre as aderentes.

IMAGENS DAS CÉLULAS ADERENTES DA MEDULA ÓSSEA APÓS 72 HORAS DE CULTIVO

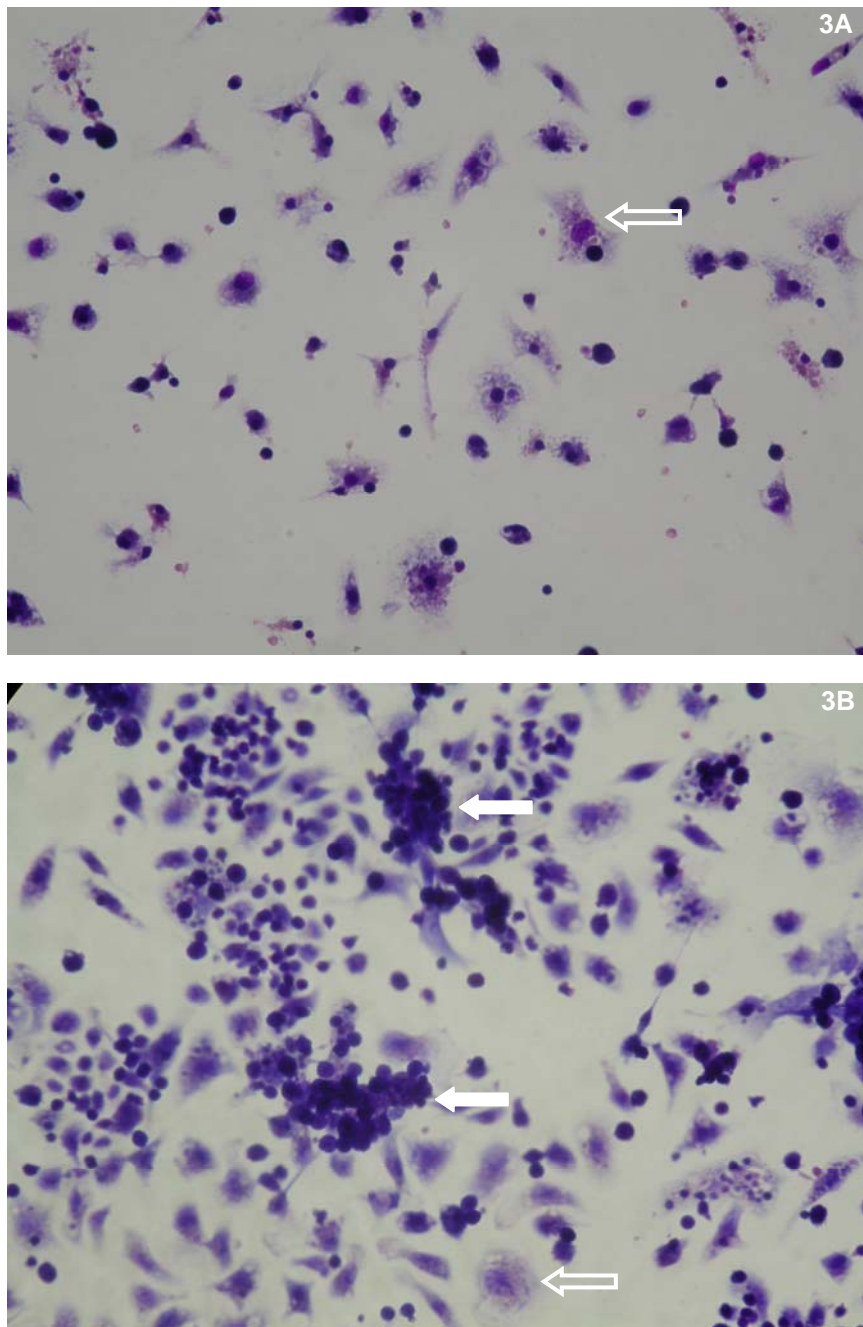


Figura 3: 3A Controle e 3B Canova - 400x; seta vazia - célula espaiada e seta cheia - ninho

Após observação das células com 72 horas de cultura verificou-se que a diferença na quantidade de células aderidas e espiadas é ainda maior (Tabela 3). As áreas contendo grupos de células sobre as aderentes (ninhos) são maiores, sugerindo locais de maturação celular.

IMAGENS DAS CÉLULAS ADERENTES DA MEDULA ÓSSEA APÓS 96 HORAS DE CULTIVO

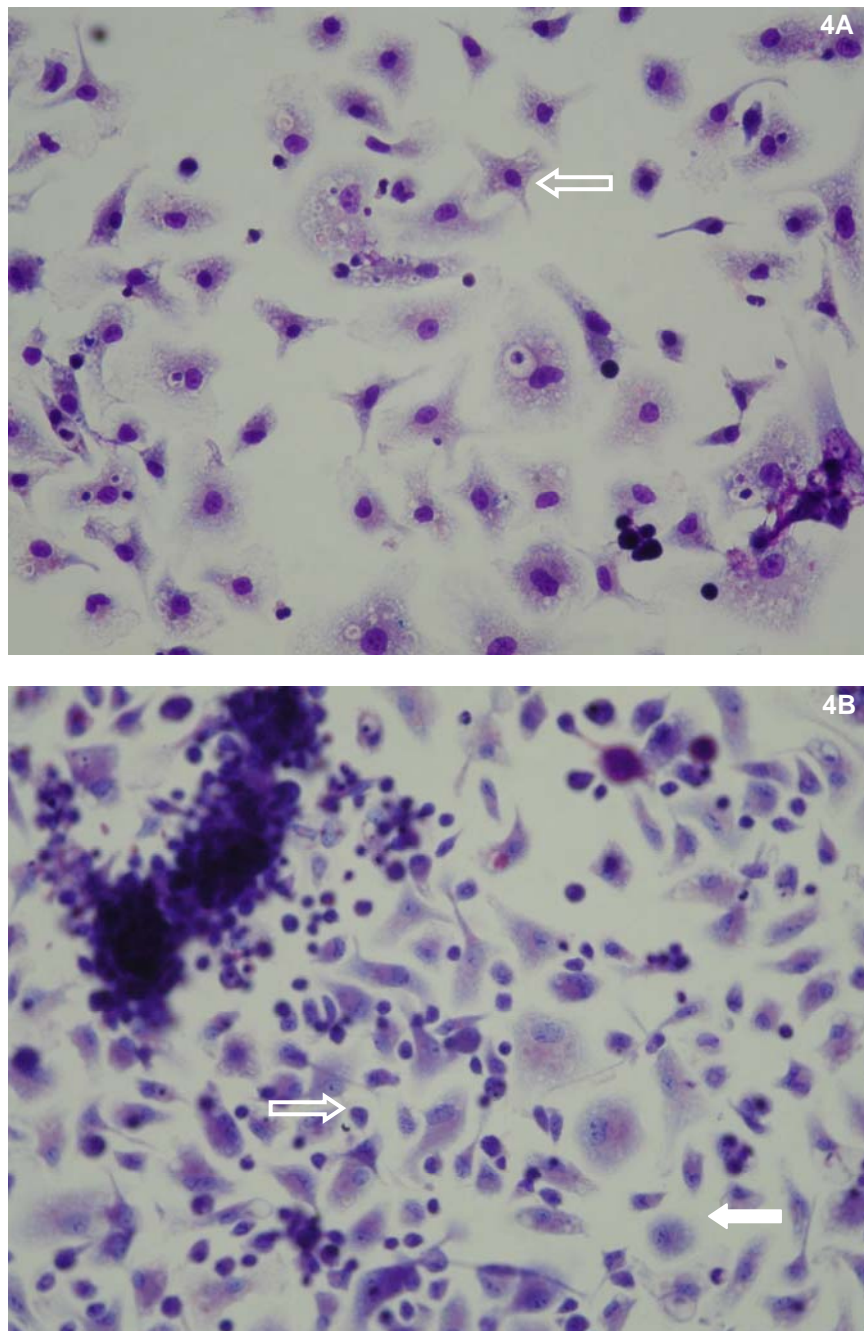


Figura 4: 4A Controle e 4B Canova - 400x; seta vazia - célula espiada e seta cheia - ninho

IMAGENS DAS CÉLULAS ADERENTES DA MEDULA ÓSSEA APÓS 96 HORAS DE CULTIVO

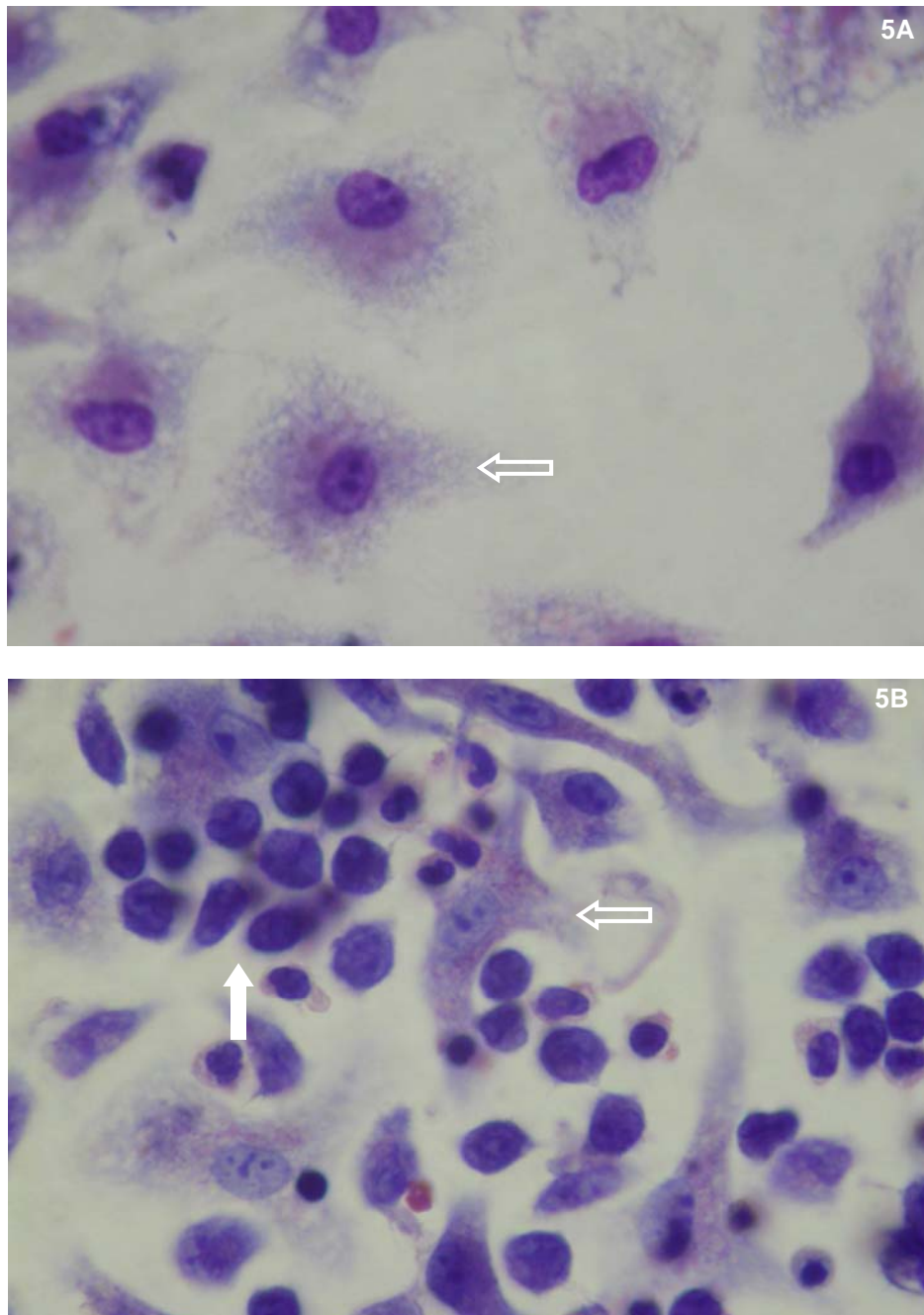


Figura 5: 5A Controle e 5B Canova - 1000x; seta vazia - célula espreada e seta cheia - ninho

Após 96 horas de cultura, a diferença na quantidade (Tabela 3) e morfologia das células aderidas é ainda maior. Isso indica que o medicamento Canova é dose e tempo dependente (PIEMONTE, 2002). A Figura 5B mostra detalhadamente um

ninho e a diferença na morfologia de suas células quando comparadas a das aderentes.

Mesmo que junções *gap* funcionais, entre as células estromais e leucócitos, sejam raras (ALLEN & DEXTER. 1984) ou inexistam (DORSHKIND et al. 1993; ALVES et al. 1991 *apud* CANCELAS et al. 2000) está ocorrendo algum tipo de junção entre essas células, podendo ser apenas de contato mecânico (adesão). Esse contato estaria promovendo a formação dos ninhos o que facilitaria a diferenciação celular. Já que o Canova atua sobre os macrófagos, pode estar induzindo a produção de substâncias por essas células as quais estariam agindo sobre as células dos ninhos, por meio de receptores específicos, facilitando a formação dessas áreas.

5.1.2 Células do sobrenadante da cultura (citograv)

Após a análise com microscopia de luz das células do sobrenadante da cultura, verificou-se que o tratamento com o medicamento Canova e o tempo de cultivo não alteraram a morfologia dessas células. O que se verificou foi a presença de células em divisão, aparentemente em maior número, no grupo controle positivo (M-CSF) (Figura 6B e 6C).

CÉLULAS DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE MEDULA ÓSSEA

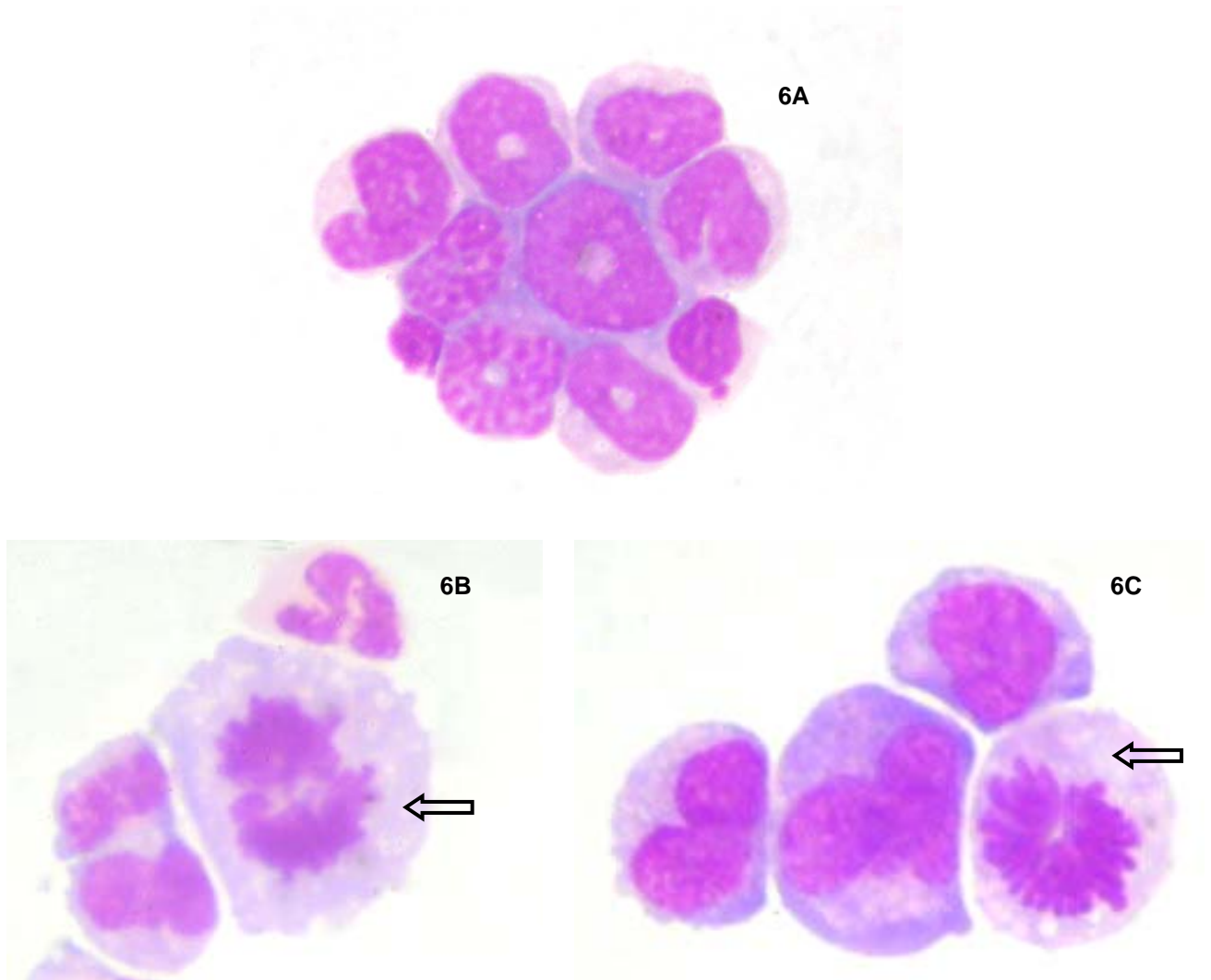


Figura 6: 6A Controle, 6B e 6C Controle positivo (M-CSF) - 1000x; seta – células em mitose

Como o grupo controle positivo, aparentemente, apresentou um maior número de células em divisão, confirmou-se a ação desse fator de crescimento sobre essas células. Como o M-CSF estimula monócitos e macrófagos, essas células em divisão, provavelmente, são da série mononuclear.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Após a análise do material na microscopia de luz convencional, foi escolhido o tempo de 72 horas de cultivo, por ser o mais representativo, para a análise na microscopia eletrônica de varredura.

Após o ponto crítico e metalização, o material foi visualizado no microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM – 6360 LV SEM localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

TABELA 4: SUMÁRIO DOS RESULTADOS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

ADESÃO E ESPRAIAMENTO	CONTROLE	CANOVA	M-CSF
72h	+	+++	+++++

**ELETROMICROGRAFIAS DE VARREDURA DAS CÉLULAS ADERENTES DA
MEDULA ÓSSEA APÓS 72 HORAS DE CULTIVO**

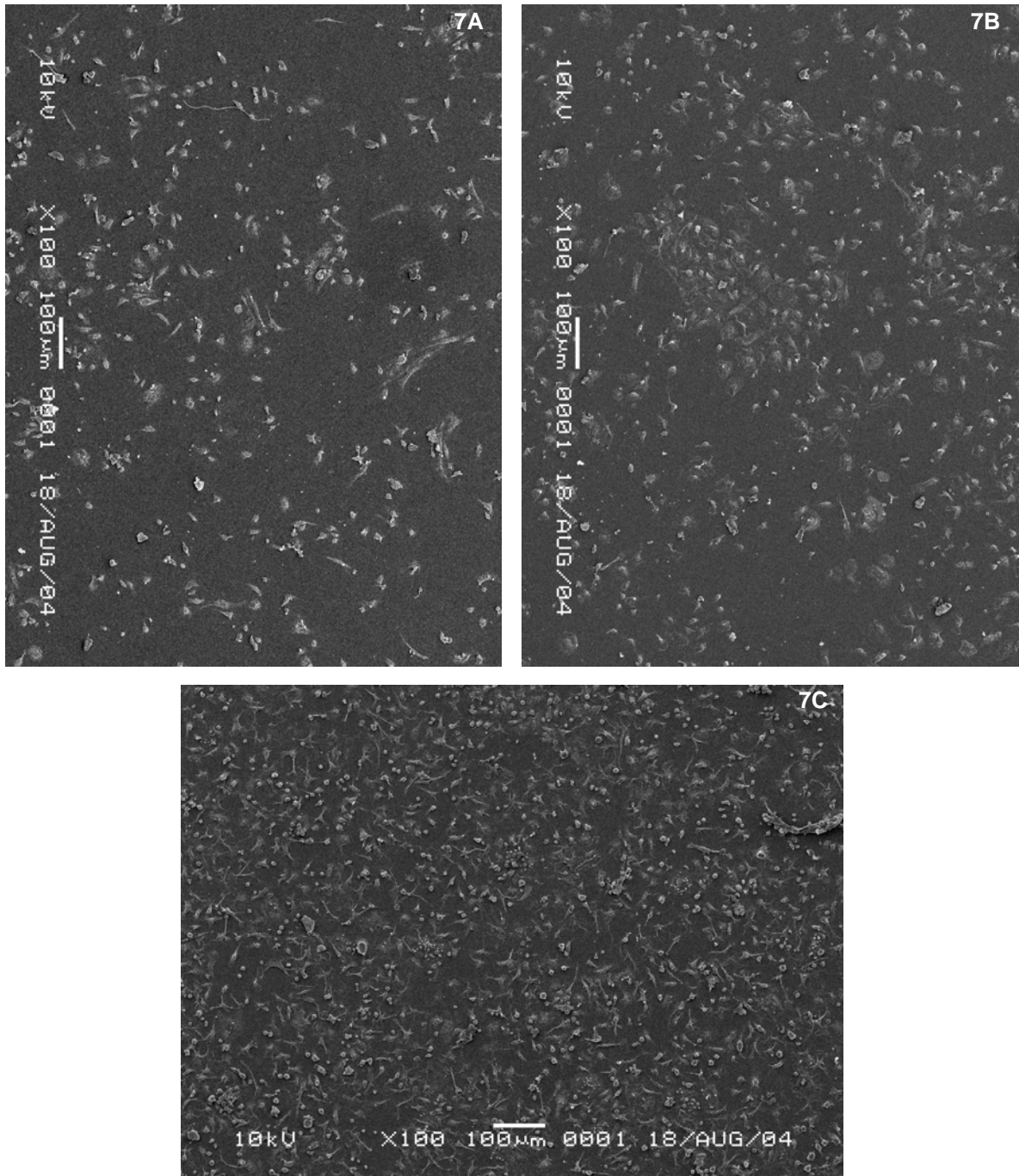


Figura 7: 7A Controle; 7B Canova e 7C M-CSF – 100x

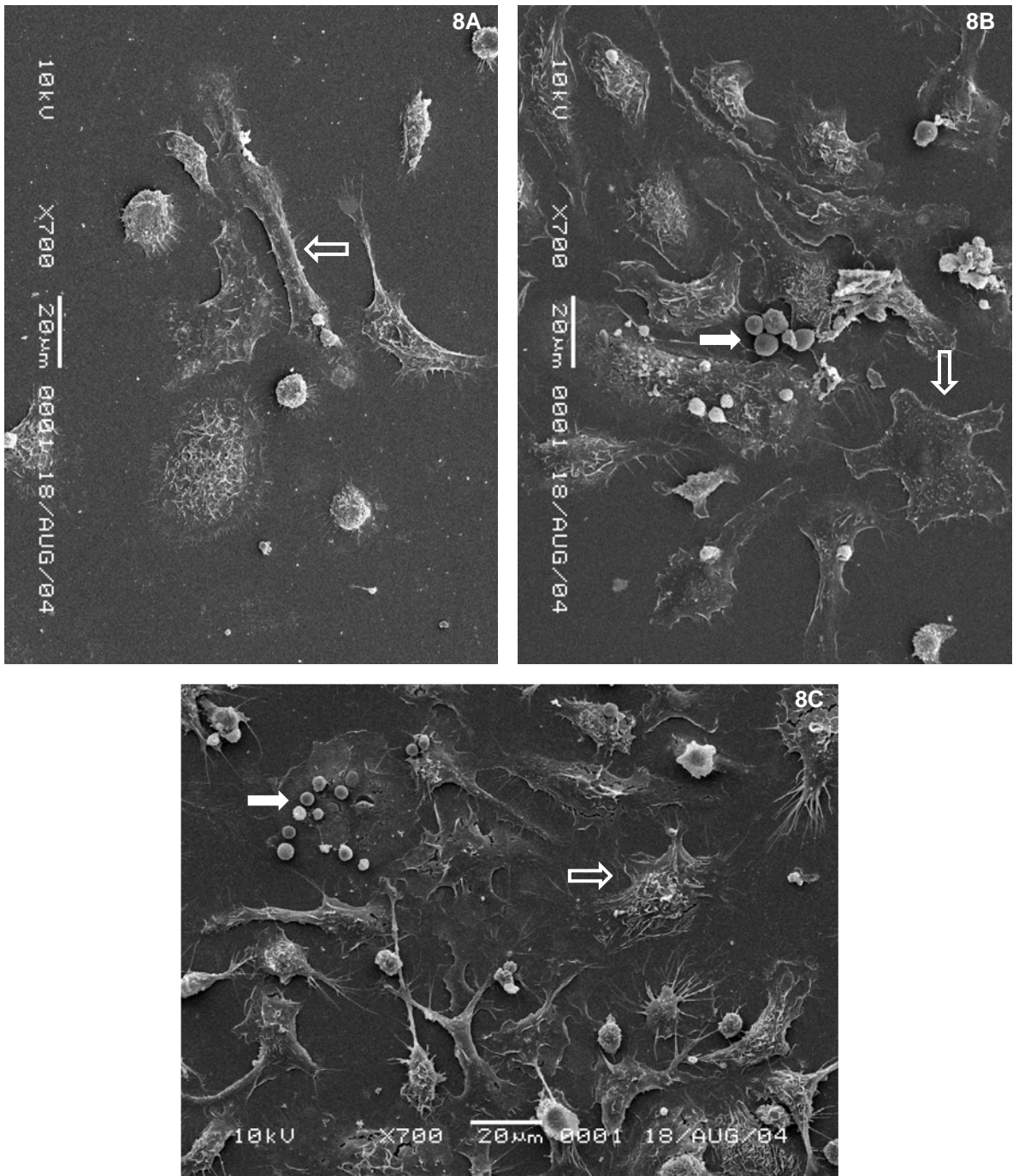
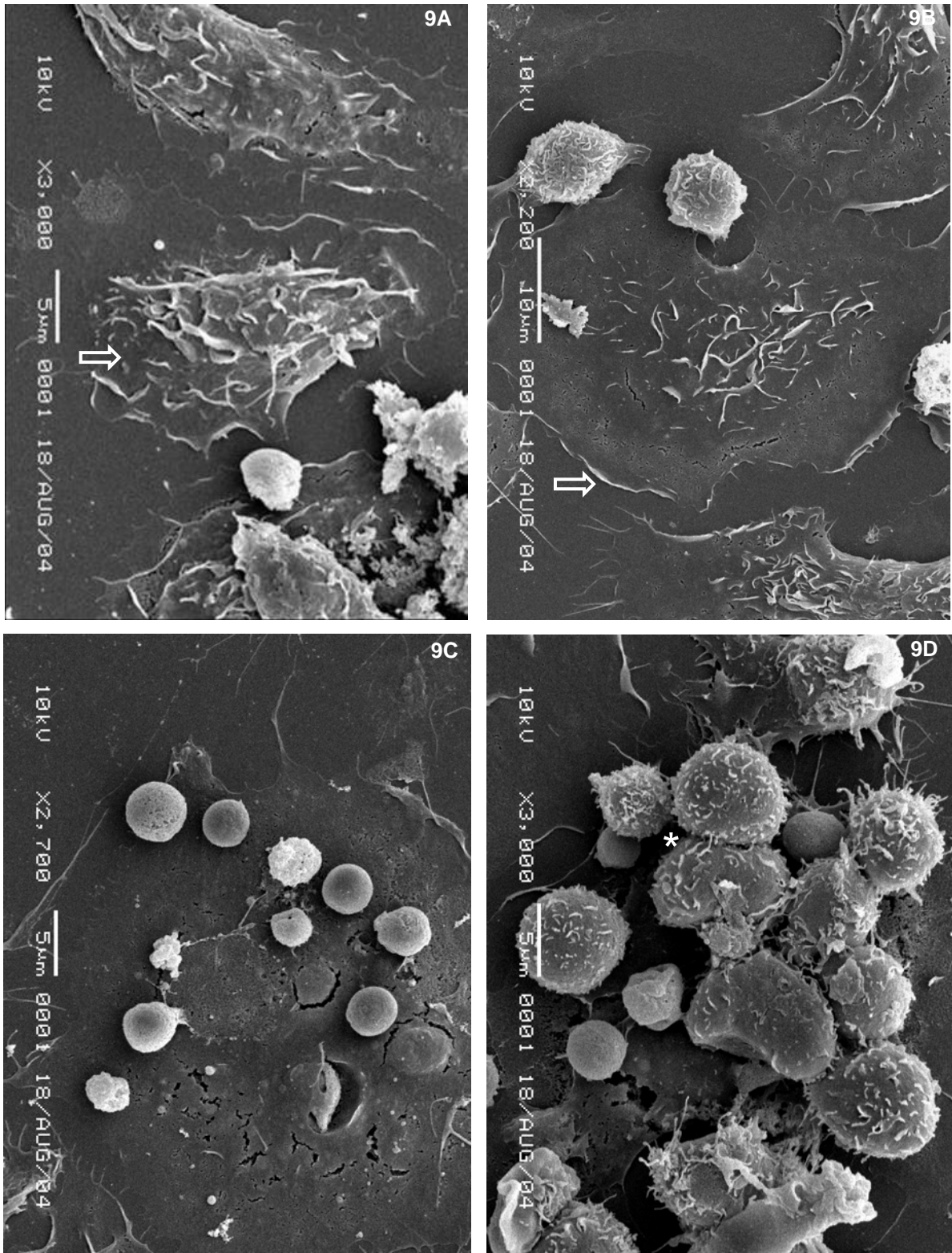


Figura 8: 8A Controle; 8B Canova e 8C M-CSF – 700x; seta vazia - célula espreada e seta cheia - ninho



**Figura 9: 9A Controle – 3.000x; 9B Canova – 2.200x; 9C M-CSF – 2.700x; 9D M-CSF – 3.000x;
seta vazia - célula espraçada; * local de adesão entre as células**

A análise das culturas em microscopia eletrônica de varredura mostrou que existe grande diferença entre os tratamentos, tanto em relação à adesão quanto à morfologia celular. A quantidade de células aderidas no controle é menor que no grupo Canova (Figuras 7A e 7B). Em relação ao tamanho, as células do grupo controle apresentaram-se menores e menos espaiadas que as do grupo Canova (Figuras 8A e 8B). Esse resultado sugere que o Canova age sobre a adesão e ativação das células aderentes da medula óssea. As células aderentes apresentam diversidade morfológica, mas, de acordo com Dexter e cols. 1976, com o tempo de cultura utilizado, as células que se aderem são, principalmente, fagócitos mononucleares, com numerosas extensões citoplasmáticas e que tendem a se espaiar. Essa informação foi confirmada com os resultados do experimento de imunofluorescência para microscopia confocal.

O grupo controle quase não apresenta os ninhos e, no grupo Canova eles estão presentes, aparentemente, em maior quantidade. Isso sugere que o tratamento com Canova estimula a produção de substâncias semelhantes a fatores de crescimento, resultando em um maior número de áreas de maturação celular, dado demonstrado pelos ninhos celulares sobre a camada aderente. Essas áreas de provável maturação são, aparentemente, maiores e mais numerosas no grupo Canova e, através da microscopia eletrônica de varredura, é possível observar a comunicação entre essas células (Figura 9D). Esses ninhos podem conter células tronco que ainda não estão se diferenciando (FUCHS et al. 2004) e/ou células já comprometidas com alguma linhagem celular.

As células da medula óssea, cultivadas em presença de M-CSF, controle positivo, mostraram-se as mais espaiadas e com maior quantidade de ninhos (Figuras 9C e 9D).

5.3 MICROSCOPIA CONFOCAL

CÉLULAS CONTROLE DA MARCAÇÃO NAS QUAIS OMITIU-SE O ANTICORPO PRIMÁRIO

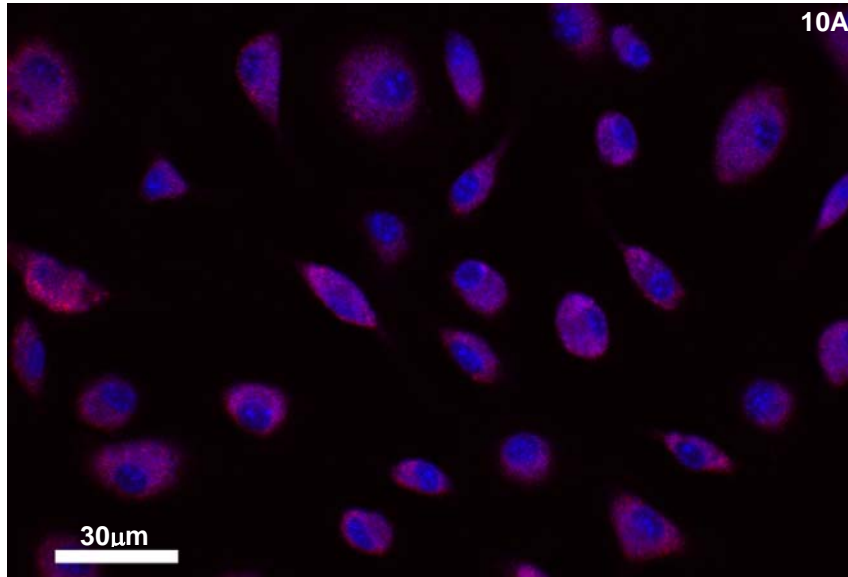


Figura 10: 10A Controle da fluorescência - 600x

MARCAÇÃO DO RECEPTOR CD11b, PREFERENCIALMENTE MONÓCITOS/MACRÓFAGOS

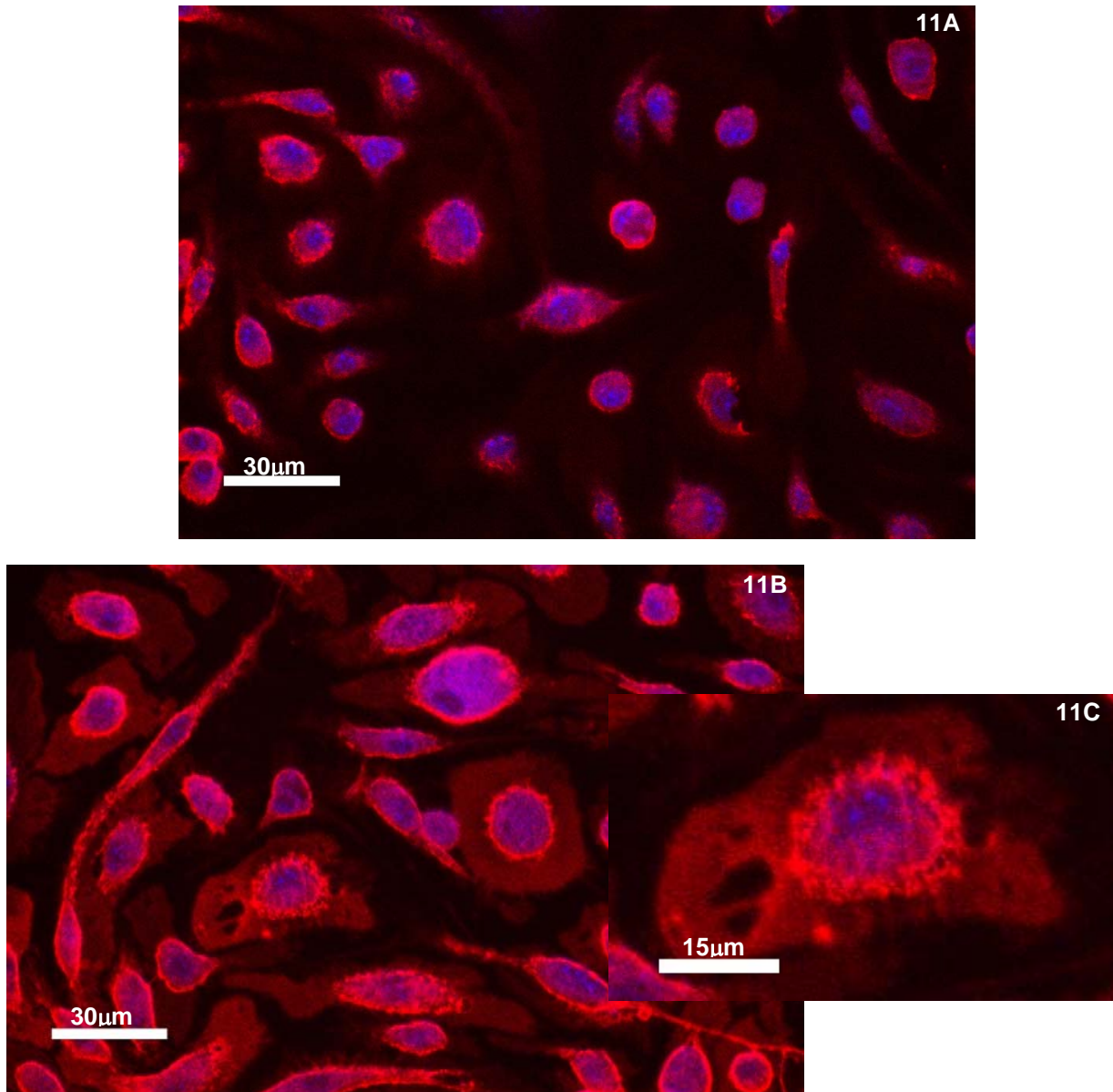


Figura 11: 11A Controle; 11B e 11C Canova - 600x

Aparentemente, não foi encontrada diferença no perfil de marcação entre os grupos, indicando que o Canova parece não alterar a expressão desse marcador de superfície celular. Verificou-se um aumento na adesão e espraiamento das células tratadas com Canova. Notar o padrão de expressão da integrina CD11b, a qual se apresenta em *clusters* sobre as células (Figura 11C). Com esse experimento pode-

se dizer que a maioria das células que estão aderidas expressa CD11b em sua superfície.

MARCAÇÃO DO RECEPTOR CD11c, PREFERENCIALMENTE CÉLULAS DENDRÍTICAS

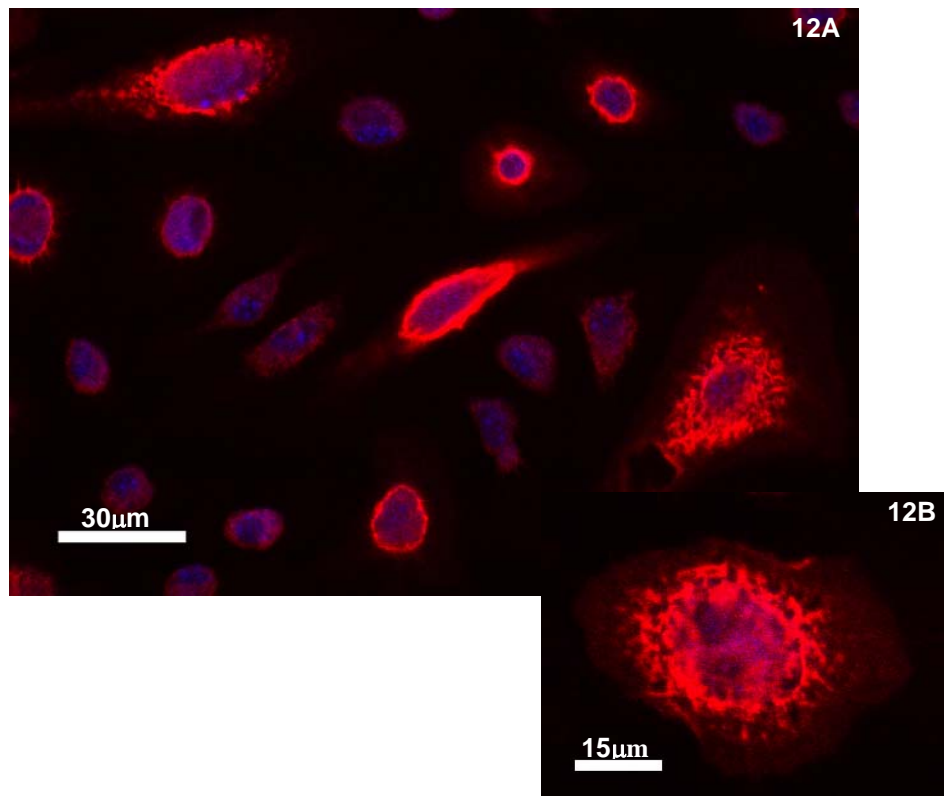


Figura12: 12A e 12B Controle - 600x

Aparentemente, não ocorreu diferença no perfil de marcação entre os grupos, novamente. O que se verifica é uma quantidade menor de células marcadas quando se comparam estes resultados com os do marcador CD11b. Logo, as células dendríticas estão aderidas em menor quantidade que os macrófagos. Sabe-se que as células dendríticas quando imaturas apresentam-se aderidas e quando atingem a maturidade se desprendem. É provável que essas células que apresentam maior quantidade de CD11c sejam dendríticas imaturas, já que este tipo celular precisa de duas semanas em cultura e fatores de crescimento adicionais para tornar-se maduro e, na ausência desses fatores adere-se (CITTERIO et al. 1999).

Não houve diferença na morfologia dessas células entre os grupos, logo, o Canova não agiu sobre as células dendríticas aderidas como sobre os macrófagos, confirmando novamente a ação específica sobre essas células.

Aparecem também células com fluorescência de menor intensidade, as quais podem ser macrófagos, já que esses também apresentam o marcador CD11c, em menor quantidade, em sua superfície.

Outra característica verificada nessas imagens é a diferença na expressão desse marcador. Esse se apresenta como uma rede na superfície celular, diferente do CD11b que se apresenta em *clusters*.

As células que foram incubadas com os anticorpos para os outros marcadores, não mostraram reação positiva em nenhum dos grupos, isso indica que não existem células CD45R⁺, Ly-6G⁺, CD3⁺ e TER-119⁺ aderidas, após 12 dias de cultura.

É interessante verificar que nesse experimento não foram encontrados os ninhos celulares, provavelmente devido ao grande número de lavagens realizado nessa técnica, razão pela qual essas células não foram identificadas.

5.4 IMUNOFENOTIPAGEM

Foram realizados quatro experimentos independentes para cada tempo de cultura, utilizando os anticorpos já citados. Os valores numéricos apresentados são as médias das fluorescências, dos marcadores de linhagem, nesses experimentos e os gráficos mostrados são os mais representativos de cada marcador. Para a elaboração do gráfico de distribuição das células, de acordo com o tamanho e a complexidade, utilizou-se sempre o *gate R1* apresentado no gráfico de fluorescência (histograma). Com a análise do gráfico de distribuição celular também foi possível estimar a quantidade de células de cada população.

A análise estatística usada foi análise de variância (ANOVA) utilizando o delineamento inteiramente ao acaso, com o esquema fatorial 2x3, com 4 repetições. As tabelas dessas análises estão apresentadas no Anexo 9.

5.4.1 Populações celulares que não apresentaram alteração, na quantidade de marcadores, durante os experimentos

As células do sobrenadante das culturas, que apresentaram CD11b e Ly-6G em sua superfície, não demonstraram diferenças significativas entre os grupos e os tempos analisados. Isso indica que nem o tratamento com o medicamento Canova nem o tempo que foram mantidas em cultura estão influenciando a diferenciação, para uma possível adaptação à cultura, dessas populações celulares. Com esses resultados constatou-se também que esses tipos celulares se mantêm em cultura, até 96 horas, apenas com os fatores de crescimento existentes no soro, sem necessitar de fatores de crescimento adicionais. Dessa maneira, essas populações não proliferam, nem diminuem, apenas se mantêm.

5.4.1.1 CD11b (Mac-1)

O marcador CD11b se expressa em grande quantidade nos monócitos/macrófagos e granulócitos e, em menor quantidade, nas células T, B, dendríticas e *natural killer* (NK) (wwwbdbiosciences.com).

PERFIL CARACTERÍSTICO ENCONTRADO NAS CÉLULAS CD11b⁺

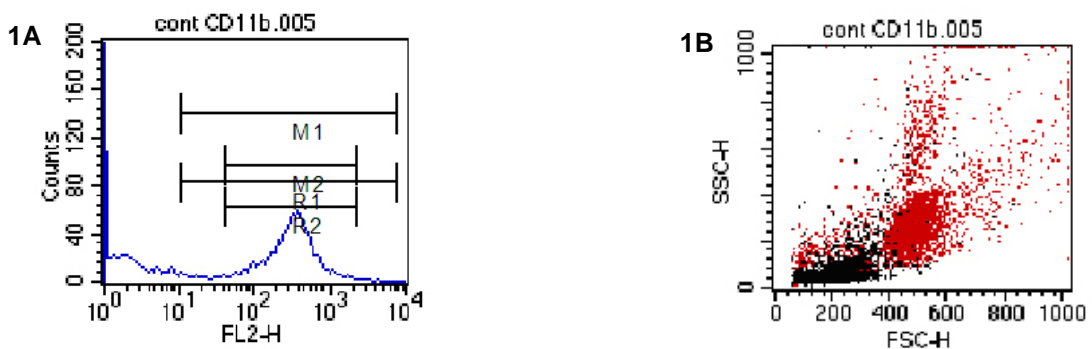


Gráfico 1A: eixo x – fluorescência emitida pelo marcador; eixo y – quantidade de células marcadas. R1 (*gate 1*), R2 (*gate 2*), M1 e M2 correspondem à mesma população celular delimitada pelos *gates* R1 e R2 respectivamente, mas, são utilizados para a realização da estatística

Gráfico 1B: eixo x – tamanho celular (FSC); eixo y – complexidade celular (SSC). Células em vermelho (que apresentam o respectivo marcador) correspondem à população delimitada pelo *gate* R1

Esse marcador apresentou uma fluorescência média de $65 \pm 7,29\%$ durante todo o desenvolvimento das culturas. Os gráficos de tamanho por granulosidade demonstraram uma população de células grandes e complexas (em vermelho), características de monócitos e macrófagos.

5.4.1.2 Ly-6G (Gr-1)

Na medula óssea, a quantidade de expressão desse marcador está diretamente relacionada com a diferenciação e maturação dos granulócitos, quanto mais madura a célula estiver, maior a expressão desse marcador (LAGASSE & WEISSMAN. 1996).

PERFIL CARACTERÍSTICO ENCONTRADO NAS CÉLULAS Ly-6G⁺

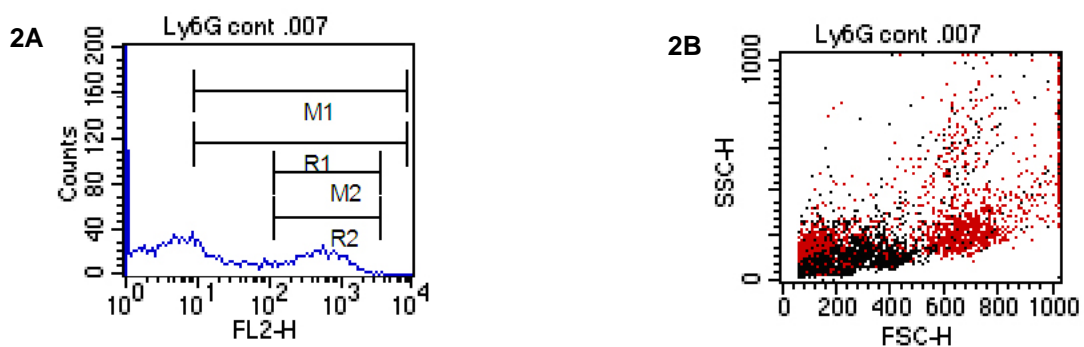


Gráfico 2A: eixo x – fluorescência emitida pelo marcador; eixo y – quantidade de células marcadas. R1 (*gate 1*), R2 (*gate 2*), M1 e M2 correspondem à mesma população celular delimitada pelos *gates* R1 e R2 respectivamente, mas, são utilizados para a realização da estatística

Gráfico 2B: eixo x – tamanho celular (FSC); eixo y – complexidade celular (SSC). Células em vermelho (que apresentam o respectivo marcador) correspondem à população delimitada pelo *gate* R1

As células Ly-6G⁺ também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de tratamento e tempos de cultura, demonstrando $60 \pm 8,9\%$ de fluorescência média. Os gráficos de tamanho por complexidade celular demonstraram uma população de células grandes (em vermelho). Essas células não apresentaram uma complexidade alta, característica dos granulócitos, provavelmente por estarem imaturas, na maioria.

A separação dos neutrófilos e monócitos é, particularmente, difícil. Provavelmente devido a sua origem comum, células mielóides, compartilham antígenos de superfície. Monócitos imaturos expressam altos níveis de Ly-6G na

medula óssea e essa expressão é diminuída quando atingem a circulação. Já os granulócitos imaturos apresentam pouca expressão desse marcador a qual vai aumentando de acordo com sua maturação (LAGASSE & WEISSMAN. 1996).

Os dados numéricos apresentados demonstraram que os marcadores Ly-6G e CD11b apresentaram praticamente a mesma expressão, não variando ao longo do desenvolvimento da cultura. Para verificar até quando esses marcadores se mantêm nessas células e em qual quantidade, seria necessário aumentar o período de experimento e também realizar um ensaio de dupla marcação para analisar a co-expressão.

5.4.2 Populações celulares que apresentaram alteração, na quantidade de marcadores, durante os experimentos

As fluorescências apresentadas pelos marcadores CD45R (linfócito B), CD11c (células dendríticas), CD3e (linfócitos T) e TER-119 (eritrócitos) demonstraram uma alteração na expressão ao longo do tempo de permanência na cultura. O tratamento com o Canova não alterou a expressão desses receptores. É interessante notar que as células que expressam esses marcadores conseguem se manter em cultivo, sem necessitar de fatores de crescimento adicionais aos do soro.

Os valores que indicam alteração na expressão ao longo do tempo de permanência na cultura estão demonstrados na Tabela 5.

TABELA 5: VALORES QUE INDICAM ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DOS MARCADORES AO LONGO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA NA CULTURA

	48 horas		72 horas		96 horas	
	M	DP	M	DP	M	DP
CD45R	73%	6,06%	58,7%*	11,98%	67,6%	6,70%
CD11c	21,76%	5,27%	35,11%*	11,57%	24,25%	9,86%
CD3	61,84%	3,85%	75,77%*	11,69%	57,35%	7,83%
TER-119	25,32%*	1,83%	56,24%	7,98%	61,48%	6,39%

M – média e DP – desvio padrão * $p < 0,05$

Na análise individual dos marcadores, que será apresentada a seguir, serão mostrados apenas os gráficos mais representativos de cada população.

5.4.2.1 CD45R

O marcador CD45R (B220) é uma glicoproteína (tiosinofosfatase) expressa principalmente nas células B, desde as pré B até as células maduras, sendo que essa expressão varia com a maturação celular (www.bdbioscience.com).

PERFIL CARACTERÍSTICO ENCONTRADO NAS CÉLULAS CD45R⁺

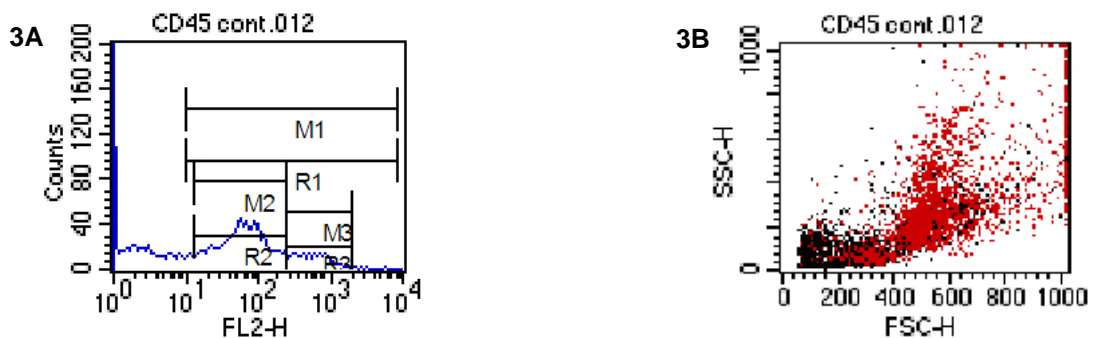


Gráfico 3A: eixo x – fluorescência emitida pelo marcador; eixo y – quantidade de células marcadas. R1 (*gate 1*), R2 (*gate 2*), M1 e M2 correspondem à mesma população celular delimitada pelos *gates* R1 e R2 respectivamente, mas, são utilizados para a realização da estatística

Gráfico 3B: eixo x – tamanho celular (FSC); eixo y – complexidade celular (SSC). Células em vermelho (que apresentam o respectivo marcador) correspondem à população delimitada pelo *gate* R1

A fluorescência apresentada por este marcador demonstrou uma diminuição significativa após 72 horas de cultura, voltando a aumentar após 96 horas (Tabela 5), indicando a ocorrência de diferenciação dessa população ao longo do tempo de cultura. Provavelmente, a maioria das células marcadas é imatura ou pouco diferenciada, uma vez que os gráficos de tamanho por complexidade demonstraram uma população de células grandes (em vermelho), característica de linfócitos B imaturos. Esse marcador está expresso em grande quantidade nas células Mac-1⁺ (LAGASSE & WEISSMAN. 1996), outra justificativa para a presença de células grandes nesses gráficos.

5.4.2.2 CD11c

O marcador CD11c é uma integrina α de membrana que se expressa, principalmente, nas células dendríticas e em menor quantidade, nos monócitos/macrófagos (wwwbdbiosciences.com).

PERFIL CARACTERÍSTICO ENCONTRADO NAS CÉLULAS CD11c⁺

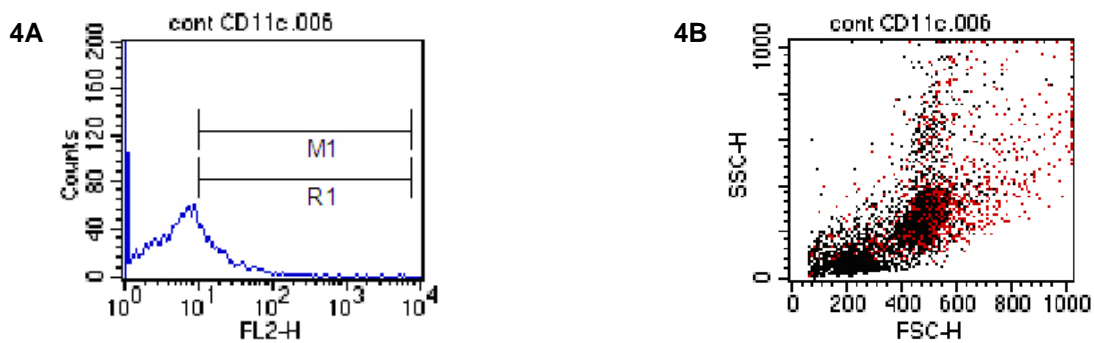


Gráfico 4A: eixo x – fluorescência emitida pelo marcador; eixo y – quantidade de células marcadas. R1 (*gate 1*), R2 (*gate 2*), M1 e M2 correspondem à mesma população celular delimitada pelos *gates* R1 e R2 respectivamente, mas, são utilizados para a realização da estatística

Gráfico 4B: eixo x – tamanho celular (FSC); eixo y – complexidade celular (SSC). Células em vermelho (que apresentam o respectivo marcador) correspondem à população delimitada pelo *gate* R1

O tratamento com o Canova parece não influenciar o desenvolvimento das células CD11c⁺ em cultura. O que acontece é uma modificação na expressão desse receptor ao longo do tempo. Após 48 horas esse receptor apresenta-se em pequena quantidade, indicando uma população pequena de células CD11c⁺, mas após 72 horas ocorre um aumento desse receptor, dado que corrobora os experimentos de INABA e colaboradores (1992). Após 96 horas, essa expressão volta a diminuir (Tabela 5). Verifica-se que está ocorrendo diferenciação celular, e da mesma maneira que a população CD45R⁺, as células dendríticas se mantêm em cultura, mesmo sem fatores de crescimento adicionais aos do soro. Essa diminuição na população sobrenadante, após 96 horas de cultura, sugere adesão deste tipo celular, dado confirmado pela microscopia confocal, que demonstrou a presença de células CD11c⁺ aderidas após 12 dias de cultura. Como se sabe que as células dendríticas imaturas estão aderidas e só se desprendem após sua maturação, confirma-se que essa população também se mantém em cultura, mas sem fatores

de crescimento adicionais não atinge a maturação. Os gráficos de tamanho por complexidade celular demonstram células grandes e granulosas (em vermelho), caracterizando adequadamente as células dendríticas.

5.4.2.3 CD3e

O marcador CD3 é um complexo de peptídeos presente na superfície dos linfócitos T, que está ligado ao receptor de antígenos TCR (ROITT. 1999).

PERFIL CARACTERÍSTICO ENCONTRADO NAS CÉLULAS CD3e⁺

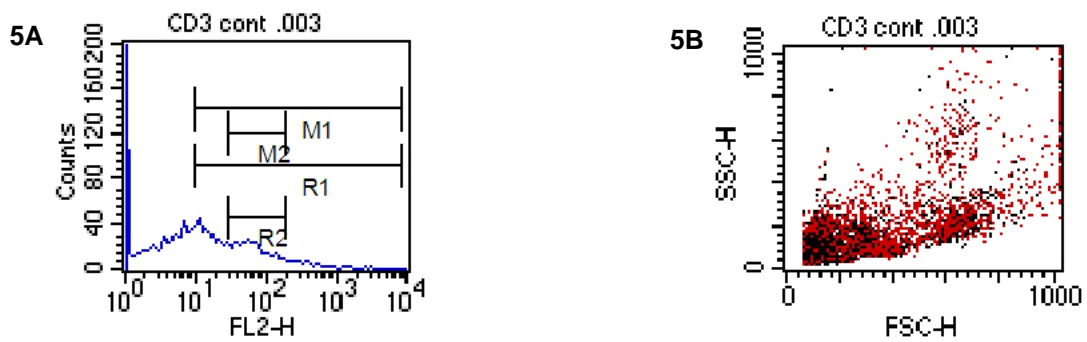


Gráfico 5A: eixo x – fluorescência emitida pelo marcador; eixo y – quantidade de células marcadas. R1 (*gate* 1), R2 (*gate* 2), M1 e M2 correspondem à mesma população celular delimitada pelos *gates* R1 e R2 respectivamente, mas, são utilizados para a realização da estatística

Gráfico 5B: eixo x – tamanho celular (FSC); eixo y – complexidade celular (SSC). Células em vermelho (que apresentam o respectivo marcador) correspondem à população delimitada pelo *gate* R1

As células CD3⁺ apresentam-se em grande número na medula óssea de camundongos. Já que esses animais apresentam grande quantidade desse tipo celular no sangue periférico (BIRCHARD & SHERDING. 1998; SATO. 2002) e, como a medula óssea é altamente irrigada, ocorre um refluxo deste tipo celular. Mesmo sendo o timo o principal órgão de produção das células T, já foi verificado que culturas de medula óssea apresentam habilidade de promover a manutenção dessas células (DEJBAKSH - JONES & STROBER. 1999), explicando a presença das mesmas no cultivo. Sabe-se que as células dendríticas ativam as células T (RUTELLA & LEMOLI. 2004). Isso também justifica a manutenção das células CD3⁺ em cultura, sem a adição de fatores de crescimento adicionais aos do soro.

O tratamento com o Canova parece não influenciar o desenvolvimento das células T. A expressão do CD3 aumenta após 72 horas de cultivo diminuindo após 96 horas (Tabela 5), logo é o tempo de permanência na cultura, e não o tratamento, que altera a expressão do CD3 nas células.

Os gráficos de tamanho por complexidade celular apresentam uma população relativamente grande contendo células de tamanhos variados, mas pouco complexas (em vermelho). Como os linfócitos T maduros são células pequenas, esses gráficos não demonstram uma população contendo apenas células maduras, sugerindo que esse marcador já está presente nos linfoblastos, os quais são células grandes.

5.4.2.4 TER-119 (Ly-76)

É uma glicoproteína presente na membrana das células eritrocíticas, desde proeritroblastos até eritrócitos maduros. As células TER-119⁺ presentes na medula óssea adulta não apresentam os marcadores Mac-1, Gr-1 e B220 em sua superfície (KINA et al. 2000).

PERFIL CARACTERÍSTICO ENCONTRADO NAS CÉLULAS TER-119⁺

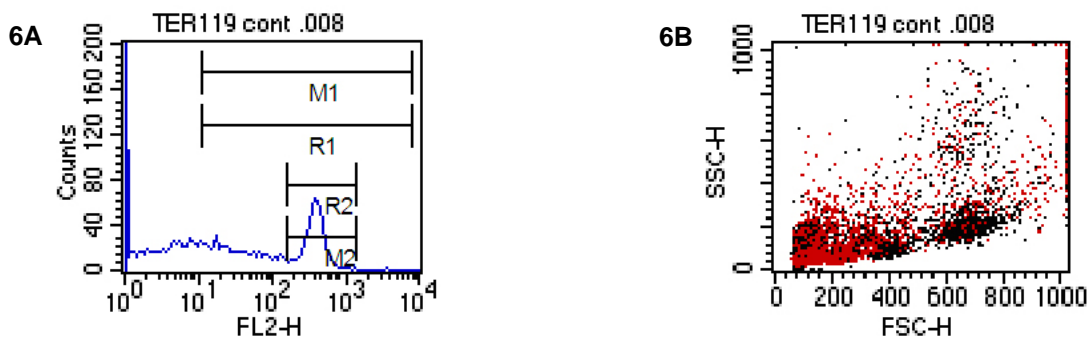


Gráfico 6A: eixo x – fluorescência emitida pelo marcador; eixo y – quantidade de células marcadas. R1 (*gate 1*), R2 (*gate 2*), M1 e M2 correspondem à mesma população celular delimitada pelos *gates* R1 e R2 respectivamente, mas, são utilizados para a realização da estatística

Gráfico 6B: eixo x – tamanho celular (FSC); eixo y – complexidade celular (SSC). Células em vermelho (que apresentam o respectivo marcador) correspondem à população delimitada pelo *gate* R1

Aparentemente, o tratamento com o Canova não altera a expressão do marcador TER-119, mas novamente o tempo de cultura influenciou o desenvolvimento celular. A população recém tirada da medula óssea apresenta pouca expressão desse receptor. Essa quantidade era esperada, pois já foi

demonstrada uma pequena quantidade desse tipo celular na medula óssea *in situ* (KINA et al. 2000). A expressão desse receptor aumenta significativamente após 72 horas mantendo-se após 96 horas de cultura (Tabela 5). Sabe-se que esse marcador não está presente nas unidades formadoras de colônias de eritrócitos (BFU-E e CFU-E), mas já foi observada a formação de *clusters* em um ensaio de formação de colônias a partir de células TER-119⁺. Esse dado sugere que as células TER-119⁺ primitivas possuem um potencial proliferativo *in vitro* (KINA et al. 2000), mas na ausência de uma maior quantidade do fator de crescimento eritropoetina, por exemplo, as células mais maduras estão se mantendo e as imaturas estão se diferenciando, mas provavelmente, não atingindo o estágio final de maturação.

Os gráficos de tamanho por granulosidade apresentam uma população de células pequenas e pouco granulosas (em vermelho), características das células da série eritrocítica.

O Canova, aparentemente, não agiu sobre as populações celulares presentes no sobrenadante da cultura de medula óssea. Como esse medicamento apresenta ação imunomoduladora e como as populações analisadas compõem o sistema imunológico, precisávamos investigar como esse medicamento agiria sobre essas populações na medula óssea de animais saudáveis.

Foi demonstrado que os marcadores apresentam uma flutuação na sua expressão, ao longo do tempo de cultura. Como não foram adicionados fatores de crescimento, além dos presentes no soro, essas células estão se diferenciando, mas, provavelmente, não atingirão o estágio final de maturação. As células maduras se mantêm, mas as imaturas precisariam de fatores externos específicos para atingir a maturação completa.

Os gráficos de tamanho por complexidade celular, relativos aos marcadores CD11b, CD11c, CD45R, Ly-6G e CD3e, apresentaram populações com tamanho e complexidade variáveis. O CD11b, CD11c e Ly-6G não são linhagem-específicos, estando presentes em vários tipos celulares, já a presença de células imaturas, que são células grandes, no caso do CD45R e CD3, explica a população diversificada nesses gráficos.

5.5 QUANTIFICAÇÃO CELULAR DAS POPULAÇÕES ANALISADAS

A análise pelo citômetro de fluxo também nos permitiu verificar a quantidade celular presente em cada população analisada. No Gráfico 7A está demonstrada a estratégia utilizada para essa análise.

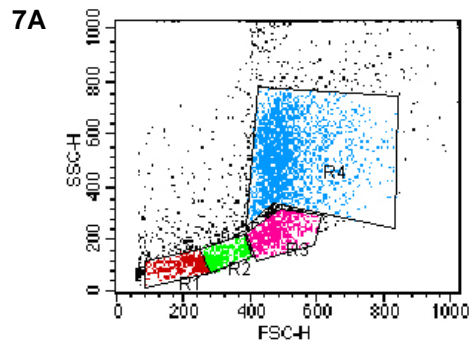


Gráfico 7A: eixo x – tamanho celular (FSC); eixo y – complexidade celular (SSC). O gráfico representa as populações medulares analisadas por citometria de fluxo recém obtidas da medula óssea de camundongos, onde as características de tamanho celular e complexidade interna foram utilizadas para distinguir cada população

Nesse gráfico foram traçadas janelas específicas baseadas no tamanho (FSC – *forward scatter*) e na complexidade interna (SSC – *side scatter*), distintas para cada população celular (CIVIN & LOKEN. 1987). O *gate* R1 indica a localização da série eritrocítica; R2 série linfocítica; R3 monocítica e R4 granulocítica.

Também foi verificado se a presença do medicamento Canova e o tempo a que as culturas foram submetidas influenciavam na quantidade de células de cada população.

A análise estatística desses valores (Anexo 10) indicou que o medicamento Canova não influenciou na quantidade de células, de cada série analisada, presentes no sobrenadante das culturas, mas o tempo que foram mantidas no cultivo influenciou na variação do número celular. A seguir está demonstrada a tabela contendo esses valores.

TABELA 6: QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS PERTENCENTES A CADA POPULAÇÃO CELULAR ANALISADA, PRESENTES NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS, QUANTIFICADAS NO CITÔMETRO DE FLUXO

	48 horas		72 horas		96 horas	
	M	DP	M	DP	M	DP
S. Eritrocítica	17,11%*	4,05%	8,72%	2,18%	11,30%	3,60%
S. Linfocítica	13,43%*	3,09%	8,47%	2,27%	7,40%	3,57%
S. Monocítica	30,00%*	9,61%	9,52%	3,13%	10,52%	2,61%
S. Granulocítica	10,39%*	6,55%	9,82%	2,86%	10,81%	4,52%

M – média e DP – desvio padrão * $p < 0,05$ S - série

Após 48 horas de cultivo havia uma maior quantidade de células no sobrenadante das culturas, em todas as populações analisadas. Essa quantidade diminuiu significativamente, com o passar do tempo de experimento. Essa diminuição ocorreu, provavelmente, devido à adesão dessas células. No caso da linhagem monocítica essa adesão foi demonstrada, já que suas células, principalmente os macrófagos, fazem parte da população que compõe o estroma medular (ALLEN & DEXTER. 1984) e apresentaram-se bastante aderidas como já mostrado nos experimentos anteriores. Outra causa dessa diminuição celular nas outras linhagens é, provavelmente, porque essas células não receberam fatores de crescimento específicos, em quantidades suficientes, para continuarem seu desenvolvimento e sua manutenção adequadamente.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

TABELA 7: QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS COMPARADA À CURVA PADRÃO DO SORO SANGUÍNEO DE CAMUNDONGOS

	TNF- α	INF- γ	IL-5	IL-4	IL-2
SORO	40,00 pg/mL	3,43 pg/mL	5,7 pg/mL	ND	3,45 pg/mL
CONTROLE	37,45 pg/mL	2,8 pg/mL	3,7 pg/mL	4,15 pg/mL	2,325 pg/mL
CANOVA	37,1 pg/mL	2,97 pg/mL	3,5 pg/mL	4,025 pg/mL	2,4 pg/mL

As citocinas produzidas pelas células da medula óssea, em cultura, não demonstraram diferenças entre os grupos, sugerindo que o Canova não está alterando a produção dessas substâncias.

Tanto os valores do sobrenadante das culturas controle como das tratadas com o Canova são semelhantes aos valores encontrados no sangue periférico dos camundongos.

Ainda que detectadas em pequenas quantidades, essas citocinas estão presentes no sobrenadante das culturas, após 96 horas, mesmo sem estímulos externos, dessa maneira podem estar ajudando na manutenção das populações celulares apresentadas, ao longo do desenvolvimento das culturas.

6. CONCLUSÕES

- ❖ A microscopia de luz convencional mostrou que o tratamento com o Canova aumentou a adesão e o espraiamento de algumas populações medulares, promovendo a formação de ninhos celulares sobre a camada aderente;
- ❖ A microscopia eletrônica de varredura mostrou que, após 72 horas, as células aderentes tratadas com o Canova alteraram-se qualitativamente, pois apresentavam morfologia de macrófagos ativados;
- ❖ A microscopia confocal demonstrou que, após 12 dias de cultura, havia células CD11b⁺ e CD11c⁺ aderidas;
- ❖ A microscopia confocal mostrou que, com essa metodologia, os receptores CD11b e CD11c possuem um padrão diferente de distribuição na superfície: o CD11b se apresenta em *clusters* e o CD11c em forma reticular;
- ❖ A imunofenotipagem demonstrou que o tratamento com o Canova não interfere quantitativamente nas populações de células presentes no sobrenadante das culturas de medula óssea, no período de tempo analisado;
- ❖ O tempo que essas células permanecem em cultivo altera a quantidade de alguns desses marcadores, como, CD45R, CD11c, CD3e e TER-119;
- ❖ Os marcadores CD11b (Mac-1) e Ly-6G (Gr-1) não alteraram sua expressão ao longo do desenvolvimento das culturas;
- ❖ A técnica de cultura líquida de medula óssea utilizada possibilitou a manutenção das populações celulares estudadas;
- ❖ A quantidade celular das populações presentes no sobrenadante das culturas diminuiu com o passar do tempo de experimento;
- ❖ O tratamento com o Canova durante 96 horas não alterou a quantidade de citocinas presentes no sobrenadante das culturas;
- ❖ Essa semelhança entre os tratamentos reforça a idéia de imunomodulação do Canova, uma vez que os camundongos utilizados eram saudáveis.

CONCLUSÃO GERAL

As células aderentes CD11b⁺ da medula óssea de camundongos, cultivadas *in vitro*, apresentaram morfologia de células ativadas após o tratamento com o medicamento Canova. A presença do medicamento também permitiu a formação de ninhos de células sobre a camada aderente, confirmando o efeito funcional do Canova sobre essas células.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADVERTISE AT HPATHY – Disponível em: www.hpathy.com/homeopathy_fags_d.asp – 30K. Acesso: 4/09/2003

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

BD – BIOSCIENCES – Disponível em: www.bdbiosciences.com. Acesso: 28/01/2005

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

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

BIRCHARD, S. J. & SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. p. 1529. 1998.

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

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

CANCELAS, J. A., KOEVOET, W. L. M., KONING, A. E., MAYEN, A. E. M., ROMBOUITS, E. J. C., PLOEMACHER, R. E. Connexin-43 gap junctions are involved in multiconnexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. **Blood**. vol. 96. (n° 2). p. 498-505.

CANOVA DO BRASIL. Informações científicas. Disponível em: www.canovado brasil.com.br. Acesso em: 28/01/2005

CANOVA DO BRASIL, **Monografia: Método Canova®**. Curitiba, 2001.

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

CIVIN, C. I., LOKEN, M. R. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. **International Journal of Cell Cloning**. vol. 5. p. 267-288. 1987.

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

CROFT. A. P., PRZYBORSKI, S. A. Mesenchymal stem cells from the bone marrow stroma: basic biology and potential for cell therapy. **Current anaesthesia & Critical care**. *In press*.

DAY, B. J., HATCH, A., CARSTENS, D. D., CRAPO, J. D. An easy and economical method to prepare cells for cytologic analyses. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. vol.34. p. 57-62. 1995.

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

DEL VECCHIO, M.; BUCHI, D.F.; Laboratório Canova do Brasil. Disponível em <<http://www.canovado brasil.com.br/oque.htm>> Acesso em: 26/01/05.

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

EVANS, M. J. and KAUFMAN, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**. vol. 292. p. 154-156. 1981.

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

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

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

HAHNEMANN, S. **ORGANON da arte de curar**. Robe Editorial. 6ª edição. 248pg. 2001.

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

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

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

JENSEN, G. S. & DRAPEAU, C. The use of in situ bone marrow stem cells for the treatment of various degenerative diseases. **Medical Hypotheses**. vol. 59 (4) p. 422-428. 2002

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

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

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

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

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

LAGASSE, E. & WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **Journal of Immunological Methods**. vol. 197. p. 139-150. 1996.

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

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

MA, L., SCHEERS, W., VANDENBERGHE, P. A flow cytometric method for determination of absolute counts of myeloid precursor dendritic cells in peripheral blood. **Journal of Immunological Methods**. vol. 285. p. 215-221. 2004.

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

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

MOORE, K. L., e PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 5ª Edição. Guanabara/Koogan, 1994.

MOORE, M.A.S. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. **Blood**. vol. 78. nº 1. p. 1-19. 1991.

MOORE, R. N., OPPENHEIM, J. J., FARRAR, J. J., et al. Production of lymphocyte-activating factor (interleukin 1) by macrophages activated with colony-stimulating factors. **J. Immunol**. vol. 125(3). p. 1302-1305. 1980.

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

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

OTTMANN, O. G., HOELZER, D. Growth factors in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**. vol. 22. p. 1171-1178. 1998.

PALIS, J., YODER, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology**. vol. 29. p. 927-936. 2001

PAUL, S.R., YANG, Y-C., DONAHUE, R.E., GOLDRING, S., WILLIAMS, D.A. Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. **Blood**. vol. 77, n°8. p. 1723-1733. 1991.

PERA, M. F., REUBINOFF, B., TROUNSON, A. Human embryonic stem cells. **Journal of Cells Sciences**. vol. 113. p. 5-10. 2000.

PEREIRA, W. K. V., LONARDONI, M. V. C., GRESPAN, R., CAPARROZ-ASSEF, S. M., CUMAN, R. K. N., BERSANI-AMADO, C. A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infection**. *In press*.

PIEMONTE, M. R. **Alterações estruturais em macrófagos peritoniais de camundongos tratados com o Método Canova®**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Morfologia), Universidade Federal do Paraná.

PIEMONTE, M. R. & BUCHI, D. F. Analysis of IL-2, INF- γ and TNF- α production, $\alpha_5\beta_1$ integrins and actin filaments distribution in intraperitoneal mouse macropahges treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, vol. 3. p 255-263. 2002.

QUESENBERRY, P. J.; COLVIN, G. A. **Williams - Hematology**. 6th edition, Mc. Graw-Hill Medical publishing division. 1939pg.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**, 5^a edição, Editora Malone LTDA. São Paulo. 423pg. 1999.

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

RUTELLA, S. & LEMOLI, R. M. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. **Immunology Letters**. vol. 94. p. 11-26. 2004

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

SATO, D. Y. O. **Efeito do Método Canova sobre os parâmetros leucocitários em camundongos normais e portadores de sarcoma 180**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Morfologia), Universidade Federal do Paraná.

SATO, D. Y. O., WAL, R., OLIVEIRA, C. C., CATTANEO, R. I. I., MALVEZZI, M., GABARDO, J., BUCHI, D. F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a Brazilian homeopathic medication. **Homeopathy**. vol. 94. p. 26-32. 2005.

SELIGMANN, I. C., LIMA, P. D.L., CARDOSO, P. C .S., KHAYAT, A. S., BAHIA M. O., CABRAL, I. R., BURBANO, R. R., BUCHI, D. F. The anticancer composite Canova Methode is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. **Genetics and Molecular Researchs**. vol. 2 (2). p. 223-228. 2003.

STEM CELLS: SCIENTIFIC PROGRESS AND FUTURE RESEARCH DIRECTIONS. Department of Health and Human Services. June 2001. Disponível em: (www.stemcells.nih.gov/index.asp). Acesso: 10/11/2003

TAMURA, H., OKAMOTO, S., IWATSUKI, K., FUTAMATA, Y., TANAKA, K., NAKAYAMA, Y., MIYAJIMA, A., HARA, T. In vivo differentiation of stem cells in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryo and adult bone marrow. **Experimental Hematology**. vol. 30. p. 957-966. 2002.

THOMSON, J. A., KALISHMAN, J., GOLOS, T. G., DURNING, M., HARRIS, C. F., BECKER, R.A., HEARN, J.P. Isolation of a primate embryo stem-cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. vol. 92. p. 7844-7848. 1995.

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

VIEIRA, S., HOFFMANN, R. **Estatística Experimental**, Editora Atlas S.A. 179pg. 1989.

WAL, R. **Estudo histopatológico do sarcoma 180 de camundongos tratados com medicamento homeopático Método Canova®**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Morfologia), Universidade Federal do Paraná.

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

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

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

8. ANEXOS

ANEXO 1: APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA) DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANEXO 2: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CÉLULAS ADERENTES DA MEDULA ÓSSEA APÓS CONTAGEM SOB MICROSCOPIA DE LUZ

CONTAGEM DAS CÉLULAS ADERENTES SOB MICROSCOPIA DE LUZ

	grupo controle			M	DP	grupo Canova			M	DP
48h	21	16	33	23,33	8,74	37	79	76	64,00	23,43
72h	59	42	50	50,33	8,50	45	82	84	70,33	21,96
96h	36	60	37	44,33*	13,58	77	88	79	81,33*	5,86

os valores apresentados representam o número de células e as células quantificadas foram as que apresentaram morfologia ativada; M – média e DP – desvio padrão * $p < 0,05$

X_1 Média do grupo controle; X_2 Média do grupo Canova; t tempo; s desvio padrão; N número de repetições; s_x desvio padrão/ $\sqrt{\text{número de repetições}}$

$$t_{48h} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{(s_{x_1})^2 + (s_{x_2})^2}}$$

$$t_{48h} = \frac{40,67}{14,45} = 2,8145 \text{ não significativo}$$

$$s_{x_1} = \frac{s_1}{\sqrt{N}} = \frac{8,74}{1,73} = 5,052$$

$$s_{x_2} = \frac{s_2}{\sqrt{N}} = \frac{23,43}{1,73} = 13,54$$

$$t_{72h} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{(s_{x_1})^2 + (s_{x_2})^2}}$$

$$t_{72h} = \frac{20}{13,61} = 1,469 \text{ não significativo}$$

$$s_{x_1} = \frac{s_1}{\sqrt{N}} = \frac{21,96}{1,73} = 12,69$$

$$s_{x_2} = \frac{s_2}{\sqrt{N}} = \frac{8,50}{1,73} = 4,91$$

$$t_{96h} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{(s_{x_1})^2 + (s_{x_2})^2}}$$

$$t_{96h} = \frac{37}{8,53} = 4,338 \text{ significativo*}$$

$$s_{x_1} = \frac{s_1}{\sqrt{N}} = \frac{13,58}{1,73} = 7,85$$

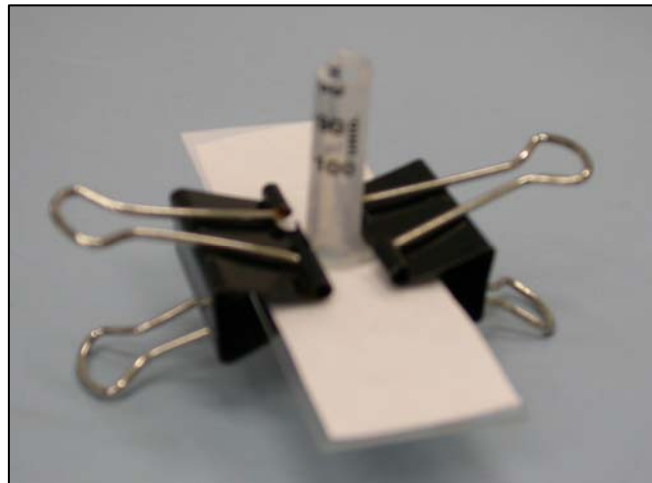
$$s_{x_2} = \frac{s_2}{\sqrt{N}} = \frac{5,86}{1,73} = 3,39$$

ANEXO 3: CITOGRAV

Para a montagem desse aparelho, utilizar papéis filtro, lâminas, cilindro de seringas de 1 ml e clips *binder*.

- ❖ Retirar um círculo do centro do papel filtro, com furador de papel, e colocá-lo sobre a lâmina;
- ❖ Cortar os cilindros das seringas e alinhá-los perpendicularmente à lâmina. Após, prende-se os cilindros com o auxílio dos clips *binder*;
- ❖ Adicionar a suspensão celular ao cilindro;
- ❖ Esperar 15 a 20 minutos para a adesão celular à lâmina e desmontar o sistema;
- ❖ Fixação das células com Metanol Merck 95%, até secar, a temperatura ambiente.

Abaixo está demonstrada a imagem desse aparelho.



ANEXO 4: COLORAÇÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS DE CÉLULAS ADERENTES E NÃO ADERENTES

- ❖ Adição do corante May-Grunwald - Merck® (0,2% em metanol). Mantê-lo nas lâminas por 5 minutos;
- ❖ Adição de água destilada. Mantê-la na lâmina por 1 minuto. Durante esse período ocorre a mudança de fase e coloração das células;
- ❖ Adição do corante Giemsa, após sua diluição em água destilada (5:1) e filtração. Mantê-lo por 30 minutos nas células do sobrenadante e 3 horas nas células aderentes;
- ❖ Passagem na água acética 0,01% (lâminas da população celular do sobrenadante da cultura), para retirar os resíduos de corante. Após esse procedimento, estão prontas para visualização.
- ❖ As lamínulas, contendo a população medular aderente, foram lavadas com água destilada e desidratadas, passando pela seguinte bateria:
Desidratação do material:
 - acetona 100% Merck®;
 - acetona 100% Merck®;
 - mistura I (1 xilol : 2 acetona) Merck®;
 - mistura II (1 xilol : 1 acetona) Merck®;
 - mistura III (2 xilol : 1 acetona) Merck®;
 - xilol 100% Merck®;
 - xilol 100% Merck®;
- ❖ Montagem das lâminas com resina Entellan®.

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

ANEXO 5: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

- ❖ Fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M pH 7,2 por, no mínimo, 1 hora. O experimento pode ser interrompido neste passo;
- ❖ Lavar as células com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M pH 7,2, 2 vezes, 10 minutos cada;
- ❖ Fixação com Tetróxido de Ósmio 1% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M pH 7,2, por 30 minutos, no escuro;
- ❖ Lavagem das células com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M pH 7,2, 2 vezes, 10 minutos cada;
- ❖ Desidratação do material:
 - álcool* 50% - 10 minutos;
 - álcool 50% - 10 minutos;
 - álcool 70% - 10 minutos;
 - álcool 70% - 10 minutos;
 - álcool 70% - 10 minutos (aqui se pode parar o procedimento);
 - álcool 90% - 10 minutos;
 - álcool 90% - 10 minutos;
 - álcool 100% - 10 minutos;
 - álcool 100% - 10 minutos;
 - álcool 100% - 10 minutos.
- ❖ Ponto crítico e metalização foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

OBS*: A desidratação foi realizada com álcoois obtidos a partir de álcool Merck® absoluto.

ANEXO 6: IMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL - CÉLULAS ADERENTES

- ❖ Até a fixação das células, a placa foi mantida sobre o gelo;
- ❖ Retirar o meio de cultura dos poços e lavar as células 10 vezes, com PBS (o PBS foi colocado e, ao mesmo tempo, retirado dos poços com o auxílio de duas pipetas de 10 ml);
- ❖ Bloqueio dos sítios inespecíficos das células com uma solução de PBS/BSA (albumina) – Electron Microscopy Sciences (EMS) 1% por 20 minutos;
- ❖ Lavagem das células com PBS, da maneira já citada;
- ❖ Incubação com os anticorpos primários, do sistema *Mouse Lineage Panel*, diluídos em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos. A concentração final dos anticorpos foi de 1µg%;
- ❖ Lavagem das células com PBS, da maneira já citada;
- ❖ Fixação das células. Para este procedimento, as lamínulas foram transferidas para uma placa de cultivo nova, para se evitar a presença de restos celulares. Antes da transferência das lamínulas deve se colocar 500µl de PBS em cada poço para evitar a secagem do material;
- ❖ O PBS foi retirado e adicionado paraformaldeído (PFA) 2% em PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente;
- ❖ Nova lavagem das células com PBS, da maneira já citada;
- ❖ Bloqueio dos radicais aldeídos do PFA, para evitar essa fluorescência, com glicina 0,1M em PBS (300µl por poço), por 2 minutos;
- ❖ Lavar as células com PBS, da maneira já citada;
- ❖ Nesta etapa o procedimento pode ser interrompido, desde que as células sejam mantidas a 4°C e os poços estejam bem preenchidos com PBS;
- ❖ Novo bloqueio dos sítios inespecíficos das células com a solução de PBS/BSA 1% por 20 minutos;
- ❖ Lavar as células com PBS, da maneira já citada;

- ❖ Incubação com o anticorpo anti porção Fc (*Fc block*), para evitar marcação inespecífica, diluído em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos, na concentração final de 1µg%;
- ❖ Como segundo passo usou-se estreptavidina conjugada com o fluorocromo ficoeritrina (PE), diluída em PBS/BSA 1%, durante 40 minutos no escuro, na concentração final de 1µg%. Não é preciso efetuar nova lavagem antes deste procedimento (antes da incubação, a solução de estreptavidina foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, para evitar precipitados);
- ❖ Adição do corante nuclear DAPI (4,6 – diamidino – 2 – fenilindole, dihidroxicloride) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) na concentração de 300nM. Este foi mantido nas células por 15 minutos. Não é necessário retirar a solução de estreptavidina para adicionar o DAPI;
- ❖ Lavar as células com PBS, da maneira já citada, repetindo-se o procedimento duas vezes;
- ❖ Retirar as lamínulas da placa de cultivo, mergulhar rapidamente em água destilada e efetuar a montagem;
- ❖ Montagem das lâminas com a resina fluormont-G[®] diluída em PBS (2:1). Foi utilizada 10µl da solução de fluormont-G/PBS para cada lamínula;
- ❖ Após a montagem, as lamínulas foram mantidas a 4°C para secagem. Após a secagem, as lamínulas foram vedadas com esmalte e mantidas no escuro, a 4°C, até a visualização do material ao microscópio confocal.

OBS: As células não podem secar em nenhum momento do experimento.

*Os anticorpos utilizados nesse trabalho são contra antígenos de superfície que servem como marcadores celulares chamados CDs (agrupamentos de diferenciação) que se referem a moléculas reconhecidas por anticorpos monoclonais que podem ser usados para identificar linhagens ou estágios de diferenciação celular, além de desencadear reações celulares (ABBAS. 2000).

ANEXO 7: IMUNOCITOQUÍMICA PARA IMUNOFENOTIPAGEM - CÉLULAS NÃO ADERENTES

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

ANEXO 8: IMUNOCITOQUÍMICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

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

ANEXO 9: TABELAS ESTATÍSTICAS DOS EXPERIMENTOS DE IMUNOFENOTIPAGEM

TABELA 1: MARCADOR CD45R

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	242,486	3,14	significativo *
CANOVA (A)	1	1,422	0,018	não significativo
TEMPO (B)	2	416,99	5,398	significativo *
INTERAÇÃO AXB	2	188,514	2,44	não significativo
RESÍDUO	18	77,249		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 13,23%

GL: grau de liberdade; **QM:** quadrado médio

Teste de Tukey:

$\Delta 5\%: q \sqrt{QME/r}$

q: valor da tabela resultante do encontro entre o número de graus de liberdade do resíduo e o número de tratamentos, que, nesse caso são 2.

QME: Quadrado Médio do Erro (do resíduo)

r: número de repetições. Este valor, nesse caso, é 8 porque se somou as 4 repetições do controle com as do Canova, já que não houve diferença significativa entre os grupos e sim entre os tempos de experimento.

$\Delta 5\%: 2,97 \cdot 3,11 = \mathbf{9,23}$

48 horas: 72,99

72 horas: 58,69

96 horas: 67,59

A análise estatística inicial fornece a informação de que a quantidade de marcador entre os tempos de cultura está diferente, mas para saber qual dos tempos apresentou diferença usou-se o teste de Tukey e, esse teste indicou que o tempo de 72 horas apresentou valores diferentes dos demais.

TABELA 2: MARCADOR CD11b (Mac-1)

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	13,12933	0,1571	não significativo
CANOVA (A)	1	20,59054	0,2464	não significativo
TEMPO (B)	2	8,425162	0,1008	não significativo
INTERAÇÃO AXB	2	14,10289	0,1688	não significativo
RESÍDUO	18	83,56186		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 13,94%

TABELA 3: MARCADOR CD11c

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	173,96	1,895	não significativo
CANOVA (A)	1	0,0319	0,0004	não significativo
TEMPO (B)	2	403,075	4,391	significativo *
INTERAÇÃO AXB	2	31,8	0,346	não significativo
RESÍDUO	18	91,80		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 35,43%

O teste de Tukey indicou que o tempo de 72 horas apresentou valores diferentes dos demais.

TABELA 4: MARCADOR CD3e

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	334,031	3,945	significativo *
CANOVA (A)	1	84,414	0,997	não significativo
TEMPO (B)	2	729,371	8,614	significativo **
INTERAÇÃO AXB	2	63,498	0,75	não significativo
RESÍDUO	18	84,669		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 14,17%

O teste de Tukey indicou que, para o marcador CD3e, o tempo de 72 horas apresentou valores diferentes dos demais.

TABELA 5: MARCADOR Ly-6G (Gr-1)

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	136,154	1,409	não significativo
CANOVA (A)	1	11,69	0,121	não significativo
TEMPO (B)	2	325,93	3,37	não significativo
INTERAÇÃO AXB	2	8,71	0,090	não significativo
RESÍDUO	18	96,65		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 16,9%

TABELA 6: MARCADOR TER-119 (Ly-76)

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	1281,01	34,04	significativo **
CANOVA (A)	1	28,974	0,77	não significativo
TEMPO (B)	2	3055,215	81,19	significativo **
INTERAÇÃO AXB	2	132,823	3,53	não significativo
RESÍDUO	18	37,63		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 12,86%

O teste de Tukey indicou que o tempo de 48 horas apresentou valores diferentes dos demais.

ANEXO 10: TABELAS ESTATÍSTICAS DA QUANTIFICAÇÃO CELULAR PARA AS POPULAÇÕES ANALISADAS

TABELA 1: SÉRIE ERITROCÍTICA

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	63,63	5,298	significativo **
CANOVA (A)	1	16,60	1,38	não significativo
TEMPO (B)	2	147,79	12,305	significativo **
INTERAÇÃO AXB	2	2,982	0,248	não significativo
RESÍDUO	18	12,01		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 28%

A análise estatística inicial fornece a informação de que a quantidade de células entre os tempos de cultura está diferente, mas para saber qual dos tempos apresentou diferença usou-se o teste de Tukey e, este teste indicou que o tempo de 48 horas apresentou valores maiores e diferentes estatisticamente dos demais. Logo, existe um maior número de células da linhagem eritrocítica no sobrenadante da cultura, nesse tempo de experimento. Os tempos de 72 e 96 horas de cultura apresentaram menor quantidade desse tipo celular sendo que esses valores são iguais estatisticamente.

TABELA 2: SÉRIE LINFOCÍTICA

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	44,088	5,759	significativo**
CANOVA (A)	1	14,08	1,839	não significativo
TEMPO (B)	2	82,95	10,836	significativo**
INTERAÇÃO AXB	2	20,23	2,643	não significativo
RESÍDUO	18	7,655		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 28%

O teste de Tukey indicou que o tempo de 48 horas apresentou valores maiores e diferentes estatisticamente dos demais. Logo, existe um maior número de células da linhagem linfocítica no sobrenadante da cultura, nesse tempo de experimento. Os tempos de 72 e 96 horas de cultura apresentaram menor quantidade desse tipo celular sendo que esses valores são iguais estatisticamente.

TABELA 3: SÉRIE MONOCÍTICA

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	434,746	10,839	significativo**
CANOVA (A)	1	11,716	0,292	não significativo
TEMPO (B)	2	1066,31	26,586	significativo **
INTERAÇÃO AXB	2	14,697	0,366	não significativo
RESÍDUO	18	40,108		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 38%

O teste de Tukey indicou que existem mais células da linhagem monocítica, no sobrenadante da cultura, após 48 horas, e esses valores são estatisticamente diferentes do tempo de 72 horas. Esse teste não indicou diferença significativa entre os tempos 48 e 96 horas, mesmo os valores estando diferentes, isso acontece devido a alta rigidez desse teste. Os valores do tempo de 72 horas apresentaram-se estatisticamente semelhantes aos do tempo de 96 horas.

TABELA 4: SÉRIE GRANULOCÍTICA

F.V	GL	QM	F-teste	SIGNIFICÂNCIA
TRATAMENTOS	5	88,078	3,6868	significativo *
CANOVA (A)	1	5,839	0,244	não significativo
TEMPO (B)	2	185,01	7,744	significativo **
INTERAÇÃO AXB	2	32,2645	1,3505	não significativo
RESÍDUO	18	23,89		
TOTAL	23			

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

C.V. = 34%

O teste de Tukey indicou que o tempo de 48 horas apresentou valores maiores e diferentes estatisticamente dos demais. Logo, existe um maior número de células da linhagem granulocítica no sobrenadante da cultura, nesse tempo de experimento. Os tempos de 72 e 96 horas de cultura apresentaram menor quantidade desse tipo celular sendo que esses valores são iguais estatisticamente.

ANEXO 11: SOLUÇÕES UTILIZADAS

PBS

8 g de cloreto de sódio (NaCl)

0,2 g de cloreto de potássio (KCl)

1,44 g de fosfato de sódio (Na₂HPO₄)

0,24 g de fosfato de potássio (KH₂PO₄)

800 ml de água destilada

Completar com água destilada até 1000 ml

Ajustar o pH para 7,4

Todos os sais utilizados são da Electron Microscopy Sciences (EMS[®])

Bouin

Bouin's Fixative

Fort Washington

Cat. 15990-04

Marca: EMS[®]

Giemsa

1 ml do corante

5 ml de água destilada

Filtrar a solução com papel filtro

Marca: Pro Cito[®]

May Grunwald

2% em metanol Merck[®] (2 mg do corante em 100 ml de metanol absoluto), se necessário, esquentar a solução para facilitar a dissolução do corante

Marca: Merck[®]