



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIGENOTÓXICO E ANTICITOTÓXICO DO BIOPRODUTO  
MÉTODO CANOVA®**

HENRIQUE FONSECA SOUSA DO NASCIMENTO

Belém - PA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIGENOTÓXICO E ANTICITOTÓXICO DO BIOPRODUTO  
MÉTODO CANOVA®**

HENRIQUE FONSECA SOUSA DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.

Belém - PA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIGENOTÓXICO E ANTICITOTÓXICO DO BIOPRODUTO  
MÉTODO CANOVA®**

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia  
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriana Costa Guimarães  
Membro

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Julio Pieczarca  
Membro

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Gilmara de Nazareth Bastos  
Membro

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Rommel Burbano  
Suplente

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÕES**

Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Citogenética Humana - LCH,  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB.

### **FONTES FINANCIADORAS**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)  
– Bolsa de mestrado

“O importante na vida é saber ter equilíbrio.”

Max Reis

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as etapas vividas e conquistadas, pela luz, força, vontade e capacidade de superar.

Universidade Federal do Pará - UFPA pela estrutura logística e pedagógica ao longo desses dois anos de mestrado;

A meu orientador Prof. Dr. Marcelo Bahia, por ter me aceitado como seu filho científico nessa nova etapa.

Aos Amigos do Laboratório de Citogenética Humana em especial a “tio” Plínio, Tatiane, Diego “da Bahia”, Helem Ribeiro por terem me recebido tão bem e me ajudado na adaptação de novas técnicas que utilizaria no decorrer do mestrado. À Loreninha pela ajuda e amizade nesses dois anos de convivência. Sem esquecer das GDPs.

Agradeço a meus pais pela educação que me deram e na sua dedicação desejando sempre o melhor para mim.

À minha irmã que mesmo após muitas brigas ainda consegue me aturar, e a recíproca é verdadeira.

Aos meus amigos do colégio Teorema que mesmo depois da separação após o vestibular mantivemos o contato e a amizade.

As amizades feitas no Espaço Cultural Marcelo Thiganá por sempre me ajudarem onde estava com dificuldade e pelas saídas nas festas. Aos amigos Sérgio, Ney, Jéssica Brabo, Bettina, Deny, pela amizade prestada em tanto tempo de dança.

À minha avó Leozina que sempre mostrou que perseverança e força de vontade sempre nos levam longe.

À minha namorada Daniele Moysés, pela cumplicidade e companheirismo, sempre me ajudando a focar no que era importante. Obrigado coração.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram nessa longa caminhada.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 MÉTODO CANOVA® .....	1
1.2 COMPOSTOS N-NITROSOS: N-METIL-N-NITROSUREA (NMU).....	4
1.3 MUTAGÊNESE E ANTI-MUTAGÊNESE.....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	10
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	10
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1 CANOVA E NMU .....	11
3.2 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS.....	11
3.3 CULTURA DE LINFÓCITOS ISOLADOS.....	11
3.4 TRATAMENTOS.....	12
3.5 VIABILIDADE CELULAR.....	13
3.6 ENSAIO COMETA (VERSÃO ALCALINA).....	14
3.6.1 Princípio da técnica.....	14
3.6.2 Procedimento experimental.....	14
3.6.2.1 Preparação das lâminas.....	14
3.6.2.2 Eletroforese.....	15
3.6.2.3 Coloração.....	15
3.6.2.4 Análise das lâminas.....	16
3.7 AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM LARANJA DE ACRIDINA-BROMETO DE ETÍDIO (LAFBE).....	17

<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>18</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
5.1 VIABILIDADE CELULAR.....	18
5.2 ENSAIO COMETA.....	19
5.3 AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL.....	20
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>36</b>

## RESUMO

O Método CANOVA<sup>®</sup> (CA) é um imunomodulador brasileiro de formulação homeopática. CA é indicado em condições clínicas nas quais o sistema imune se encontra comprometido. O N-Metil-N-Nitrosourea (NMU) é um agente N-nitroso alquilante e carcinogênico utilizado como modelo experimental em roedores e macacos. O NMU também apresenta efeitos genotóxicos/mutagênicos analisáveis por testes clássicos de detecção de danos ao DNA e aberrações cromossômicas. Apesar de vários estudos terem demonstrado resultados promissores na utilização do medicamento CA, não existem trabalhos relatando possíveis efeitos antígenotóxicos deste medicamento, a despeito de seu potencial anticarcinogênico. Assim, o presente trabalho avaliou *in vitro* os efeitos antígenotóxicos e anticitotóxicos do medicamento CA em linfócitos humanos expostos ao NMU. Foram utilizadas amostras de linfócitos humanos que foram submetidos a diferentes concentrações de uma mistura contendo CA e NMU. A viabilidade das células expostas ao NMU foi avaliada pelo ensaio MTT, a genotoxicidade/antigenotoxicidade do CA foi avaliada pelo teste do cometa e a anticitotoxicidade do CA foi verificada pela quantificação de apoptose e necrose utilizando corantes fluorescentes (laranja de acridina/brometo de etídeo). No teste MTT verificamos que o NMU conseguiu diminuir a viabilidade dos linfócitos de forma significativa. No teste do cometa foi observado que CA diminuiu significativamente os danos ao DNA induzidos pelo NMU, caracterizando um claro efeito antígenotóxico do composto homeopático. CA também diminuiu de forma significativa a frequência de apoptose induzida pelo NMU em leitura realizada após 24 horas de tratamento. Concluímos que o CA apresentou um efeito antígenotóxico e anticitotóxico nas condições avaliadas no presente estudo, demonstrando, assim, um claro potencial citoprotetor.

Palavras-chave: Canova, NMU, Antigenotoxicidade, homeopatia

## ABSTRACT

The CANOVA® (CA) method is a Brazilian homeopathic immunomodulator. CA is indicated in clinical conditions where the immune system is impaired. N-Methyl-N-nitrosourea (NMU) is an N-nitroso carcinogenic alkylating agent used as an experimental model in rodents and monkeys. NMU also shows genotoxic/mutagenic effects that can be assessed by classical tests such as detection of DNA damage and chromosomal aberrations. Although several studies have shown promising results in the use of CA, there are no studies reporting possible antigenotoxic effects of this medicine, despite its anticancer potential. Therefore, the present study evaluated the *in vitro* antigenotoxic and anticytotoxic effects of CA in human lymphocytes exposed to NMU. Samples of human lymphocytes that were subjected to different concentrations of a mixture containing CA and NMU were used in the present study. The viability of cells exposed to NMU was evaluated by MTT assay, CA genotoxicity/antigenotoxicity was evaluated by the comet assay and CA anticytotoxicity was assessed by quantification of apoptosis and necrosis using fluorescent dyes (acridine orange/ethidium bromide). The MTT assay showed that NMU was able to decrease lymphocyte viability significantly. By using the comet assay it was observed that CA significantly reduces DNA damage induced by NMU, which sets a clear antigenotoxic effect of the homeopathic compound. CA also reduced significantly the frequency of NMU-induced apoptosis after 24 hours of treatment. We conclude that CA had an antigenotoxic and anticytotoxic effect in the conditions evaluated in this study, thereby demonstrating a clear cytoprotective potential.

Keywords: Canova, NMU, Antigenotoxicity, homeopathy

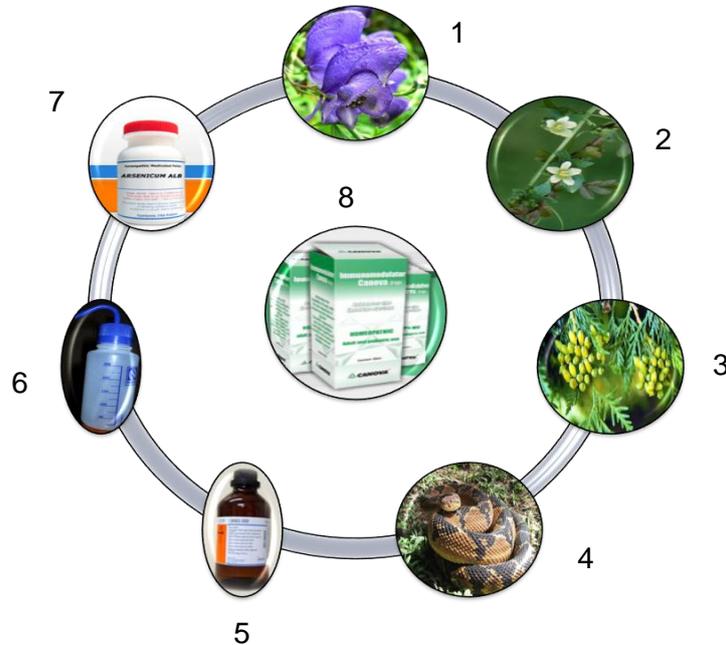
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MÉTODO CANOVA®

A homeopatia é uma forma de medicina em que o diagnóstico leva em conta as características físicas e emocionais do paciente. Sua terapia se baseia no conceito: “o semelhante cura o semelhante”, ou seja, os sintomas das doenças podem ser combatidos com doses minimizadas de medicamentos que produzam sintomas semelhantes em indivíduos saudáveis. Nas últimas décadas a Medicina Homeopática obteve notável reconhecimento na procura de novas soluções terapêuticas para a prática médica. No Brasil, a Homeopatia, que é reconhecida como especialidade médica desde 1980, propõe-se colocar ao alcance dos pacientes e da classe médica, medicamentos de baixo custo e que apresentem baixa toxicidade (CANOVA, 2012).

Avanços importantes têm nos permitido o desenvolvimento de opções de tratamentos que potencializam as respostas biológicas, principalmente no sistema imunológico, sendo incontestável sua eficiência terapêutica. O medicamento é selecionado de acordo com os sintomas e características do paciente, este tipo de tratamento não provoca efeitos colaterais ou reações adversas. (CANOVA, 2012).

O Método CANOVA® (CA) é um imunomodulador brasileiro de formulação homeopática. A composição final do CA é formada por *Aconitum napellus* (Ranunculaceae) 11dH, *Bryonia alba* (Cucurbitaceae) 18dH, *Thuja occidentalis* (Cupressaceae) 19dH, *Arsenicum álbum* (arsenious trioxide) 19dH, veneno de *Lachesis muta* (Viperidae) 18dH e menos de 1% de álcool em água destilada, como demonstrado na figura 1 (CANOVA, 2012). CA está listado e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos desde março de 2001, sob o código 12655.



**Figura 1.** Composição do CANOVA®: 1 - *Aconitum napellus*, 2 - *Bryonia alba*, 3 - *Thuja occidentalis*, 4 - veneno de *Lachesis muta*, 5 - álcool, 6 - água destilada, 7 - *Arsenicum album*, 8 - CANOVA®.

“Canova do Brasil” é uma companhia brasileira, sediada em Curitiba, que possui patente internacional do medicamento CA ([www.canovado brasil.com.br](http://www.canovado brasil.com.br)). A Canova do Brasil encontra-se envolvida em estudos científicos sistemáticos realizados em universidades brasileiras desde 1998 e que tem o intuito de comprovar a eficácia e estudar a toxicidade do medicamento. A comercialização do CA está regulamentada desde 1998, pelo Decreto nº 79.094/77, como Fórmula Magistral. A produção e comercialização do medicamento homeopático Canova está de acordo com o texto descrito na Lei nº 5.991/73 que “dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos”. Essa droga homeopática pode ser apresentada na forma de flaconetes, gotas e de inalante e caracteriza-se por diluições dinamizadas e associadas conhecidas da farmacopéia brasileira. CA é uma solução aquosa, incolor vendida somente em farmácias e laboratórios autorizados (CANOVA, 2012).

CA é indicado em condições clínicas nas quais o sistema imune se encontre comprometido. A observação em pacientes imunodeprimidos tratados com CA tem confirmado o sucesso deste composto no tratamento deste quadro clínico (BUCHI & VECCHIO, 2002). CA aumenta a resposta imune contra várias enfermidades graves através da ativação de macrófagos, os quais estimulam a ação de células T levando ao aumento do efeito citotóxico em resposta ao crescimento de infecções ou tumores (ROITT *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2006).

O primeiro estudo com administração de CA em pacientes HIV positivos demonstrou que este composto induz uma diminuição tanto da carga viral quanto de doenças oportunistas (SASAKI *et al.*, 2001). Similarmente, uma melhora na resposta imune de camundongos tratados com CA foi avaliada em estudos com Sarcoma 180. Nesse estudo, uma redução no tamanho do sarcoma foi observado e um significativo aumento de infiltração de células linfóides, granulação de tecido e fibrose ocorreu na margem tumoral. Todos os animais tratados com CA sobreviveram, e 30% dos animais pertencentes aos grupos controles desse estudo (não tratados com CA) morreram. Verificou-se que 30% dos animais com Sarcoma 180 tratados com CA tiveram regressão total do tumor. Além disso, observou-se um aumento no número total de leucócitos e linfócitos. Também foi observado um aumento de linfócitos TCD4 no grupo de camundongos normais tratados com CA e um aumento no número de linfócitos B e células NK em todos os camundongos com Sarcoma 180 tratados com CA (SATO *et al.*, 2005).

Abud e colaboradores (2006) demonstraram que CA atua na proliferação e diferenciação de células hematopoéticas. Em outro trabalho (CESAR *et al.*, 2008) foi relatado que a administração de CA *in vitro* induz a diferenciação mononuclear em células da medula óssea, além de observações clínicas incluindo redução de infecção e inflamação em pacientes tratados com CA.

CA também estimula um aumento do sistema endossomal/lisossomal, assim como a atividade fagocítica de macrófagos quando interagem com *Saccharomyces cerevisiae* com epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (LOPES *et al.*, 2006). O efeito modulatório de CA também foi observado em infecções experimentais por *Leishmania amazonensis in vivo* e *in vitro*, controlando a infecção, a sua progressão e limitando sua disseminação (PEREIRA *et al.*, 2005).

No trabalho de Ribeiro (2011), verificou-se que o composto homeopático foi capaz de induzir diminuição da expressão do oncogene *MYC* na linhagem neoplásica PG100, que apresenta uma amplificação deste gene, e possivelmente podendo utilizar o composto como auxiliar terapêutico em pacientes que apresentem adenocarcinomas gástricos com essa mesma característica. Contudo não se conseguiu explicar como CA induziu essa diminuição.

O tratamento de imunomodulação *in vivo* com um bioproduto possui grandes vantagens, não somente pelo fato do custo do medicamento ser consideravelmente menor que o das drogas disponíveis no mercado, como também pela ausência de efeitos tóxicos, o que permitiria o tratamento de grande número de pacientes, além do que sua utilização poderia ser estendida para vários outros tipos de patologias (BURBANO *et al.*, 2009).

## 1.2 COMPOSTOS N-NITROSOS: N-METIL-N-NITROSUREA (NMU)

Um grande número de substâncias é capaz de provocar o desenvolvimento de neoplasias, funcionando como agentes carcinogênicos. Tumores malignos surgem do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas causadas pela exposição a esses agentes num processo envolvido em uma série de eventos que resultam na conversão de células normais em células neoplásicas (TAKAYAMA, 2008).

Os compostos N-nitrosos, derivados de nitritos e nitratos, integram essas substâncias. Os nitritos e nitratos são utilizados principalmente em cura de carnes, que é um processo de conservação de um produto por adição de sal, compostos fixadores de cor, açúcar e condimentos, onde também é obtida a melhora das propriedades sensoriais. As fontes primárias de nitritos são carnes curadas, defumadas e processadas, já o nitrato é encontrado em produtos de origem vegetal, contudo o nitrato efetivamente não produz a reação de cura até que seja reduzido a nitrito (PENNINGTON, 1998; DIETRICH *et al.*, 2005).

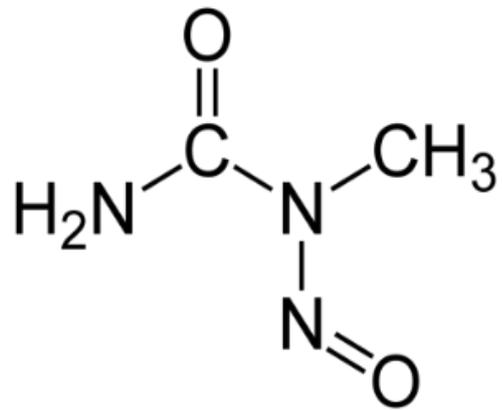
Os nitritos sofrem reação de nitrosação com aminas e amidas tanto no meio ambiente (exposição exógena) quanto no interior do corpo humano (exposição endógena) resultando em compostos N-nitrosos. Os compostos N-nitrosos podem ser divididos em duas classes: nitrosaminas e nitrosamidas. A exposição humana a esses compostos pode ocorrer de diferentes maneiras: dietética, ocupacional, tabagismo e outras fontes diversas, incluindo uso de produtos cosméticos, medicamentos e também pelo ar (IL'YASOVA *et al.*, 2009).

As nitrosamidas formam um grupo de compostos N-nitrosos que compreende substâncias como as N-nitrosuréis (JÄGERSTAD & SKOG, 2005). A *International*

*Association for Research on Cancer* (IARC) classificou os compostos N-nitrosos como prováveis carcinógenos em seres humanos. Com relação à carcinogenicidade, há similaridades e diferenças entre as duas classes de compostos N-nitrosos. Tanto as nitrosaminas quanto as nitrosamidas produzem semelhantes intermediários de alquilação que produzem danos ao DNA e à proteína (JÄGERSTAD & SKOG, 2005; IL'YASOVA *et al.*, 2009).

Os alimentos podem conter compostos N-nitrosos pré-formados, resultantes do processamento, principalmente de alimentos que contêm nitrito e/ou que foram expostos a óxido de nitrogênio, como carnes, peixes e queijos defumados e a cerveja (DIETRICH *et al.*, 2005). Os nitratos podem ser reduzidos a nitrito durante o armazenamento ou o processo digestivo. Devido à ausência da enzima nitrito redutase na cavidade oral, o nitrito será convertido no estômago a uma variedade de compostos de nitrogênio, sendo que os principais produtos são o óxido nítrico e os compostos N-nitrosos. No ambiente ácido do estômago, ocorre a reação entre um agente nitrosante e aminas, amidas ou alquiluréias, nesse processo o nitrito pode ser convertido em agentes de nitrosação ativos, possibilitando facilmente a reação com aminas secundárias para produzir os compostos N-nitrosos (DU *et al.*, 2007).

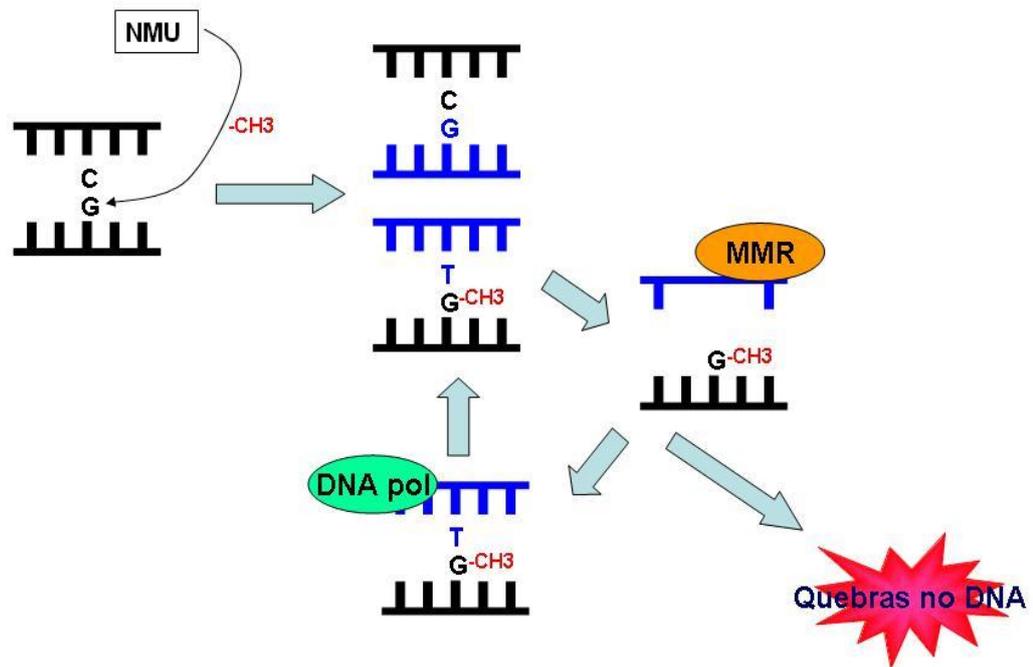
Um desses compostos é o NMU (N-metil-N-nitrosurea) (figura 2), um potente agente alquilante carcinogênico em roedores, macacos e provavelmente, em humanos, por realizar metilação do DNA, preferivelmente nas posições N<sup>7</sup>-Guanina (N7-G), transformando-as em N<sup>7</sup>-metilguanina (N7MeG) (WURDEMAN, 1993) ou ainda metilar O<sup>6</sup>-Guanina (O6-G) formando a O<sup>6</sup>-metil-Guanina (O6-MeG). Na ausência de AGT (O<sup>6</sup>-alquilguanina-DNA transferase) ou MGMT (O<sup>6</sup>-Metilguanina-DNA transferase), uma enzima de reparo que remove grupos metil de O<sup>6</sup>-metil-, esta última levará a incorporação de timina (T), em vez de citosina, na fita complementar no momento da síntese de DNA (FEITSMA *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Estrutura química do NMU. Fonte: Sigma, 2010

Este pareamento errôneo é reconhecido pelo mecanismo de reparo de mal pareamento (*mismatch repair* - MMR), que retira a Timina (T), juntamente com algumas bases circundantes gerando uma falha que é restaurada em seguida, via síntese do DNA (figura 3). Contudo, uma nova T é incorporada em oposição a O<sup>6</sup>-metil-G ainda presente. Esta nova T é novamente reconhecida pelo MMR e uma nova tentativa de reparo é feita. Tais tentativas, denominadas de ciclos fúteis, podem fazer com que haja quebra na dupla fita de DNA na próxima fase da duplicação, disparando a apoptose (FEITSMA *et al.*, 2008), como observado na figura 3.

O NMU em combinação com a ciclofosfamida foi previamente usado na antiga União Soviética (Rússia) para tratamento da doença de Hodgkin e carcinoma indiferenciado de pulmão em humanos (KOLARIC, 1977; TAKAYAMA, 2008). Atualmente é bastante utilizado para indução de carcinoma mamário em ratos e camundongos funcionando como bom modelo experimental para humanos (NANDI, 1995; RUSSO & RUSSO, 1996; VEGH & SALAMANCA, 2007). O processo carcinogênico induzido pelo NMU têm sido amplamente utilizado na indução de tumores em animais/órgãos específicos devido à grande semelhança com as neoplasias humanas (TSUBURA *et al.*, 2011).



**Figura 3** - Mecanismo de ação do NMU: o carcinógeno causa metilação da Guanina no Nitrogênio 7 ou no Oxigênio 6, esse processo provoca a incorporação de uma Timina errada na fita nascente de DNA replicante, no lugar de uma Citosina. Essa Timina errônea é percebida pelo sistema de reparo MMR que remove a base errada, no entanto, este é novamente adicionado pela DNApolimerase. Em seguida, a base é novamente removida pelo MMR, gerando ciclos fúteis, que por sua vez facilitam a ocorrência de quebras na fita de DNA. Fonte: Matos, 2009.

A administração oral deste composto induziu carcinoma de células escamosas na superfície gastrointestinal (cavidade oral, faringe, laringe e estômago) de macacos, além de inflamações crônicas geralmente observadas no esôfago causando aumento da proliferação celular favorecendo o surgimento de tumores (THORGEIRSSON, 1994), endometriose e cisto ovariano em algumas fêmeas (TAKAYAMA, 2008).

O NMU também apresenta efeitos genotóxicos/mutagênicos analisáveis por testes clássicos de detecção de danos ao DNA e aberrações cromossômicas. Okada e colaboradores (2008) observaram indução de micronúcleos em células de sangue periférico e células glandulares de estômago de camundongos tratados com esta droga. Experimentos em cultura de fibroblastos de hamster chinês demonstraram que o NMU induz a formação de micronúcleos como resultado de quebras e/ou perdas cromossômicas (CAMPAGNA, 2003). Porém, em outros testes com células de linfoma de camundongos, observou-se que a frequência de micronúcleos

induzida pelo NMU apresentou notável regressão quando este composto foi aplicado juntamente com a genisteína, substância encontrada na soja com possível potencial antigenotóxico (LUTZ *et al.*, 2005). Em teste de ensaio cometa o NMU induziu quebras de fita única e dupla de DNA durante a interfase (MENKE *et al.*, 2000). Ensaio cometa em linfócitos tratados com NMU demonstrou quebras na dupla fita de DNA, quatro vezes menor em pacientes com câncer ginecológico do que em indivíduos saudáveis. Tais resultados foram verificados 24 horas após tratamento com NMU e devem-se, concluem os autores, a uma deficiência no mecanismo de reparo MMR em linfócitos de pacientes com neoplasias (TRONOV *et al.*, 2006).

### 1.3 MUTAGÊNESE E ANTIMUTAGÊNESE

O efeito mutagênico é a consequência de danos genéticos causados por agentes físicos, químicos e/ou biológicos. Já o efeito antimutagênico tem ação inversa impedindo a formação das mutações causadas por um determinado agente mutagênico. Para avaliar esse efeito são utilizados testes como o de micronúcleo e de aberrações cromossômicas (RIBEIRO *et al.*, 2003).

As mutações ocorrem de forma aleatória, causando alterações no DNA, devido a processos físico-químicos, de ordem molecular ou química (SNUSTAD & SIMMONS, 2008). Mutações estão sempre ocorrendo em um organismo e são causadas por fatores exógenos (como exemplo radiações) ou endógenos (como exemplo os radicais livres) podendo ser classificadas como: a) gênicas, quando se referem a mudanças de uma ou poucas subunidades do DNA, alterando apenas o funcionamento de um gene, por substituição, perda ou ganho dessas subunidades ou b) cromossômicas, onde há reorganização dos cromossomos, por translocação, inversão, ou mesmo ganho ou perda de grandes partes destes cromossomos (GRIFFTIHS *et al.*, 2002). Mutações diferentes podem se acumular nas sucessivas divisões celulares e alterar genes com papel fundamental no processo de carcinogênese (RODIER *et al.*, 2007).

A antimutagênese é o processo no qual ocorre diminuição das taxas de mutações nos seres vivos e, como uma das consequências, a diminuição na incidência de câncer (GAMEIRO, 2005). Agentes antimutagênicos são classificados

em duas categorias: os **desmutagênicos**, que promovem a alteração bioquímica dos agentes mutagênicos antes que danifiquem o DNA; e os **bioantimutagênicos**, que suprimem o processo de fixação da mutação, após o DNA ser lesado pelo agente mutagênico (KADA & SHIMOI, 1987).

Aaron Novick & Leo Szilard, em 1952 foram os primeiros a relatarem os efeitos antimutagênicos ao observarem que um aumento na quantidade de adenosina podia reverter às mutações induzidas pela cafeína em bactérias (apud LIVIERO & VON BORSTEL, 1996). A partir desta informação, pesquisadores vêm descobrindo inúmeros agentes antimutagênicos na esperança de diminuir as taxas de incidência de câncer (GAMEIRO, 2005).

A expectativa é a de que estas substâncias atuem como quimioprotetores, que modulem o mecanismo de defesa, seja via alimentar, seja na forma de medicamentos, que possuam mecanismos potenciais de prevenção ao câncer e sejam efetivos em modelos de estudos pré-clínicos (DE FLORA *et al.*, 2004).

Apesar de vários estudos terem demonstrado resultados promissores na utilização do medicamento CA, não existem trabalhos relatando possíveis efeitos antigenotóxicos deste medicamento, a despeito de seu potencial anticarcinogênico. Como este medicamento ainda está em estágio intermediário de testes (CANOVA, 2012), estudos que caracterizem melhor seus efeitos no DNA tem um forte impacto, pois podem colaborar no sentido de serem criadas novas estratégias terapêuticas que intensifiquem sua utilização como um agente citoprotetor. Assim, o presente trabalho avaliou *in vitro* os efeitos antigenotóxicos e anticitotóxicos do medicamento CA em linfócitos humanos expostos ao NMU.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* os possíveis efeitos antigenotóxicos e anticitotóxicos do Bioproduto CA em linfócitos humanos tratados com o agente carcinogênico N-metil-N-Nitrosurea (NMU).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a viabilidade celular de linfócitos expostos a diferentes concentrações de NMU, através do ensaio MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]);
- Investigar o potencial antigenotóxico do Bioproduto Método CANOVA<sup>®</sup> nos linfócitos tratados com o carcinogênico NMU, através do Ensaio Cometa;
- Investigar o potencial anticitotóxico do Bioproduto Método CANOVA<sup>®</sup> nos linfócitos tratados com o carcinogênico NMU, através da avaliação de apoptose e necrose por marcação fluorescente diferencial.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CANOVA<sup>®</sup> E NMU**

No presente trabalho foi utilizado o medicamento CANOVA<sup>®</sup> doado pela companhia CANOVA<sup>®</sup> do Brasil, enquanto que o NMU utilizado foi adquirido pela empresa SIGMA do Brasil.

#### **3.2 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS**

As amostras de sangue periférico foram coletadas de 3 (três) indivíduos, sendo dois homens e uma mulheres, os quais obedeciam aos padrões exigidos para a realização de testes genotóxicos: idade entre 18 e 35 anos, não fumantes, sem exposição recente a agentes químicos, genotóxicos e radiação (OECD, 2010). Os voluntários foram entrevistados e assinaram o termo de consentimento de participação no estudo (Anexo 1). O sangue foi coletado com o auxílio de seringas descartáveis de 20mL, devidamente heparinizadas para evitar a coagulação, sendo em seguida submetido ao processo de isolamento de linfócitos para a preparação da cultura, a qual foi realizada de acordo com o descrito por Fenech (2000), com algumas adequações.

#### **3.3 CULTURA DE LINFÓCITOS ISOLADOS**

O sangue periférico foi coletado e em seguida realizada uma diluição na proporção de 1:1 em solução salina estéril (NaCl) 0,9%. A amostra foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova diluição em Histopaque<sup>®</sup> 1077 (específico para o isolamento de linfócitos T) na proporção de 3:1 (1 parte de Histopaque<sup>®</sup> 1077: 3 partes de sangue diluído), sendo primeiramente acrescentado o Histopaque e posteriormente o sangue, tomando bastante cuidado para que não ocorresse a mistura. Após este processo, os tubos com a amostra foram centrifugados a 2000rpm por 20 minutos para a separação dos linfócitos de outros elementos sanguíneos. O aspecto obtido após centrifugação é a formação de quatro

camadas, com o plasma na porção superior seguido de uma fina camada mais esbranquiçada de linfócitos, outra um pouco mais clara contendo Histopaque e por último, na porção inferior, uma camada de glóbulos vermelhos. O conteúdo (plasma + linfócitos) foi coletado e transferido cuidadosamente para outro tubo com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* estéril e, em seguida homogeneizado com a mesma pipeta *Pasteur* e então diluído em solução salina estéril na proporção de 1:1 (1 parte de solução salina: 1 parte da mistura de plasma + linfócitos). Posteriormente, o material foi centrifugado a 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e acrescentou-se 1mL de solução salina, levando-o novamente para centrifugação a 2000rpm por 3 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado por inversão e as células ressuspendidas em 1mL de meio de cultura RPMI 1640 estéril, suplementado com 20% de soro bovino fetal (FBS) e 4% de Fitohemaglutinina A. A viabilidade e a concentração celular foram quantificadas pelo método de exclusão utilizando *azul de tripan* em uma diluição de 1:1 (10µL da suspensão de células + 10 µL de *azul de tripan* 4%), e a contagem das células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, que nos fornece a quantidade de células para cada 1mL da suspensão obtida. Ao final de todas estas etapas, foram cultivadas  $1 \times 10^6$ /mL de células em 5mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% FBS, 4% de Fitohemaglutinina A (uma substância mitogênica que faz com que as células retomem o seu potencial mitótico), 1% de estreptomicina e 1% de kanamicina. A cultura foi incubada em estufa acondicionada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> a uma temperatura de 37°C.

### 3.4 TRATAMENTOS

Para análise *in vitro* dos possíveis efeitos antigenotóxicos do Bioproduto Método CANOVA<sup>®</sup> foram realizados os seguintes grupos de tratamento:

- a) Controle negativo: células cultivadas apenas na presença de meio de cultura RPMI;
- b) NMU: células tratadas com uma concentração única de NMU (125µg/mL);

c) Canova: células tratadas com 3 (três) concentrações de CA (4%, 8% e 16%) adicionados ao meio de cultura;

d) Canova + NMU: células tratadas simultaneamente com 3 (três) concentrações de CA e a concentração única NMU (NMU + CA 4%, NMU + CA 8% e NMU + CA 16%).

As concentrações de CA utilizadas no presente trabalho foram definidas tomando como base o trabalho de Seligmann e colaboradores (2003). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.5 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através do teste MTT, que baseia-se na absorção do sal MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazana (VALADARES *et al.*, 2007).  $0,5 \times 10^6$  linfócitos/poço foram cultivados em placas de cultura de 96 poços e incubados por 24 horas, em seguida, foram tratados com diferentes concentrações (v/v) de NMU durante 24 horas. Ao término deste período, 100µL de MTT (5000µg/mL) foram acrescentados às células por 3 horas, o MTT foi retirado e então acrescentado 100µL de dimetilsufóxido (DMSO) por uma hora com o objetivo de dissolver a formazana obtida durante o processo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 562nm. A sobrevivência celular foi calculada como a porcentagem de absorbância em relação à absorbância do controle. Foi considerada a primeira concentração com sobrevivência acima de 55% para as técnicas desenvolvidas posteriormente, de acordo com o protocolo definido por Galloway *et al.* (2011) para citotoxicidade em testes citogenéticos *in vitro*.

### 3.6. ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

#### 3.6.1 Princípio da Técnica

Esta técnica foi desenvolvida por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, modificada por Anderson *et al.* (1994). Corresponde a um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no DNA (quebra de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas) induzidos por compostos genotóxicos e mutagênicos.

Partindo-se do pressuposto de que o DNA encontra-se fortemente compactado dentro do núcleo, formando alças de 5 - 200Kpb, as quais se encontram aderidas a uma rede protéica ou matriz nuclear (COOK; BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; RAZIN *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2002); se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, sendo maior e mais pesado que o restante dos componentes ocupará um espaço no gel, o qual era anteriormente preenchido pela célula e será retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo denominada nucleóide (COOK; BRAZELL, 1976). Desta forma, o nucleóide é por definição, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual do tamanho do núcleo da célula. Portanto, caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofrerá mudanças, uma vez que as alças de DNA se desenovelam, tornando-se mais frouxas e formando um halo (COOK; BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; VOGELSTEIN *et al.*, 1980).

#### 3.6.2 Procedimento Experimental

##### 3.6.2.1 Preparação das Lâminas

As lâminas foram previamente cobertas em solução de agarose (ponto de fusão normal - 1,5%). Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose (baixo ponto de fusão - 0,8%), na qual a amostra foi diluída. Após 3 horas com a droga (23 horas de cultura), foram coletados 450µL de

amostra de cada grupo e em seguida feita uma centrifugação a 1000rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando 30 $\mu$ L para a ressuspensão. Deste conteúdo, 15 $\mu$ L foram acrescentados em 300 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,8%), logo em seguida homogeneizado. Subsequentemente, 100 $\mu$ L deste conteúdo foram aplicados rapidamente sobre lâminas previamente preparadas contendo agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Em seguida, cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60mm). As lâminas foram mantidas a 4°C por 5 minutos até a solidificação da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas cuidadosamente e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA , 10mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO; pH: 10), mantidas a 4°C e protegidas da luz.

#### 3.6.2.2 Eletroforese

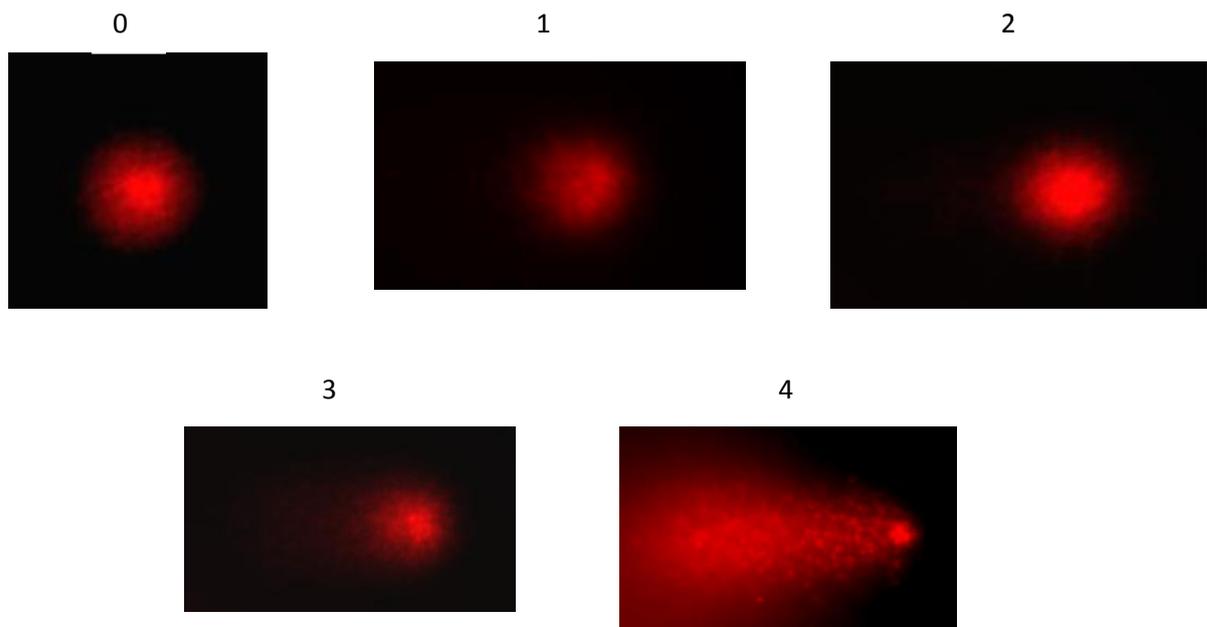
Após a remoção das lâminas da solução de lise, as mesmas foram dispostas em posição horizontal na cuba de eletroforese. Em seguida, a cuba foi preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH  $\geq$ 13) a 4°C recém preparada, a um nível superior às lâminas (0,25cm, em média). As lâminas foram mantidas em repouso por 20 minutos antes da eletroforese a fim de permitir o desenovelamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcali-lábeis. Após este processo, a eletroforese foi realizada a uma tensão (d.d.p: diferença de potencial) de 34V em corrente de 300mA por um período de 25 minutos. Vale ressaltar que todos esses processos foram realizados em baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em água destilada gelada (4°C), para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese, em seguida transferidas para um novo mergulho em água destilada gelada por 5 minutos para a neutralização.

#### 3.6.2.3 Coloração

As lâminas foram fixadas com etanol a 100% por 3 minutos e posteriormente coradas com 50 $\mu$ L de solução de Brometo de Etídio (20 $\mu$ g/mL). Em seguida foram cobertas com lamínula (24 X 60mm) para a realização das análises.

### 3.6.2.4 Análise das Lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, utilizando-se filtro *TxRED*. O sistema de captura e a análise da imagem foram realizados pelo programa “*Applied Spectrall maging*”. Foram analisadas 100 células por concentração. A análise foi realizada segundo o padrão de escores, em que, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa (halo), podem ser obtidas cinco categorias (0 - 4), levando-se em consideração a percentagem de DNA na cauda do cometa, o que indica o grau de lesão sofrido pela célula (figura 4):



**Figura 4** - Índice de dano avaliado pelo cometa: 0 = sem danos (< 5 %), 1 = baixo nível de danos (5 – 20 %), 2 = médio nível de danos (20 – 40 %), 3 = alto nível de danos (40 - 95 %), 4 = dano total (≥ 95 %) (MOTA, 2011).

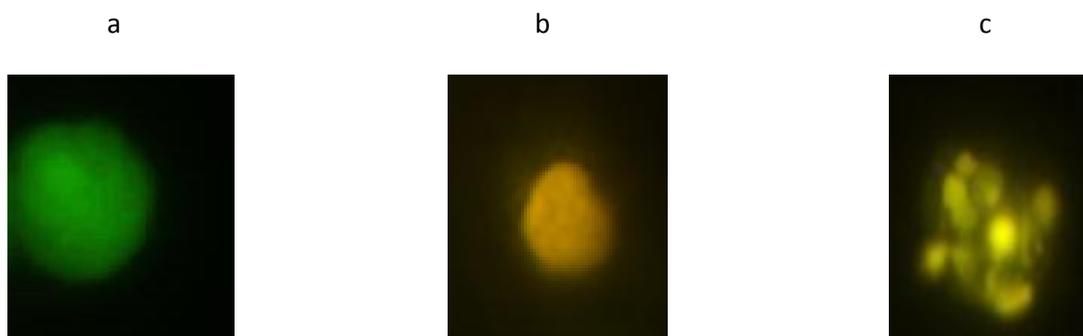
O índice de dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível (N0, N1, N2, N3 e N4) pelo escore ao qual ela se enquadra (0, 1, 2, 3 ou 4), somando-se esses valores, e por fim, o resultado obtido deve ser dividido por 100, como mostra a seguinte equação:

$$\text{ID: } [(N0*0 + N1*1 + N2*2 + N3*3 + N4*4)] / 100$$

### 3.7 AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM LARANJA DE ACRIDINA-BROMETO DE ETÍDIO (LA/BE)

Após o tratamento com as diferentes concentrações das drogas testadas, uma alíquota de 1mL de suspensão celular foi centrifugada e o *pellet* foi ressuspensionado em 25µL de solução de RPMI. Após este processo, 1µL de solução aquosa de LA/BE (100µg/mL) foi adicionado aos 25µL ressuspensionados, sendo posteriormente, as células analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro FITC (MONTENEGRO *et al.*, 2007). Um total de 300 células para cada grupo de tratamento foi analisado.

O laranja de acridina (LA) é um corante que apresenta a capacidade de se intercalar na molécula de DNA emitindo uma fluorescência (526nm) de cor verde. Semelhantemente a ela, o brometo de etídio (BE) também possui esta propriedade, porém, a fluorescência emitida (595nm) neste caso corresponde à cor alaranjada, marcação esta que irá caracterizar células inviáveis. Em contrapartida, as células viáveis com membrana intacta apresentarão um padrão de cor verde uniforme em seu núcleo. No estágio apoptótico inicial as células serão caracterizadas por apresentarem sua cromatina condensada com um núcleo verde fluorescente. Já no estágio tardio apenas algumas áreas da cromatina serão coradas em laranja. Este padrão de marcação distingue, portanto o núcleo apoptótico do necrótico, uma vez que as células necróticas apresentam um núcleo com coloração laranja uniforme (figura 5) (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2004).



**Figura 5** - Células coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. a) normal, b) necrose , c) apoptose (CUNHA, 2012).

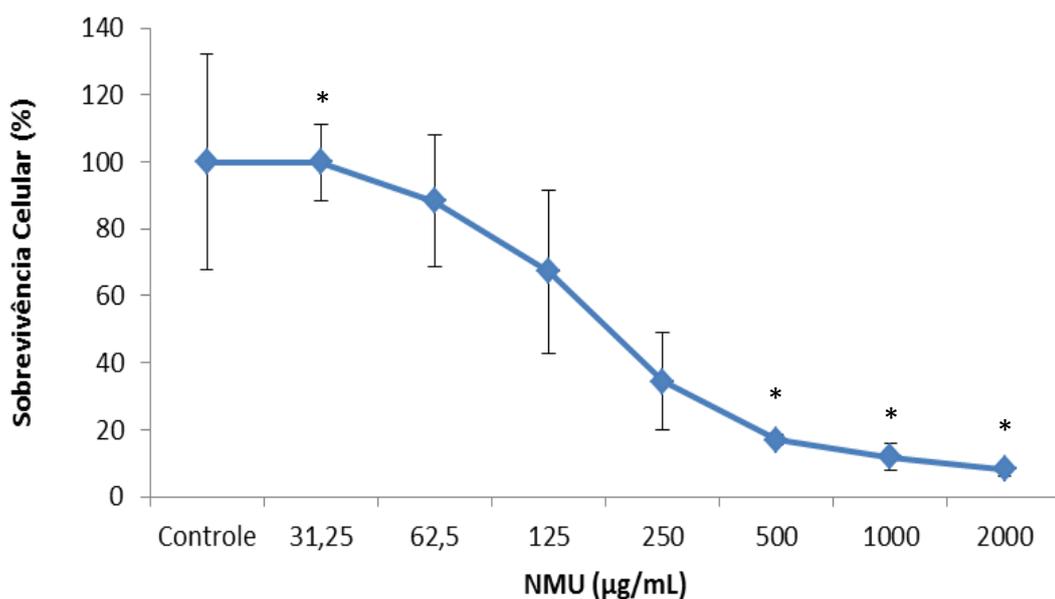
## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das frequências dos vários parâmetros, os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo Pós-Teste de Tukey, utilizando-se o programa BIOESTAT 5.0 (AYRES *et al.*, 2007). Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VIABILIDADE CELULAR

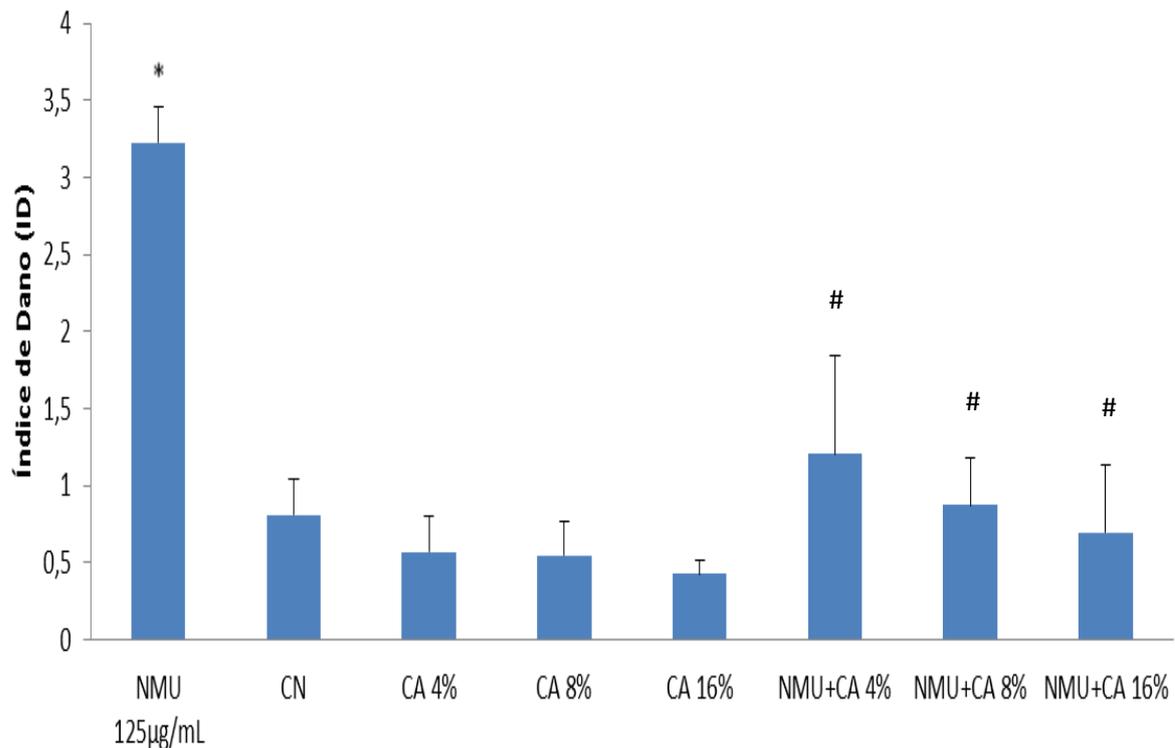
Os resultados do teste de viabilidade celular, após 24 horas de tratamento com o NMU, demonstraram que a porcentagem de sobrevivência diminui conforme se aumenta a concentração da droga (figura 7). As porcentagens de sobrevivência foram de 100%, 99,9%, 88,29%, 67,15%, 34,42%, 16,93%, 11,88% e 8,12% para as concentrações Controle, 31,25 $\mu$ g/mL, 62,5 $\mu$ g/mL, 125 $\mu$ g/mL, 250 $\mu$ g/mL, 500 $\mu$ g/mL, 1000 $\mu$ g/mL e 2000 $\mu$ g/mL, respectivamente. Para os experimentos posteriores foi utilizada a concentração de 125 $\mu$ g/mL, conforme citado na seção Material e Métodos.



**Figura 7** - Porcentagens de sobrevivência celular observadas na cultura de linfócitos após 24h de tratamento com NMU. Média de sete experimentos.  $p < 0.05$  (ANOVA) em relação ao controle.

## 5.2 ENSAIO COMETA

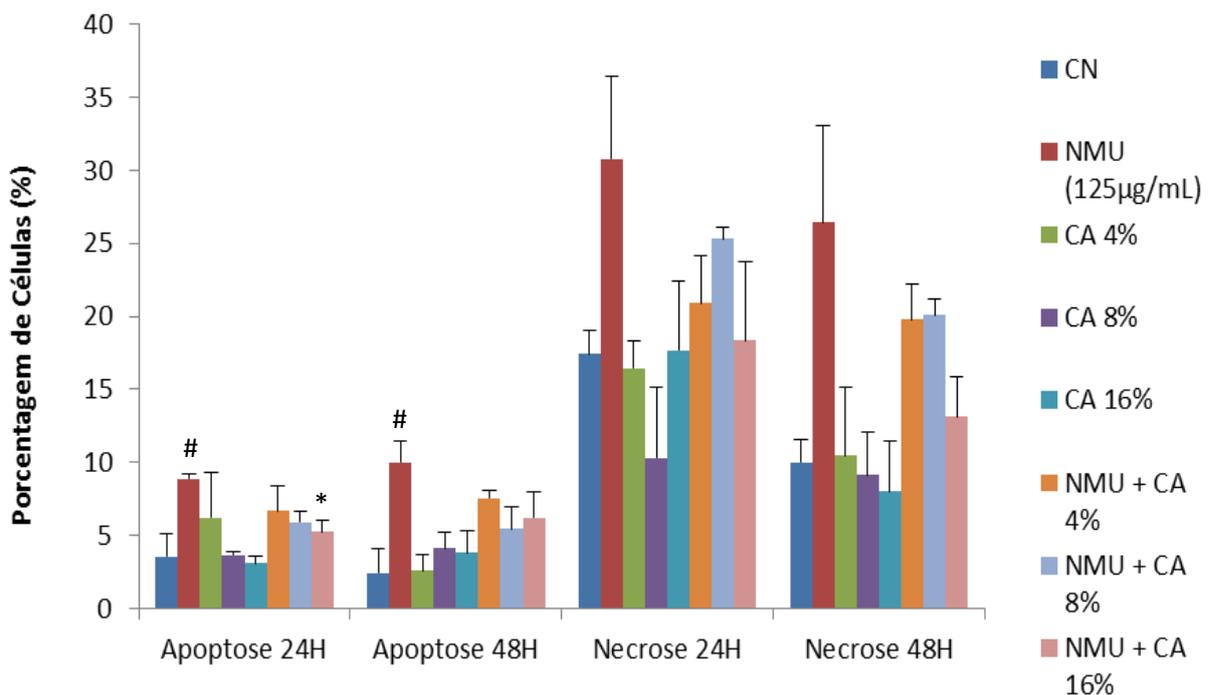
Os resultados do ensaio cometa mostraram que o CA tem a capacidade de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) o índice de dano (ID) ao DNA induzido pelo NMU (controle positivo) em todas as combinações NMU+CA testadas, caracterizando um claro efeito antígenotóxico do composto homeopático. O ID do NMU foi de 3,22, enquanto que os ID das combinações de NMU+CA foram de 1,20, 0,87 e 0,69 para as concentrações NMU+CA 4%, NMU+CA 8% e NMU+CA 16%, respectivamente. Houve também uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o ID do NMU (3,22) e o ID do controle negativo (0,81). Nas culturas celulares testadas apenas com CA não foram observadas variações significativas no ID dos linfócitos quando comparados ao ID do controle negativo (figura 8).



**Figura 8** - Índice de Dano observado na cultura de linfócitos após o tratamento com CA e CA + NMU. Média de três experimentos. \* ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo. # ( $p < 0,05$ ) em relação ao NMU (controle positivo). ANOVA com pós-teste de Tukey. CN (Controle Negativo), CA (CANOVA).

### 5.3 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE

A avaliação do potencial anticitotóxico do CA foi obtida após 24h e 48h de tratamento. De forma geral, observou-se uma diminuição tanto de células apoptóticas quanto necróticas nos tratamentos combinados de NMU+CA quando comparados ao tratamento somente com NMU nos dois tempos de coleta avaliados, no entanto, diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada apenas na porcentagem de células apoptóticas observadas após 24h de tratamento NMU + CA16% (5,22%) em relação ao tratamento somente com NMU (8.89%). Houve também diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a porcentagem de células apoptóticas induzidas pelo NMU após 24h de tratamento em relação ao seu controle negativo (3,56%) e entre o NMU (10%) e o controle negativo (2,44%) após 48 h de tratamento (figura 9).



**Figura 9** - Indução de apoptose e necrose em linfócitos submetidas a diferentes concentrações de CA juntamente com NMU. 300 células analisadas. \*( $p < 0,05$ ) em relação ao NMU (controle positivo). #( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo. ANOVA com pós-teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

A homeopatia tem um papel fundamental na melhora dos quadros clínicos de muitos indivíduos, contudo, sempre se faz necessária a realização de pesquisas que fundamentem sua utilização, seja em tratamento apenas com o medicamento homeopático ou em combinação com algum outro fármaco, de maneira que se potencialize os efeitos benéficos no indivíduo (CANOVA, 2012).

O CA é um imunomodulador brasileiro de formulação homeopática indicado em condições clínicas nas quais o sistema imune se encontra comprometido (BUCHI & VECCHIO, 2002; CANOVA, 2012). Assim, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos antigenotóxicos e anticitotóxicos deste medicamento contra danos genéticos induzidos pelo NMU, um potente agente alquilante carcinogênico (WURDEMAN, 1993).

Os conhecidos efeitos genotóxicos do NMU foram verificados no presente estudo, através de um significativo aumento do ID em células tratadas exclusivamente com este agente (figura 8). Este aumento do ID pode ser explicado pelo principal mecanismo de ação do NMU na célula, ou seja, a indução de O<sup>6</sup>-metil-Guanina na cadeia de DNA (FEITSMA *et al.*, 2008), gerando ciclos fúteis que resultarão em quebras de simples e dupla fita (figura 3).

Adicionalmente, um aumento significativo de células apoptóticas em culturas tratadas exclusivamente com NMU também foi observado no presente estudo (figura 9). Segundo Budan *et al.* (2009), o NMU induz um aumento na expressão do gene *TP53* em experimentos utilizando ratos como modelo experimental. Assim, o aumento de células apoptóticas pode estar relacionado a este mecanismo. Vale salientar que, além da aumentada frequência de células apoptóticas, foi também observado um aumento considerável (ainda que não significativo) de células necróticas nos tratamentos com NMU somente. A forte queda na viabilidade dos linfócitos tratados com diferentes concentrações de NMU (figura 7) pode, possivelmente, ser explicada devido ao fato dos dois tipos de morte celular estar ocorrendo simultaneamente.

No presente estudo não foi observado efeito genotóxico, e nem citotóxico, em culturas celulares tratadas exclusivamente com as diferentes concentrações de CA (figura 9). O único trabalho disponível na literatura que avaliou os efeitos genotóxicos do CA é o de Seligmann *et al.* (2003). Estes autores demonstraram que CA não é genotóxico para linfócitos de sangue periférico por meio de análise de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais. Adicionalmente, os autores demonstraram que CA não é citotóxico por meio da análise do índice mitótico.

Em um trabalho de 2011, Oliveira *et al.* realizaram testes com misturas de compostos altamente diluídos contendo, entre outros, *Thuja occidentalis*, *Arsenicum album* e *Aconitum napellus* (presentes na formulação do CA). Os autores utilizaram as linhagens neoplásicas HT29 (câncer de colo retal) e K562 (leucemia mielóide), além de monócitos e macrófagos, para avaliar a indução de apoptose por Anexina V. Os resultados mostraram que nenhuma das misturas induziu citotoxicidade para todas as células testadas. Tais resultados, juntamente com os resultados do trabalho de Seligmann *et al.* (2003), corroboram nossos dados de ausência de apoptose após tratamento com CA (Figura 9).

No presente estudo, o efeito genotóxico do NMU foi significativamente reduzido quando as células eram tratadas simultaneamente com CA (CA+NMU) (figura 8). Resultados similares foram observados no trabalho de Matos (2009). Este autor demonstrou que CA era capaz de diminuir o ID e a frequência de micronúcleos induzidos pelo NMU em animais da espécie *Cebus apella* tratados *in vivo* com tais compostos, caracterizando as atividades antigenotóxica e antimutagênica do CA.

O mecanismo preciso pelo qual CA atua ainda é desconhecido. A grande maioria dos estudos leva em conta seu papel em macrófagos, uma vez que estas células, quando tratadas com CA, aumentam sua atividade de NAD(P)H oxidases bem como a de iNOS, o que induz a produção, respectivamente, de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico. Tais efeitos induzem a ativação dos macrófagos promovendo modificações que resultam no aumento da resposta imune do indivíduo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Com exceção do estudo de Seligmann *et al.* (2003), são inexistentes trabalhos que considerem os efeitos de CA em linfócitos. Os trabalhos existentes neste sentido mostram que CA induz a proliferação de linfócitos, mas de forma

indireta, como no trabalho de Burbano *et al.* (2009). Os autores deste trabalho cultivaram macrófagos de líquido ascítico intraperitoneal, provenientes de pacientes com adenocarcinoma gástrico primário, em meio contendo CA. Em seguida, este meio de cultura (suplementado com CA) foi reutilizado em cultura de linfócitos de sangue periférico. Foi observado que o meio suplementado aumentou o número de leucócitos em proliferação, como constatado pela avaliação do índice mitótico.

Estudo semelhante foi realizado por Moreira *et al.* (2012). Tais autores utilizaram CA para ativar macrófagos de *Cebus apella in vitro* e *ex vitro*. Em seguida, linfócitos dos animais foram cultivados no meio de cultura utilizado na ativação dos macrófagos. Por meio de citometria de fluxo, os resultados demonstraram que os linfócitos cultivados em meio suplementado com macrófagos ativados por tratamento com CA apresentaram uma maior proliferação celular em relação aos que não foram cultivados no meio suplementado. Da mesma forma que Seligmann *et al.* (2003), os trabalhos de Burbano *et al.* (2009) e Moreira *et al.* (2012) demonstram que o CA por si só não tem a capacidade de induzir a proliferação de linfócitos.

A caracterização dos efeitos antigenotóxicos e anticitotóxicos do CA é difícil, uma vez que são escassos os trabalhos que demonstrem os efeitos deste medicamento em linfócitos. No entanto, algumas inferências podem ser realizadas baseadas no trabalho de Oliveira *et al.* (2008). Utilizando a tecnologia de *microarrays*, estes autores avaliaram a expressão gênica diferencial de leucócitos peritoneais de camundongos tratados com CA. 147 genes foram diferencialmente expressos no grupo tratado com CA. Estes genes são principalmente envolvidos em transcrição/tradução, dinâmica e estrutura celular, resposta imune, citoproteção, processos enzimáticos e receptores/ligantes.

Dentre os genes citoprotetores induzidos nos experimentos de Oliveira *et al.* (2008), encontra-se o Hsp70-1, gene pertencente a família das *heat shock proteins*. Este grupo de genes é expresso em resposta ao calor extremo e a uma grande variedade de outros estímulos de estresse, que podem ser fisiológicos, físicos e químicos (YANG *et al.*, 2008). Alguns estudos, como o de Calini *et al.* (2003) tem demonstrado o papel desta família no processo de reparo de DNA. Em seu trabalho, tais autores demonstraram, através do teste do cometa, que células C3H 10T1/2 (fibroblasto de embriões de camundongos) apresentavam uma sensível diminuição

dos danos ao DNA induzidos por radiação ionizante, quando as mesmas eram previamente tratadas com água a 43°C por uma hora. A expressão da proteína Hsp70 foi confirmada por meio de *western blotting*.

Os mecanismos que induzem os efeitos antigenotóxicos induzidos por Hsp70 não são totalmente conhecidos. Uma hipótese seria a de que a translocação de Hsp70 para o núcleo, durante o estresse, poderia colaborar para estabilização da estrutura da cromatina, prevenindo que a mesma sofresse dano (CALINI *et al.*, 2003). Mecanismo semelhante pode ter ocorrido para que houvesse a diminuição do ID observada nos linfócitos tratados simultaneamente com CA e NMU, no presente trabalho.

Outro gene induzido pelo CA nos experimentos de Oliveira *et al.* (2008) foi o GADD45 $\beta$ . Este gene pertence a uma classe que tem sido implicada em sinalização de estresse em resposta a estímulos fisiológicos ou ambientais, que resultam em parada do ciclo celular, reparo do DNA, sobrevivência celular e senescência ou apoptose. O papel exato das proteínas GADD45 na apoptose ainda não foi totalmente esclarecido. Existem estudos que indicam que tais proteínas agem como próapoptóticas ou antiapoptóticas (LIEBERMANN e HOFFMAN, 2008).

Gupta *et al.* (2005) em um elegante trabalho demonstraram o papel anti-apoptótico do gene GADD45 $\beta$ . Os autores demonstraram que células de medula óssea de camundongos, nocauteadas para este gene, apresentavam uma maior sensibilidade a apoptose induzida por radiação ultravioleta e pelos quimioterápicos VP-16 e daunorrubicina em relação às células tipo-selvagem. A reintrodução do gene nas células nocauteadas restaurou seu fenótipo selvagem para apoptose. Este experimento mostra claramente que a proteína GADD45 $\beta$  protege as células hematopoiéticas do estresse genotóxico induzido por agentes quimioterápicos, ainda que os mecanismos pelo qual isto ocorra não sejam conhecidos. No entanto, sua função antiapoptótica, neste contexto, é clara. É possível que os efeitos antiapoptóticos do CA, observados no presente trabalho, possam também ter sido mediados por uma indução do gene GADD45 $\beta$  nos linfócitos tratados simultaneamente com CA+NMU. No entanto, tanto esta hipótese, quanto a participação de Hsp70 na antigenotoxicidade do CA necessitam de comprovação.

Os resultados do presente estudo possibilitam novas perspectivas para uso do CA, por demonstrar que, além de atuar como um excelente imunomodulador, CA tem um importante papel citoprotetor, uma vez que reduz significativamente os danos ao DNA induzidos pelo agente carcinogênico NMU.

## 7 CONCLUSÃO

- O NMU diminui significativamente a viabilidade de linfócitos;
- Todas as concentrações de CA, utilizadas no ensaio cometa, reduziram significativamente os danos causados pela administração do NMU, o que caracteriza uma ação antigenotóxica *in vitro* deste composto;
- CA reduziu significativamente a apoptose induzida pelo NMU no tratamento de 24h na cultura que continha NMU + CA 16%, o que caracteriza uma ação anticitotóxica *in vitro* deste composto.

## 8 REFERÊNCIAS

ABUD, A. P.; CESAR, B.; CAVAZZANI, L. F.; DE OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Activation of bone marrow cells treated with Canova in vitro. **Cell Biol. Int.** **30**: 808-816. 2006.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J. & SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res.**, **307**: 261-271. 1994.

AYRES, M.; AYRE, M. J.; AYRES, D. M & DOS SANTOS A. S. **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém Pará, 2007.

BUCHI, D.F. & VECCHIO, D.M. Qualidade vida para pacientes com câncer e AIDS. **Myta'y**. 1:33-38. 2002.

BUDÁN, F.; VARJAS, T.; NOWRASTEH, G.; PRANTNER, I.; VARGA, Z.; EMBER, A.; CSEH, J.; GOMBOS, K.; PÁZSIT, E.; GOBEL, G.; BAUER, M.; GRACZA, T.; ARANY, I.; PERJÉSI, P.; EMBER, I.; KISS, I. Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by chemical carcinogens (DMBA, MNU). **In Vivo** **23** (4):591-8, 2009.

BURBANO, R. R.; LEAL, M. F.; COSTA, J. B.; BAHIA, M. O.; LIMA, P. D. L.; KHAYAT, A. S.; SELIGMAN, I. C.; ASSUMPÇÃO, P. P.; BUCHI, D. F.; SMITH, M. A. C. Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. **Homeopathy** **98**: 45-48. 2009.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. **Mutation Research**. 627:31-5. 2007.

CALINI, V.; URANI, C.; CAMATINI, M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. **Toxicology in Vitro** **17**:561–566. 2003.

CAMPAGNA, M.; BEFFY, P.; DEL CARRATORE, R.; HAURI L.; SIMI, S.; BONATTI, S.; SIMILI, M. Diethylsulphate and Methylnitrosourea affect diferents targets in chinese hamsters fibroblast: Possible mechanisms of aneuploidy induction by these agents. **Mutagenesis**18 (5): 405-410. 2003.

Canova do Brasil (2012) Medicamento Imunomodulador Canova. Disponível em: <http://www.canovado brasil.com.br/>. Acessado em 3 de janeiro de 2012.

CESAR, B.; ABUD, A. P.; DE OLIVEIRA, C. C. Activation of mononuclear bone marrow cells treated in vitro with a complex homeopathic medication. **Micron** 39:461-470. 2008.

COOK, P. R. & BRAZELL, I. A. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. **Nature**, **263 (5579)**: 679 – 82. 1976.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; PAWSEY, S. A. & GIANNELLI, F. Changes induced by ultraviolet light in the superhelical DNA of lymphocytes from subjects with xeroderma pigmentosum and normal controls. **JCell Sci.**, **29**: 117 - 27. 1978.

CUNHA, L. A. **Avaliação *in vitro* do efeito genotóxico e citotóxico do extrato líquido cozido da raiz da *manihot esculenta crantz (1766)* – “tucupi” em cultura de linfócitos.** Dissertação de Mestrado –Universidade Federal do Pará. 2012.

CURY-BOAVENTURA, M.F.;POMPÉIA, C.;CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **ClinNutr.**, **23(4)**: 721-32. 2004.

DE FLORA, S.; IZZOTI, A.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R. M. Mechanism of N-acetylcysteine in the prevetion of DNA damage and cancer, with special reference to smoking related end-points. **Carcinogenesis. ClinNutr.** (7):999-1013. 2004.

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

DIETRICH, M; BLOCK, G; POGODA, J M; BUFFLER, P; HECHT, S; PRESTON-MARTIN, S. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. **Cancer Causes and Control**, 16:619–35. 2005.

DU, S; ZHANG, Y; LIN, X. Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. **Agricultural Science in China**, 6 (10): 1246-55. 2007.

ERIKSSON, S.; NYGREN, J. & AHNSTRÖM, G. Matrix association of early- and late-replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. **BiochimBiophysActa.**, **1590 (1 - 3)**: 103 - 8. 2002.

FEITSMA, H., AKAY, A., CUPPEN, E. Alkylation damage causes MMR-dependent chromosomal instability in vertebrate embryos. **Nucleic Acids Research.****22 (7)**: 999-1013. 2008.

FENECH, M.; MORLEY, A. The *in vitro* micronucleus technique. **Muta.Res.** **455**: 81-95. 2000.

GALLOWAY, S.; LORGE, E.; AARDEMA, MJ.; EASTMOND, D.; FELLOWS, M.; HEFLICH, R.; KIRKLAND, D.; LEVY, DD.; LYNCH, AM.; MARZIN, D.; MORITA, T.; SCHULER, M.; SPEIT, G. Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus). **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2011.

GAMEIRO, P. H. **Efeito antimutagênico do extrato aquoso de Agaricus brasiliensis em cultura de linfócitos humanos**. Monografia de conclusão de curso. UFPel. 56p. 2005.

GRIFFITHS, A.; MILLER, J.; SUZUKI, D. **Introdução à genética**. Guanabara koogan. 7 ed. 794p. 2002.

GUPTA, M.; GUPTA, S. K; BALLIET, A. G.; HOLLANDER, M. C.; FORNACE JR, A. J.; HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D. A. Hematopoietic cells from Gadd45 $\alpha$ - and Gadd45 $\beta$ -deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. **Oncogene** **24**, 7170–7179, 2005.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis** 18:45-51. 2003.

IL'YASOVA, D ; MCCARTHY, B J; ERDAL, S; SHIMEK, J; GOLDSTEIN, J; DOERGE, D R; MYERS, S R; VINEIS, P; WISHNOK, J S; SWENBERG, J A; BIGNE, D D; DAVIS, F G. Human Exposure to Selected Animal Neurocarcinogens: a biomarker-based assessment and implications for brain tumor epidemiology. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 12:175–87, 2009.

JÄGERSTAD, M; SKOG, K. Genotoxicity of heat-processed foods. **Mutation Research**; 574: 156-172, 2005.

KADA, T. & SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens-theirs modes of action. **Bioassays**. 7(3): 113-6. 1987.

KOLARIC, K. Combination chemotherapy with 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) and cyclophosphamide in solid tumors. **Z.Krebsforsch. Klin.Onkol.** 311-319. 1977.

LIEBERMANN, D. A. & HOFFMAN, B. Gadd45 in stress signaling. **Journal of Molecular Signaling** 3:15. 2008.

LIVIERO, L.;& VON BORSTEL, R. C. The 4<sup>th</sup> international Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: a summary. **Mutat. Res.**350 (1): 287-93. 1996.

LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D.F. Phagocytosis, endosomal/lisosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Mícron**. 37: 277-287. 2006.

LUTZ, W. K.; TIEDGE, O.; LUTZS, R. W.; STOPPER, H. Different types of combination effects for the induction of micronuclei in mouse lymphoma cells by binary mixtures of the genotoxic agents MMS, MNU and Genistein. **Toxicological Sciences**.86 (2): 318-323. 2005.

MATOS, L. A. **Avaliação *in vivo* dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do carcinógeno nitrosometilurea (NMU), e dos efeitos anti-genotóxicos e anti-mutagênicos do bioproduto Canova em *Cebus apella*.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará. 2009.

MENKE, M.; MEISTER, A.; SCHUBERT, I. N-Methyl-N-Nitrosourea induced DNA damage detected by the comet assay in *Vicia faba* nuclei during all interphase stage is not restricted to chromatid aberration hot spots. **Mutagenesis**,15 (6): 503-506. 2000.

MONTENEGRO, R.C.; VASCONCELLOS, M.C.; BEZERRA, F.S.; ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.& COSTA-LOTUFO, L.V. Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells. **Toxicology in vitro**.21: 795-800.2007.

MOREIRA, C. O. C.; COSTA J. F. F. B.; LEAL M. F.; ANDRADE E. F.; REZENDE A. P.; IMBELONI A. A.; MUNIZ J. A. P. C.; SMITH M. A. C.; BURBANO R. R.; ASSUMPÇÃO P. P. Lymphocyte proliferation stimulated by activated *Cebus apella* macrophages treated with a complex homeopathic immune response modifiers. **Homeopathy** 101, 74 – 79. 2012.

MOTA, T. C. **Avaliação *in vitro* dos efeitos genotóxicos e citotóxicos da droga antimalárica artesunato em linfócitos humanos.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará. 2011.

NANDI, S.; GUZMAN, R. C.; YANG, J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: A unifying hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 92: 3650-3657.1995.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Test Guideline N°487.OECDGuideline For TheTestingof Chemicals. OECD, Paris, 2010. Disponível em: [www.oecd.org/env/testguidelines](http://www.oecd.org/env/testguidelines). Acesso em 20/04/2012

OKADA, E.; FUJIISHI, Y.; YASUTAKE, N.; OHYAMA, W. Detection of micronucleated cell and gene expression changes in glandular stomach of mice treated with stomach-targeted carcinogens. **Mutation Research**,657: 39-42. 2008.

OLIVEIRA, C. C.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, S. M.; GUIMARÃES, F. S. F.; ANDRADE, L. F.; DI BERNARDI, R. P.; COLETTI, E. L. O.; KUCZERA, D.; DA LOZZO, E. J.; GONÇALVES, J. P.; TRINDADE, E. S.; F BUCHI, D. F. Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 11:101, 2011.

PENNINGTON, J A T. Dietary exposure models for nitrates and nitrites. **Food Control**, 9(6): 385-95, 1998.

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. **J. Infect.** 51: 157-164. 2005.

RAZIN, S. V.; GROMOVA, I. I. & IAROVAIA, O. V. Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. **IntRevCytol.**, 162 B: 405 - 48. 1995.

RIBEIRO, H. F. **Caracterização citogenética de linhagem celular de neoplasia gástrica e seu uso como modelo experimental para análise de expressão gênica e ciclo celular.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará. 2011.

RIBEIRO, R.; SALVADOR, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Canoas Ed. ULBRA. 356p. 2003.

RODIER, F.; CAMPISI, J.; BHAUMIK, D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. **Nucleic Acids Research**, 35 (22):7475-7484. 2007.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology.** New York: Mosby, 201p. 2001.

ROSTOCK, M.; NAUMANN, J.; GUETHLIN, C.; GUENTHER, L.; BARTSCH, H. H.; WALACH, H. Classical homeopathy in the treatment of cancer patients – a prospective observational study of two independent cohorts. **BMC Cancer**, 11-19, 2011.

RUSSO, I. H. & RUSSO, J. Mammary gland neoplasia in long term rodent studies. **Environ. Health Perspect.** **104**: 938-967. 1996.

SANTOS, R. A.; TAKAHASHI, C. S. Anticlastogenic and antigenotoxic effects of selenomethionine on doxorubicin-induced damage in vitro in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology** **46**, 671–677, 2008.

SASAKI, M. G. M.; MARIANO, F. C.; GURGEL, L. P.; PROBST, S. 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 antiretrovirais. **Braz J. Infect Dis.** **5**: 58. 2001.

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 an sarcoma 180-bearing mice treated with a brazilian homeopathic medication. **Homeopathy**. **94**: 26-32. 2005.

SELIGMANN, I. C.; LIMA, P. D.; CARDOSO, P. C.; KHAYAT, A. S.; BAHIA, M. O.; BUCHI, D. F.; CABRAL, I. R.; BURBANO, R. R. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. **Genet. Mol. Res.** **2**: 222-228. 2003.

Sigma-Aldrich®. N1517N-nitroso-N-methylurea ISOPAC®. 2009. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n1517?lang=pt&region=BR>. Acessado em 21 de março de 2010.

SILVA, S.; KOVALCHUK, A. L.; KIM, J. S.; KLEIN, G.; JANZ, S. BCL2 accelerates inflammation induced BALB/c plasmacytomas and promotes novel tumor with coexisting T (12;15) and T (6;15) translocation. **Cancer Research.** **63 (24)**: 8656-63. 2003.

SINGH, M. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. & SCHNEIDER, P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. **Exp. Cell Res.**, **175**: 184-191. 1988.

SMIT E., HM OBERHOLZER H. M., PRETORIUS E. A review of immunomodulators with reference to Canova®. **Homeopathy** **98**, 169–176, 2009.

SNUSTAD, P. & SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Guanabara koogan. 4 ed. 922p. 2008.

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U. P.; ADAMSON, R. H. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. **Proc.Jpn. Acad., Ser. B.** 84:176-188. 2008.

TAKEUCHI, P. L.; ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI C. S. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of vitamin B<sub>6</sub> in human lymphocyte cultures. **Toxicology in Vitro** 21, 665–670, 2007.

THORGEIRSSON, U. P.; DALGARD, D. W.; REEVES, J.; ADAMSON, R. H. Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. **Regul.Toxicol.Pharmacol.** 19:130-151. 1994.

TRONOV, V. A.; KRAMARENKO, I. I.; KOZLOVA, A. D.; DEDERER, L. J.; KEDROVA, A. G.; GORBATCHEVA, L. B. Sensitivity of human lymphocytes to genotoxic effect of N-Methyl-N-Nitrosourea: Possible relation to gynecological cancers. **Exp. Oncol.**28 (4): 314-318. 2006.

TSUBURA, A.; LAI, Y. C.; MIKI, H.; SASAKI, T.; UEHARA, N.; YURI, T.; YOSHIZAWA, K. Review: Animal Models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced Mammary Cancer and Retinal Degeneration with Special Emphasis on Therapeutic Trials. **In Vivo**, v. 25, n. 1, p. 11-22. 2011.

VALADARES, M.C.; CASTRO, C.N.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43 (4). 2007.

VASKOVÁ J., KASSAYOVÁ M., VASKO L. Potential role of melatonin in DNA damage caused by nitrosourea-induced mammary carcinogenesis. **ActaHistochemica** 113, 423–427, 2011.

VEGH, I. & SALAMANCA, R. E. Prolactin , TNF alpha and nitric oxide expression in nitroso-N-methylurea induced mammary tumor. **J. Carcinogenesis.**6: 18. 2007.

VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D. M. & COFFEY, D. S. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. **Cell**, **22** (1 Pt 1): 79 - 85. 1980.

WURDEMAN, R. L.; MICHELLE, C.; DOUSKEY, M. C.; GOLD, B. DNA methylation by N-methyl-N-Nitrosourea: methylation pattern changes in single and double-stranded DNA, and in DNA with mismatched or bulged guanines. **Nucleic Acids Research**, **21** (21): 4975-4980. 1993.

YANG X.; YUAN, J.; SUN, J.; WANG, H.; LIANG, H.; BAI, Y.; GUO, L.; TAN, H.; YANG, M.; WANG, J.; SU, J.; CHEN, Y.; TANGUAY, R. M.; WU, T. Association between heat-shock protein 70 gene polymorphisms and DNA damage in peripheral blood lymphocytes among coke-oven workers. **Mutation Research** **649**.221–229. 2008.

ZULLIGER R., LECAUDÉ S., EIGELDINGER-BERTHOU S., WOLF-SCHNURRBUSCH U. E. K., ENZMANN V. Caspase-3-independent photoreceptor degeneration by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induces morphological and functional changes in the mouse retina. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol** **249**:859–869, 2011.

**ANEXO 1**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**AValiaÇÃO DO EFEITO ANTIGENOTÓXICO E ANTICITOTÓXICO DO BIOPRODUTO MÉTODO**  
**CANOVA®**

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. O Laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará está desenvolvendo uma pesquisa que visa detectar *in vitro* os efeitos antigenotóxicos e anticitotóxicos do produto homeopático Método Canova em linfócitos de indivíduos saudáveis, quando expostos ao carcinogênico NMU. O Método CANOVA® (CA) é um imunomodulador brasileiro de formulação homeopática indicado em condições clínicas nas quais o sistema imune se encontra comprometido. O N-Metil-N-Nitrosourea (NMU) é um agente N-nitroso alquilante, que apresenta efeitos genotóxicos/mutagênicos. Apesar de vários estudos terem demonstrado resultados promissores na utilização do medicamento CA, não existem trabalhos relatando possíveis efeitos antigenotóxicos deste medicamento, a despeito de seu potencial anticarcinogênico.

Será obtida uma amostra de sangue (20mL) através de punção venosa, realizada por profissional qualificado. A obtenção do sangue para a pesquisa não implicará risco a você. O sangue coletado primeiramente será tratado *in vitro* com Canova e NMU, em seguida, ele será utilizado para análise no ensaio cometa e na avaliação de apoptose. Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que o Canova consegue minimizar os efeitos causados pelo NMU. Somente ao final do estudo, poderemos identificar a presença de algum benefício.

Em qualquer etapa do estudo, você ou seu responsável terão acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para esclarecimento de dúvidas. Os principais pesquisadores são os Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia e o mestrando Henrique Nascimento que podem ser encontrados no Laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Correa, 01, Belém –PA, telefone (091)3201-7102.

-----  
 Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação do efeito antigenotóxico e anticitotóxico do bioproduto Método Canova®”.

Eu discuti com o Dr. Marcelo de Oliveira Bahia sobre minha decisão de participar do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o processo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Assinatura do voluntário

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e esclarecido deste voluntário ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia  
 Fone: (91) 3226-8298/8869-8332