



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

DANIELLE CRISTINNE AZEVEDO FEIO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA CELULAR OBSERVADO EM
INDIVÍDUOS DA ESPÉCIE *Cebus apella* EXPOSTOS AO CARCINÓGENO N-
METIL-N-NITROSURÉIA (MNU) E TRATADOS COM O MODIFICADOR DA
RESPOSTA IMUNE CANOVA®.

BELÉM-PA

2011

DANIELLE CRISTINNE AZEVEDO FEIO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA CELULAR OBSERVADO EM INDIVÍDUOS
DA ESPÉCIE *Cebus apella* EXPOSTOS AO CARCINÓGENO N-METIL-N-
NITROSURÉIA (MNU) E TRATADOS COM O MODIFICADOR DA RESPOSTA IMUNE
CANOVA®.

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

Orientadora: Prof^ª. Dr. Patrícia Danielle Lima de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Jr.

BELÉM-PA

2011

DANIELLE CRISTINNE AZEVEDO FEIO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA CELULAR OBSERVADO EM INDIVÍDUOS
DA ESPÉCIE *Cebus apella* EXPOSTOS AO CARCINÓGENO N-METIL-N-
NITROSURÉIA (MNU) E TRATADOS COM O MODIFICADOR DA RESPOSTA IMUNE
CANOVA®.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Danielle Lima de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Jr.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Danielle Lima de Lima

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UEPA (Orientadora)

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof^a Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA (Suplente)

“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembra-vos de que as grandes proezas da história foram
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho

A Deus por me abençoar a cada dia.

A minha orientadora Prof^a. Patrícia, pelos ensinamentos, dedicação, carinho e amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Lacy pela paciência, grandes ensinamentos e amizade.

Aos meus pais e irmãos pelo amor e apoio incondicional.

E ao Paulo pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica, Instituto de Ciências Biológicas.

Universidade Estadual do Pará (UEPA) - Laboratório de Biologia Molecular.

Fundação HEMOPA – Laboratório de Biologia Molecular e Celular.

Centro Nacional de Primatas (CENP) – Ananindeua, Belém – Pará.

CANOVA DO BRASIL. LTDA.

FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

– Bolsa de mestrado.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Patrícia Lima, meus sinceros agradecimentos pela orientação, ensinamentos, suporte, paciência e amizade nesses anos de trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior, meus agradecimentos pela a oportunidade, incentivo, amizade, orientação neste trabalho e em outros projetos.

Ao professor Dr. Rommel Burbano, pela oportunidade e acolhida no seu projeto e na permissão da utilização das instalações Laboratório de Citogenética Humana, obrigado “tio” por tudo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia e a Prof^a. Dr^a. Raquel Montenegro pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

A equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, a todos os seus professores e funcionários. E principalmente a Universidade Federal do Pará.

A CAPES por concessão de uma bolsa de estudos.

A Fundação HEMOPA, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento deste projeto.

Ao médico veterinário do CENP José Augusto Muniz, pesquisador responsável pela minha permanência na instituição durante todo período experimental. Obrigado pela recepção cordial e colaboração em nosso trabalho.

Aos estudantes de medicina veterinária e estagiários do CENP, José Luís e Diana Mejido. Obrigado pela disponibilidade e desejo em ajudar.

A todos os funcionários do CENP, especialmente os responsáveis pelo galpão experimental I, pelo complexo clínico-cirúrgico e pelo Laboratório de Análises Clínicas. Obrigado pela força e pela inestimável colaboração.

Aos amigos de sempre e para sempre.

Ao Paulinho meu amor, pelo carinho e dedicação. E principalmente por estar sempre presente com seu companheirismo, compreensão e muita paciência.

A minha família e a Kátia, por todo o amor e o apoio incondicional em todos os momentos de minha formação, seja acadêmica ou familiar.

Finalmente, agradeço em especial aos animais utilizados neste experimento. Almejamos que os resultados obtidos justifiquem sua utilização.

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS	v
AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MODIFICADOR DA RESPOSTA IMUNE CANOVA®	1
1.2 RESPOSTA IMUNE FRENTE A TUMORES	4
1.3 CICLO CELULAR	4
1.4 N-METIL-N-NITRUSURÉIA (MNU).....	6
1.5 PRIMATAS NÃO HUMANOS	9
1.6 PADRÃO DE NORMALIDADE HEMATOLÓGICA EM <i>Cebus apella</i> E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DE AVALIAÇÃO FRENTE ÀS DROGAS	10
1.7 JUSTIFICATIVA	13
2. OBJETIVO GERAL	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATÉRIAS E MÉTODOS	16
3.1. ANIMAIS E TRATAMENTOS	16
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	19
3.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA	20
3.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA	20
3.5 CULTURA CELULAR DE LINFOCITOS E TESTE DE CICLO CELULAR	20
3.6 IMUNOFENOTIPAGEM	21
3.6.1 Estratégia de aquisição dos dados	22
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	25
4.1 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS.....	25
4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	26
4.3 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS	29

4.4 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO CICLO CELULAR.....	31
4.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM.....	32
6 DISCUSSÃO	34
6.1 PADRÕES DE PESO	35
6.2 PADRÕES HEMATOLÓGICOS	35
6.3 PADRÕES BIOQUÍMICOS	37
6.4 CICLO CELULAR	38
6.4 IMUNOFENOTIPAGEM	39
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO 1.....	49

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBULOS

µl	Microlitro
7-AAD	7-Amino-Actinomicina
AGT	O6-Alquilguanina-DNA Alquiltransferase
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
C	Citosina
CA	Modificador da Resposta Imune Canova®
CD	Cluster Designation
CDKI	Inibidor da Cinase Dependente de Ciclina
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclinas
CENP	Centro Nacional de Primatas
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CN	Grupo Controle Negativo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CP1	Grupo Controle Positivo 1
CP2	Grupo Controle Positivo 2
DAPI	4'6-D-2-Diamidino Phenylindole
dH	Escala decimal de Hering
dl	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
EXP.1	Grupo Experimental 1
EXP.2	Grupo Experimental 2
EXP.3	Grupo Experimental 3
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocinato de Fluoresceína
FSC	Forward Light Scatter
g	Grama
GGT	Gama-Glutamil Transferase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

IL	Interleucina
Kg	Kilograma
M	Mitose
Máx.	Máximo
mg	Miligrama
MGMT	O6-Methylguanine-DNA Methyl-Transferase
Mín.	Mínimo
ml	Mililitro
MMR	Sistema de Reparo <i>Mismatch</i>
MNU	N-Metil-N-Nitrosuréia
N7-G	N7-Guanina
N7-MeG	N7-Metilguanina
NK	Natural Killer
O6-G	O6-Guanina
O6-MeG	O6-Metil-Guanina
PA	Pará
PE	Ficoeritrina
Percyp	Proteína da Clorofila Peridinina
PI	Iodeto de Propídio
SSC	Side Scatter
SVS	Secretaria De Vigilância em Saúde
T	Timina
TGO	Aspartato Aminotransferase
TGP	Alanina Aminotransferase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UEPA	Universidade Estadual do Pará
UFPA	Universidade Federal do Pará
VCM	Volume Corpuscular Médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases e pontos de checagem do ciclo celular.....	5
Figura 2- Estrutura química do N-Metil-N-Nitrosuréia	6
Figura 3 - Mecanismo de ação do NMU	7
Figura 4 - (A) Recintos de alvenaria revestidos de azulejo e tela metálica, utilizados para alojar os animais, onde se evidencia as gaiolas individuais, (B) Visão externa do galpão experimental I do CENP.....	16
Figura 5 - Esquema do delineamento experimental	18
Figura 6 - Coleta de sangue por venopunção da veia femoral direita	19
Figura 7 - Sequência de procedimentos para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo	23
Figura 8 - Histograma de seleção da população celular de interesse (R1)	23
Figura 9 - Histograma do Ciclo Celular	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos experimentais de carcinogênese e mutagênese utilizando o MNU de acordo com o autor, ano e animal	9
Tabela 2 - Valores normais dos constituintes hematológicos de <i>Cebus apella</i> em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos	11
Tabela 3 - Valores normais dos marcadores bioquímicos de <i>Cebus apella</i> em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos	12
Tabela 4 - Divisão dos grupos controles e experimentais de acordo com o tratamento	17
Tabela 5 - Painel de AcMo utilizado para análise do perfil de reposta celular	22
Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão do peso dos animais dos grupos controle (negativo e positivo) e experimentais	25
Tabela 7 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros hematológicos	28
Tabela 8 - Valores de média e desvio padrão obtidos da análise dos parâmetros bioquímicos	30
Tabela 9 - Valores obtidos de média e desvio padrão da análise do ciclo celular.....	31
Tabela 10 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores imunológicos (Imunofenotipagem)	33

RESUMO

O Modificador da Resposta Imune Canova® (CA) é um medicamento homeopático indicado para pacientes com sistema imune deprimido, uma vez que este medicamento parece aumentar a imunidade inata e induzir uma resposta imune contra várias e severas condições patológicas, incluindo as neoplasias. Esse aumento da imunidade inata é devido a sua atuação na proliferação e na diferenciação de células hematopoéticas e na indução a diferenciação mononuclear em células da medula óssea. O composto químico N-Metil N-Nitrosuréia (MNU) é um poderoso agente carcinogênico alquilante capaz de ocasionar mutações pontuais, aberrações cromossômicas ou ainda metilação do DNA, que induzem o desequilíbrio no sistema de defesa da célula e, assim, interrompendo mecanismos relacionados a metabolismo celular. Este composto tem sido amplamente utilizado na indução de tumores de fins experimentais. Objetivo do presente trabalho é avaliar o padrão de resposta celular hematopoiética em primatas da espécie *Cebus apella* expostos ao carcinógeno N-Metil-N-Nitrosuréia (MNU) e submetidos ao tratamento com o Modificador da Resposta Imune Canova®, através da análise de parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunes e do ciclo celular. Foram utilizados 13 (treze) animais adultos, da espécie *Cebus apella* divididos em cinco grupos principais: o controle (negativo e positivo) e o experimental (composto por três subgrupos). O primeiro grupo experimental recebeu o MNU durante trinta e cinco dias, o segundo recebeu o tratamento com o Canova durante três dias, e o terceiro recebeu o MNU durante 35 dias e ao final desse período recebeu tratamento com o Canova durante três dias. A avaliação da resposta celular imune foi através de imunofenotipagem (CD4, CD8, CD3, T, B, NK) e do hemograma completo, a função hepática e renal através análise bioquímica (ALT, AST, GGT, ureia e creatinina) e a avaliação da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo. Na análise dos parâmetros hematológicos os valores de hematócrito, hemácias e hemoglobina dos grupos controle positivo apresentaram-se significativamente menores, quando comparados aos grupos controle negativo, demonstrando um quadro de anemia, já o aumento de células da linhagem branca nesses grupos provavelmente é devido à resposta inflamatória do animal frente ao provável processo neoplásico. O aumento dos leucócitos também foi observado nos grupos experimentais tratados com o CA, fato este explicado pela ação do medicamento, que atua como um modificador da resposta imune. Apesar de já ter sido relatado que CA pode atuar aumentando o número de neutrófilos, no presente estudo não observamos esta ação do medicamento, provavelmente pelo curto período de tempo do tratamento. Os monócitos apresentaram-se diminuído no grupo tratado com o MNU e aumentado nos grupos que receberam CA provavelmente pelo medicamento atuar na ativação de macrófagos via estimulação da de monócitos. Na análise bioquímica, a uréia e a creatinina apresentaram-se alteradas nos grupos que receberam o MNU de forma aguda, estas alterações, bem como as encontradas na análise de enzimas hepáticas, podem ser associadas com os sintomas típicos da intoxicação por drogas carcinogênicas. Na análise da cinética do ciclo celular os animais tratados com CA, houve um aumento significativo de células nas fases G₀-G₁ bem como a porcentagem de células em estágio de proliferação celular (fases G₂-M). Concluímos que CA minimizou a toxicidade do MNU em certos parâmetros hematológicos e bioquímicos, podemos observar a sua habilidade parcialmente modificadora da resposta imune, por aumentar a contagem de leucócitos, porém sem alterar o padrão de marcadores imunológicos. Desta forma CA então é capaz de restaurar alguns componentes do sistema hematopoiético, e pode atuar como adjuvante em tratamentos de quimioterapia.

Palavras-chave: Canova. MNU. *Cebus apella*. Resposta celular.

SUMMARY

The Immune response modifier Canova® (CA) is a homeopathic drug indicated for patients with a depressed immune system, once this medicine appears to increase the innate immunity and induce an immune response against multiple and severe pathological conditions, including Neoplasms. This increase of innate immunity is due to its involvement in the proliferation and differentiation of hematopoietic cells and mononuclear differentiation induction in bone marrow cells. The chemical compound N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU) is a alkylating agent powerful carcinogenic able to cause mutations, chromosomal aberrations and DNA methylation, that induce the imbalance in the defense system of the cell and thus stop mechanisms related to cellular metabolism. This compound has been widely used in the induction of experimental tumors. The goal of this work is to assess the pattern of hematopoietic cell response in *Cebus apella* primate species exposed to carcinogenic N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU) and subjected to the treatment with the Immune response modifier Canova®, through the analysis of biochemical, haematological, immune and cell cycle. We had used 13 (thirteen) adult animals of the species *Cebus apella* divided into five main groups: the control (negative and positive) and experimental (composed of three subgroups). The first experimental group received the MNU during thirty-five days, the second received treatment with Canova during three days, and the third received the MNU during 35 days and the end of this period received treatment with Canova during three days. Evaluation of cellular immune response was through immunophenotyping (CD3, CD4, CD8, T, B, NK) and complete blood count, liver and kidney function through biochemical analysis (ALT, AST, GGT, urea and creatinine) and kinetic evaluation of cell cycle by flow cytometry. Analysis of haematological values of hemoglobin, hematocrit and red blood cells of positive control groups performed significantly lower when compared to the negative control groups, demonstrating an anemia, while the increased white lineage cells in these groups is probably due to the animal's inflammatory response to neoplastic process. The increase of leukocytes has also been observed in experimental groups treated with the CA, a fact explained by the action of this drug, which acts as a modifier of immune response. Although it has been reported that CA can act by increasing the number of neutrophils, in this study we did not observe this action of the medicinal product, probably by the short time of treatment. Monocytes were decreased in the group treated with MNU and risen in groups that received CA probably by drug act in the activation of macrophages via stimulation of monocytes. In biochemical analysis, urea and creatinine were changed in the groups that received the MNU acutely, these changes, as well as those found in the analysis of liver enzymes, can be associated with typical symptoms of poisoning by carcinogenic drugs. Analysis of cell cycle kinetics of animals treated with CA, there had been a significant increase in cell G₀-G₁ as well as the percentage of cells in cellular proliferation stage (stageG₂-M). We found that CA had minimized the toxicity of the MNU in certain haematological and biochemical, we had observed their partially skill to modify immune response, as improve white blood cell count, but without changing the pattern of immunological markers. Then CA is able to restore some hematopoietic system components and can act as an adjuvant in chemotherapy treatments.

Keywords: Canova. MNU. *Cebus apella*. Cellular response.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODIFICADOR DA RESPOSTA IMUNE CANOVA®

O medicamento Modificador da Resposta Imune Canova® (CA) é um produto homeopático cuja composição final é formada por *Aconitum napellus* (Ranunculaceae) 11dH, *Bryonia alba* (Cucurbitaceae) 18dH, *Thuja occidentalis* (Cupressaceae) 19dH, *Arsenicum album* (Arsenioustrioxide) 19dH, veneno de *Lachesis muta* (Viperidae) 18dH e menos de 1% de álcool em água destilada. A metodologia do preparo de sua formulação é um processo patenteado pela empresa bem como, sua marca é registrada e de propriedade da indústria Canova do Brasil. O medicamento é apresentado nas formas de gotas sublinguais, inalante e flaconete (CANOVA, 2010).

CA está listado e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos desde março de 2001, sob o código 12655. Esse medicamento caracteriza-se por diluições dinamizadas e associadas conhecidas da farmacopéia brasileira. CA é uma solução aquosa, incolor e inodora que é vendida somente em farmácias e laboratórios autorizados. Estudos anteriores demonstraram que CA não é genotóxico nem citotóxico, por meio da análise de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais e por meio da análise do índice mitótico de linfócitos do sangue periférico em cultivo celular, respectivamente (SELIGMANN *et al.*, 2003).

Este medicamento parece atuar aumentando a imunidade do próprio indivíduo para provocar uma resposta imunológica particular contra diversos estados e condições patológicas. O primeiro estudo clínico com pacientes HIV positivos demonstrou que a administração de CA diminuiu a carga viral e a presença de doenças oportunista (SASAKI *et al.*, 2001).

Da mesma forma, uma melhoria da resposta imune de camundongos tratados com CA foi demonstrada em estudos com Sarcoma 180. Neste estudo, uma redução no tamanho do sarcoma foi demonstrada e uma significativa infiltração de células linfoides, granulação do tecido e fibrose ocorreu em torno do tumor. Todos os animais do grupo de tratamento sobreviveram, e em 30% deles foi observada a regressão total do tumor. Além disso, foi observado um aumento do número total de leucócitos e linfócitos, aumento de linfócitos T CD4 no grupo de camundongos normais tratados com CA e um aumento de linfócitos B e

células NK em todos os camundongos com sarcoma 180 tratados com CA (BUCHI & VECCHIO, 2002; SATO *et al.*, 2005).

Estudos anteriores demonstraram que CA ativa macrófagos *in vitro* e *in vivo*. Macrófagos de camundongos tratados com CA são ativados segundo critérios morfológicos, bioquímicos e moleculares, como, por exemplo, a alteração na distribuição de $\alpha 5$ - $\beta 1$ integrinas, receptores de fatores de crescimento e de filamentos de actina e a redução da produção de TNF- α . Esses resultados indicaram um processo de ativação de macrófagos por CA (PIEMONTE & BUCHI 2002).

A investigação dos aspectos celulares da ativação de macrófagos por CA, através da ação da fosfatase ácida em macrófagos peritoneais expostos ao medicamento *in vitro* e *in vivo*, revelaram que o tratamento estimula o aumento do sistema endossomal/lisossomal, assim como, alterações morfológicas dos macrófagos, incluindo um aumento em suas áreas de propagação. Este pode ser um evento fundamental para o reforço da capacidade fagocitária, demonstrando que o medicamento é um estimulador eficaz da atividade dos macrófagos e sugerindo uma melhora na resistência contra agentes infecciosos e parasitários favorecendo desta forma uma resposta imunológica específica para esses microrganismos através da via fagocítica, com melhora da imunidade (LOPES *et al.*, 2006).

O efeito do modificador da resposta imune em modelo experimental de infecção por *Leishmania amazonenses in vitro*, demonstrou que 40% do índice de infecção foi reduzido e provocou a produção induzida de macrófagos, bem como a diminuição da carga parasitária na região dos gânglios linfáticos e no baço. Os autores sugeriram que CA no modelo experimental, modula os limites de controle da infecção, progressão e disseminação (PEREIRA *et al.*, 2005).

A investigação da ativação de células da medula óssea de ratos tratados com o Modificador da Resposta Imune Canova® *in vitro*, proposto por Abud e colaboradores (2006) tinha como objetivo determinar se o medicamento pode promover a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células da medula óssea de ratos. Os resultados mostraram um aumento no número de ativação de células aderentes (maioria de macrófagos CD11 +) no grupo tratado com CA. Os autores concluíram que ele pode ter um papel nas doenças que afetam as células da medula óssea.

A ação do efeito do CA sobre a produção de citocinas e expressão de genes de macrófagos foi estudado em camundongos, onde aparentemente o medicamento acarreta uma diminuição na expressão de IL-2 e produção de IL-4 e também uma expressão diferencial em 147 genes nos grupo tratados com CA. Estes genes estão envolvidos principalmente em

processos de transcrição/tradução de proteínas responsáveis pela estrutura dinâmica da célula, a resposta imune, processo citoprotetor enzimático, e produção de receptores e ligantes. A análise da expressão gênica deste estudo demonstrou que o medicamento altera e provoca uma reação no perfil da expressão gênica principalmente nos eventos relacionados à ativação de macrófagos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Efeitos na morfologia de plaquetas de pacientes HIV positivos tratados com o Modificador da Resposta Imune Canova® foram investigados. Segundo este estudo ligeiras alterações morfológicas foram observadas nas redes de fibrina, sugerindo que o HIV não causa impacto sobre a fragilidade das redes de fibrina. Em compensação, em pacientes com HIV existe uma protuberâncias na membrana das plaquetas, bem como uma ruptura visível da membrana no agregado, enquanto que nos pacientes tratados com o Modificador da Resposta Imune Canova® as protuberâncias da membrana são muito menos aparentes e há grandes áreas intactas na membrana, com visíveis áreas canaliculares lisas, sugerindo que CA protege as membranas das plaquetas e que as protuberâncias não aparecem em proporções tão grandes como foi encontrado no grupo HIV não tratado. Estes resultados dão suporte e fornecem evidências de que o CA protege o sistema imunológico de pacientes imunocomprometidos, mantendo intacta a membrana das plaquetas impedindo, assim, os efeitos cito-destrutivos devastadores do HIV (PRETORIUS *et al.*, 2009).

Um estudo demonstrou que CA induz indiretamente a proliferação de linfócitos por meio da ativação de macrófagos. Neste estudo, os autores primeiramente cultivaram macrófagos de líquido ascítico intraperitoneal, provenientes de pacientes com adenocarcinoma gástrico primário, em meio contendo CA. Em seguida, este meio de cultura (suplementado) foi separado e 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 (BURBANO *et al.*, 2009).

O Modificador da Resposta Imune Canova® é um medicamento do complexo homeopático, não aparenta ter efeitos colaterais, regula a defesa do hospedeiro, ativando macrófagos e o TNF- α , que desempenham um papel importante em processos inflamatórios, melhoram a resposta imunológica no câncer inoculados em camundongos, estimulam a diferenciação dos monócitos e modulam outros processos inflamatórios. Desta forma, o medicamento pode potencialmente ser usado como uma droga terapêutica, que é menos tóxico do que alguns reagentes, ou ser usado como um adjuvante útil ou uma terapia complementar (ABUD *et al.*, 2006; SMIT *et al.*, 2009).

1.4 RESPOSTA IMUNE FRENTE A TUMORES

O sistema imunológico envolve reações iniciais da imunidade inata e respostas posteriores da imunidade adquirida (adaptativa) que estão associadas a proteção do hospedeiro contra patógenos (ABBAS *et al.*, 2008).

Os sistemas imunes inato e adaptativo apesar de serem frequentemente descritos como contrastantes costumam acontecer de modo conjunto já que componentes do sistema inato contribuem para a ativação das células antígeno-específicas que ampliam suas ações através do recrutamento de mecanismos efetores para conseguirem atuar contra microrganismos invasores. Assim, a sinergia entre elas é essencial para uma resposta imune eficaz (CHAPLIN, 2006).

Os principais componentes da resposta imune adaptativa são os linfócitos B e T e seus produtos como os anticorpos específicos (JANEWAY *et al.*, 2007). Os linfócitos T correspondem de 65 a 80% dos linfócitos circulantes e são subdivididos em linfócitos T citotóxicos (expressam o antígeno CD8 na superfície) e T auxiliar (expressam o antígeno CD4 na superfície) (ZAGO *et al.*, 2004). Normalmente, cerca de 65% de células T no sangue em circulação são CD4 + e 35% são CD8+ (CHAPLIN, 2010).

O sistema imunológico pode identificar e destruir células tumorais, funcionando como uma importante defesa contra o câncer. Dados obtidos a partir de inúmeras investigações ofereceram evidências convincentes de que determinado tipos de células e moléculas efetoras das respostas imune inata e adaptativa podem, às vezes, coletivamente funcionar como mecanismos de supressores tumorais extrínsecos (VESELY *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento de modificadores da resposta imune pode reforçar uma resposta imunológica específica contra o câncer (SMIT *et al.*, 2009).

1.3. CICLO CELULAR

O ciclo celular é o conjunto ordenado de eventos cujo objetivo final é a proliferação celular e sua divisão em duas células filhas sendo este composto por cinco etapas sequenciais: G₀, G₁, S, G₂ e M (Figura 3). Durante a fase S, as células executam a duplicação do material genético e na fase M (ou mitose) ocorre a separação igual de todos os componentes celulares

entre duas novas células filhas. Existem, por sua vez, outras duas fases de intervalo do ciclo celular, uma em G_1 onde ocorre o aumento da célula e a síntese de proteínas para preparação da replicação do DNA e outras em G_2 onde ocorre à síntese proteica adicional estimulada pela ciclinas. Enquanto na fase G_0 as células entram em um estado de inativação especializado (ALBERT *et al.*, 2004; EYMIN & GAZZERI, 2010).

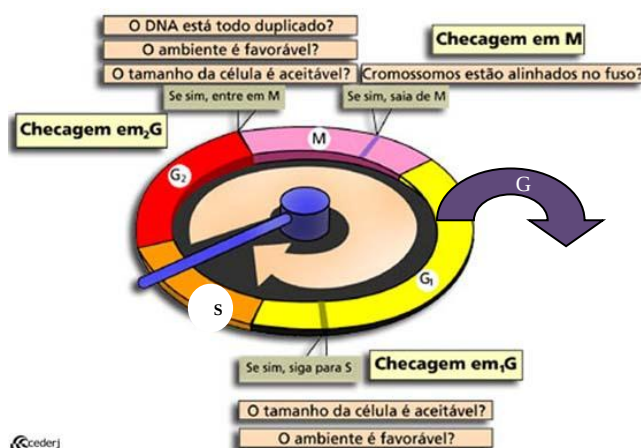


Figura 3 - Fases e pontos de checagem do ciclo celular. Fonte: Cederj, 2011.

Com o objetivo de evitar acúmulos de defeitos genéticos controles moleculares decidem se a divisão celular deve proceder ou adiar. As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são as principais proteínas reguladoras da transição das fases do ciclo celular, sendo compostas por uma família de proteína cinase serina/treonina que são ativadas ou inativadas em pontos específicos por eventos de fosforilação. Os níveis de proteínas CDKs permanecem estáveis durante o ciclo celular, já suas proteínas de ativação, as ciclinas podem estar fosforiladas ou desfosforiladas, desta forma ativando as CDKs. As CDKs têm ainda, sua atividade negativamente regulada por inibidores denominados de CDKI (inibidor da cinase dependente de ciclina) (VERMEULEN *et al*, 2003; VIALARD *et al* , 2001).

Outro controle molecular presente no ciclo celular são pontos de restrição ou de checagem, onde as decisões sobre a interrupção ou progressão das fases do ciclo são tomadas envolvendo um mecanismo de vigilância que verifica se os requisitos para a progressão da próxima fase do ciclo celular estão satisfatórios, caso contrário, mecanismos de inativação de CDKs são acionados para deter o processo proliferativo (FRIEDMAN *et al.*, 2010). Assim, os pontos de restrição e as ciclinas monitoram a atividade molecular entre cada estágio do ciclo

celular prosseguindo ou adiando a progressão caso aberrações genéticas ocorram (MALUMBRES & BARBACID, 2009).

O câncer é frequentemente considerado uma doença do ciclo celular, pois a sua desregulação é uma das alterações mais frequentes, onde ocorre principalmente ativação dos proto-oncogenes e inativação dos supressores tumorais do ciclo celular, gerando a proliferação celular descontrolada. Analisar as alterações do ciclo celular é uma ferramenta que fornece importantes indícios em novas estratégias de tratamento contra o câncer (PARK & LEE, 2002).

1.2 N-METIL-N-NITROSURÉIA (MNU)

Uma ampla variedade de produtos químicos têm se mostrado capazes de induzir o desenvolvimento de neoplasias, em varias espécies animais, uma vez que a carcinogênese química implica em uma série de eventos complexos que resultam na conversão de uma célula normal para uma célula maligna (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

O composto químico N-Metil-N-Nitrosuréia (Figura 1), carcinógeno de interesse deste estudo, é um agente alquilante de ação direta que interage com o DNA aumentando o risco de desenvolvimento de tumores em órgãos-alvo devido ao acúmulo de mutações ou a morte celular nos tecidos em células suscetíveis ao dano no DNA não reparado. A carcinogênese induzida pelo MNU pode e têm sido amplamente utilizada na indução de tumores de fins experimentais em animais/órgãos específicos devido à grande semelhança com as neoplasias humanas (TSUBURA *et al.*, 2011).

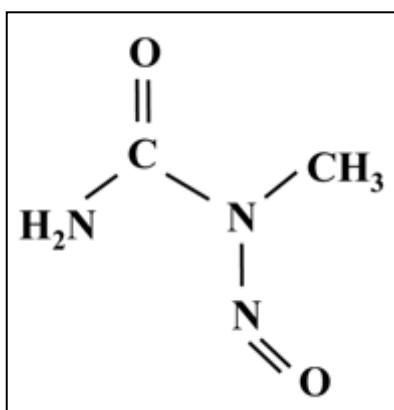


Figura 1 - Estrutura química do N-Metil-N-Nitrosuréia. Fonte: Tsubura *et al.*, 2011.

Os efeitos mutagênicos e tumorigênicos deste carcinógeno provavelmente ocorrem devido ao seu efeito na metilação do DNA, preferivelmente nas bases N7-Guanina (N7-G), transformando-as em N7-metilguanina (N7-MeG) (WURDEMAN *et al.*, 1993), ou em bases O6-Guanina (O6-G) formando a O⁶-metil-Guanina (O6-MeG). Na ausência de AGT (O⁶-alquilguanina-DNA alquiltransferase) ou MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase), enzimas de reparo que removem grupos metil de O⁶-metil-G, haverá a incorporação de timina (T), no lugar da citosina (C), na fita oposta no momento da síntese de DNA (FEITSMA *et al.*, 2008).

Este pareamento errôneo é reconhecido pelo mecanismo de reparo *mismatch* (MMR), que retira a base nitrogenada Timina (T), juntamente com algumas bases circundantes, gerando uma falha que é restaurada em seguida via síntese do DNA. Contudo, uma nova base nitrogenada de Timidina é incorporada em oposição a O⁶-metil-G ainda presente. Esta nova Timidina 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 de duplicação, disparando a apoptose (FEITSMA *et al.*, 2008) (Figura 2).

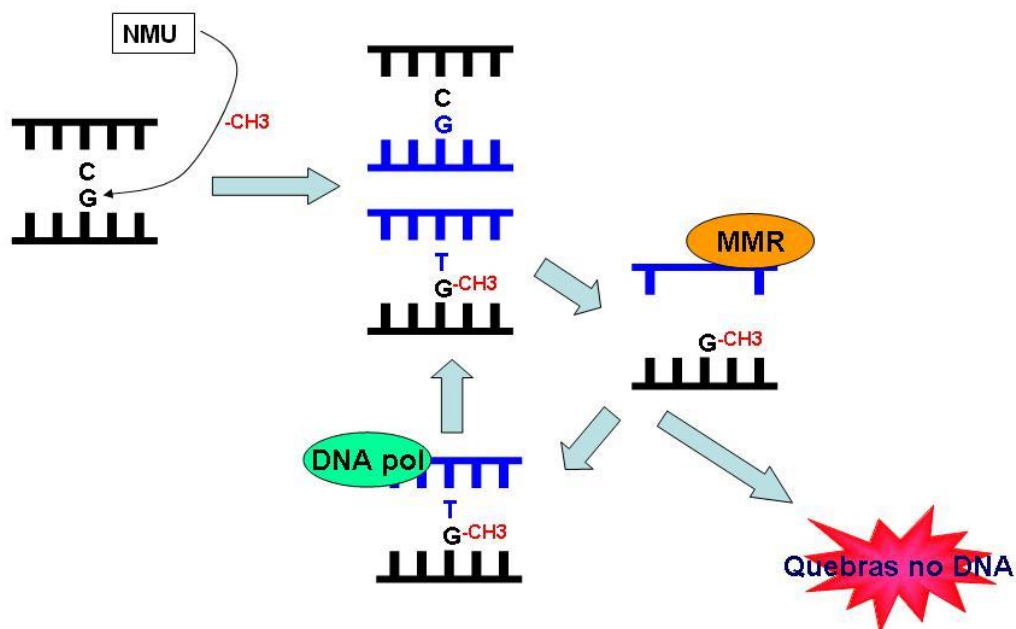


Figura 2 - Mecanismo de ação do NMU: o carcinógeno metila a Guanina no Nitrogênio 7 ou no Oxigênio 6, essa metilação provoca a incorporação de uma Timina errada na fita nascente de DNA replicante, no lugar de uma Citosina. Essa Timina errônea é percebida pelo sistema de reparo MMR que remove o nucleotídeo errado, que é novamente adicionado pela DNApol, que em seguida será novamente removido pelo MMR, ocasionando um processo cíclico

chamado de ciclo fútil, que por sua vez facilita a ocorrência de quebras na fita de DNA. Fonte: Matos, 2009.

Uma das utilizações mais extensiva do MNU tem sido observada em modelos experimentais para a indução do câncer de mama em ratos, devido a este não requer ativação metabólica, e também as suas características serem semelhantes com o câncer de mama humano como, por exemplo, ser localmente agressivo, capaz de gerar metástase, originar-se principalmente em células epiteliais do ducto mamário e sua dependência dos hormônios ovarianos para o desenvolvimento do tumor (PERSE *et al*, 2009). No modelo experimental de câncer de mama, foi demonstrada alta incidência na indução de tumores de forma específica e reprodutível após uma única dose de 50 mg/kg de MNU por via intravenosa ou intraperitoneal (THOMPSON & SINGH, 2000).

O MNU pode também causar neurotoxicidade através da formação de radicais livres que induzem o desequilíbrio no sistema de defesa da célula e interrompendo assim os mecanismos de metabolismo celular (SINGLA & DHAWAN, 2010).

A exposição ao MNU pode também induzir a degeneração aguda das células fotorreceptoras de roedores e outras espécies animais, lembrando a Retinite Pigmentosa Humana (ZULLIGER *et al.*, 2011). Neste modelo uma única administração sistêmica de N-Metil-N-Nitrosúreia causa a degeneração da retina, devido ao efeito tóxico da substância, sem causar danos no epitélio pigmentar da retina (EPR). A degeneração de células fotorreceptoras ocorre em apenas sete dias após a administração do MNU (TSUBURA *et al.*, 2010). Foi demonstrado que as células tratadas com MNU diminuíram progressivamente devido a apoptose após 24 horas do tratamento, seguidas de perda extensa da quantidade de células fotorreceptoras sete dias após o início do tratamento (YANG *et al.*, 2005).

Para a obtenção de seus efeitos carcinogênicos o MNU pode ser administrado por via intraperitoneal, intravenoso e também por via oral. Esta última forma de administração do composto tem como característica a indução principalmente de carcinoma de células escamosas na superfície gastrointestinal (cavidade oral, faringe, laringe e estômago) em macacos, além de inflamações crônicas geralmente observadas no esôfago dos mesmos causando aumento da proliferação celular favorecendo o surgimento de tumores (THORGEIRSSON *et al.*, 1994).

Quando, por sua vez, utilizado em altas concentrações, o MNU tem como um dos primeiros alvos o sistema linfo-hematopoético induzindo uma alta incidência de leucemias e

linfomas malignos em ratos jovens da linhagem Wistar. Entretanto, tal indução tem como resultado uma alta taxa de mortalidade nos animais, limitando o desenvolvimento de estudos experimentais em longo prazo (DA SILVA FRANCHI *et al.*, 2003).

O MNU, assim, pode ser utilizado como Modelo de indução de carcinogênese em diversos estudos como, por exemplo, os citados na Tabela 1:

Tabela 1 - Modelos experimentais de carcinogênese e mutagênese utilizando o MNU de acordo com o autor e ano.

Autor	Ano	Modelo Experimental	Animal
Lai <i>et al</i>	2011	Câncer de mama	Ratos Lewis
Zeng <i>et al</i>	2011	Câncer de Bexiga	Ratos adultos
Zulliger <i>et al</i>	2011	Degeneração aguda de células fotorreceptoras	Camundongos C57/BL6
Tomita <i>et al</i>	2011	Câncer gástrico	Ratos WT; FVB e B6
Gonçalves <i>et al</i>	2010	Câncer de Próstata	Gerbils (<i>Meriones unguiculatus</i>)
Long <i>et al</i>	2010	Alterações proliferativas hematopoiéticas no baço	Camundongos rasH2-Tg
Donovan & Smith	2010	Mutagenicidade transplacentária	Hamster sírio
Nakayama <i>et al</i>	2009	Câncer de colón	Ratos F344
Barth & Kaur	2009	Tumores de cérebro	Ratos adultos
Da Silva Franchi <i>et al</i>	2003	Neoplasia e pré-neoplasia do sistema linfo-hematopoiético	Ratos Wistar

1.1 PRIMATAS NÃO HUMANOS

O primata não humano da espécie *Cebus apella* é conhecido popularmente como macaco prego e pertence à subordem *Anthropoidea*, superfamília *Platyrrhini*, família *Cebidae* e gênero *Cebus*. Essa espécie é encontrada na região leste e sul da Colômbia, sul da Venezuela, Guianas, leste do Equador, grande parte do Brasil, Bolívia e Paraguai (NAVES *et al.*, 2006).

Os macacos do gênero *Cebus* são indivíduos de tamanho médio, pesam entre 2,5 e 5,0 quilogramas, apresentam o corpo robusto e exibem dimorfismos sexuais. Seu tamanho corpóreo é de até 60 centímetros, e possuem grande capacidade de adaptação a diferentes habitats (FERREIRA, 2009).

A utilização crescente dos primatas da espécie *Cebus apella* em pesquisas científicas tem ocorrido graças a sua homologia com o *Homo sapiens*, dessa forma demonstrando sua relevância na investigação de mecanismos patológicos e fisiológicos nas áreas de hematologia, imunologia e virologia (VASCONCELOS, 2008).

O uso de primatas não humanos como modelos experimentais *in vivo*, por sua vez, é de grande importância em trabalhos de aplicação à saúde humana, devido as suas semelhanças anatômicas, bioquímicas e filogenéticas com os primatas humanos, gerando resultados que podem ser interpretados de forma mais próxima e segura para os fenômenos em seres humanos. Além disso, o tamanho do animal e de seus órgãos torna possível a repetição de diagnósticos tais como exames endoscópicos, coleta de amostras de sangue e biopsia de um mesmo animal por um longo período; sua longevidade permite a exposição à carcinógenos por longos intervalos de tempo (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

Dessa forma, a experimentação animal reveste-se de importância incomensurável nas pesquisas científicas, contribuindo de maneira marcante para a ciência e a tecnologia. Sua vasta contribuição nos diferentes campos científicos tem promovido ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e de tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (TAKAYAMA *et al.*, 2008).

1.4 PADRÃO DE NORMALIDADE HEMATOLÓGICA EM *Cebus apella* E BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DE AVALIAÇÃO FRENTE ÀS DROGAS.

A avaliação hematológica permite analisar o estado de saúde do organismo, diagnosticar doenças, realizar prognósticos e acompanhar a evolução do tratamento e possibilita a avaliação da resposta terapêutica (NAVES *et al.*, 2006). O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico, pois permite uma análise laboratorial que estabelece aspectos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos (eritrograma), contagem e a diferenciação dos leucócitos (leucograma), e contagem das plaquetas (plaquetograma) no sangue (FAILACE, 2009).

A tabela abaixo apresenta os valores considerados normais do hemograma dos *Cebus apella* adultos mantidos em cativeiros.

Tabela 2 - Valores normais dos constituintes hematológicos de *Cebus apella* em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos.

Constituintes hematológico	Média	DP	Máx.	Mín.
Hematócrito (%)	45,27	3,6	37,65	52,7
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,92	0,45	4,4	7,05
Hemoglobina (G/DI)	15,01	0,78	13,8	16,2
VCM (fl)	71,63	2,26	65	79
HCM (pg)	23,47	0,8	20	26
CHCM (g/dl)	32,81	1,78	25	38
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,72	1,84	4,3	12,15
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	323,14	54,79	291,50	354,78
Basófilos (%)	0,21	0,27	0	1
Eosinófilo (%)	0,82	1,01	0	5
Bastões (%)	0	-	-	-
Segmentados (%)	63,16	5,98	51	72
Linfócitos (%)	36,78	5,96	28	49
Monócitos (%)	2,06	2,16	0	10

Fonte: adaptado de NAVES *et al.*, 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ *et al.*, 2008.

A avaliação dos potenciais efeitos hepatotóxicos de novas drogas terapêuticas sobre os vários sistemas orgânicos baseia-se principalmente na avaliação de biomarcadores de dano hepático. Ensaios pré-clínicos atualmente incluem uma combinação da avaliação de enzimas no soro como Alanina aminotransferase (TGP), Aspartato aminotransferase (TGO), Gama-glutamil transferase (GGT) entre outros (OZER *et al.*, 2008). A atividade sérica de TGO está associada à toxicidade hepática, mas também pode estar elevada em associação com danos no coração e a lesão do músculo esquelético. A TGP, por sua vez, é uma enzima encontrada quase que exclusivamente no citoplasma dos hepatócitos sendo que níveis elevados da mesma são indicativos, portanto, de injúria de parênquima hepático (BURHOP *et al.*, 2004; NATHWANI *et al.*, 2005).

Os hepatócitos danificados liberam seus conteúdos, incluindo TGP e TGO no espaço extracelular, as enzimas liberadas entram na circulação sanguínea e, conseqüentemente, aumentam os níveis séricos de TGO e TGP, servindo como sinalizadores celulares de dano hepático (BURTIS *et al.*, 2008).

O Gama-Glutamil Transferase (GGT) é uma outra enzima que, embora tenha maior concentração no tecido renal, tem sua importância clínica ligada às doenças do fígado e vias biliares (colestase e lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas, principalmente). Esta enzima é encontrada no interior dos hepatócitos e nas células epiteliais biliares sendo considerada marcadora de lesão hepatobiliar de alta sensibilidade (DURFOUR *et al.*, 2000).

A análise da ureia e da de creatinina como biomarcadores de lesão celular associado a drogas terapêuticas continua sendo um dos marcadores mais usados na avaliação da função renal. A uréia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo e a creatinina é um produto residual da creatina, onde a transformação de creatina em creatinina acontece no tecido muscular e é filtrada livremente no glomérulo. A razão uréia/creatinina assim pode indicar diversos estados patológicos, como por exemplo, em valores encontrados abaixo do esperado podem indicar uma necrose tubular aguda, baixa ingestão de proteínas e/ou redução da síntese de uréia por insuficiência hepática. Com a creatinina dentro do valor de referência e a ureia elevada, indicam processos que levam a diminuição do fluxo sanguíneo renal, aumento na ingestão proteica, ou sangramento gastrointestinal; e com a creatinina acima do valor normal, podem ser processos obstrutivos pós-renais, como tumores ou estenose de vias urinárias (SODRÉ *et al.*, 2007).

Os valores considerados dentro dos padrões de normalidade para *Cebus apella* de TGO, TGP, GGT, ureia e creatinina estão na tabela 3.

Tabela 3 - Valores normais dos marcadores bioquímicos de *Cebus apella* em cativeiro, com médias, desvio padrão (DP) e valores máximos e mínimos.

Marcadores bioquímicos	Média	DP	Máx.	Mín.
TGO (U/L)	42,22	8,78	29,5	58
TGP (U/L)	34,38	7,97	24	48
GGT (U/L)	71,06	14,32	34	94,5
Ureia (mg/dl)	13,44	4,82	7,0	26
Creatinina (mg/dl)	0,71	0,13	0,41	0,91

Fonte: Adaptado de Riviello & Wirz (2001).

1.6 JUSTIFICATIVA

A maioria de estudos em modelos animais, para o desenvolvimento de neoplasias, bem como a avaliação da resposta imune tem como substrato de análise camundongos e outros roedores. Como anteriormente citado, porém, primatas não humanos são os melhores modelos para o desenvolvimento de pesquisas biomédicas uma vez que permite uma maior aproximação devido ao seu parentesco evolutivo com o ser humano, tornando-os modelos eficazes para estudos comparativos, particularmente pertinentes para as enfermidades humanas.

O Centro Nacional de Primatas (CENP) localizado no município de Ananindeua – PA, é uma instituição federal subordinada ao Ministério da Saúde faz parte da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). A instituição conta atualmente em seu plantel com primatas pertencentes à Região Amazônica, Mata Atlântica e uma única espécie exótica do Velho Mundo. O CENP tem como principal missão institucional a criação e reprodução de primatas em condições controladas, visando o apoio às investigações biomédicas e demais pesquisas nas áreas das ciências médicas e biológicas, apoiando o desenvolvimento desta e de outras pesquisas no Brasil e no exterior.

Considerando que o sistema imune é peça-chave no tratamento do câncer e que a imunoterapia é um tratamento ainda em fase de desenvolvimento esses dados incentivam-nos a dar continuidade aos estudos com o CA *in vivo*, e o modelo experimental em primatas não humanos é o melhor modelo a ser utilizado em projetos com medicamentos em estágio intermediário de desenvolvimento.

Como o CA é um possível produto imunoadjuvante devemos levar em consideração que uma série de agentes antitumorais é capaz de induzir danos no DNA, desencadeando respostas como o bloqueio do ciclo celular, o reparo do DNA e/ou a apoptose. De forma geral, tais agentes primeiramente bloqueiam o ciclo celular em uma tentativa de reparar o dano. Caso o dano seja muito extenso ou comprometa o metabolismo celular, uma cascata de sinalização aciona mecanismos alternativos que inibem a proliferação das células e acionam vias de morte (BERARDI *et al.*, 2004). A citometria de fluxo permite a análise tanto da cinética do ciclo celular quanto da indução de morte celular, possibilitando a elucidação da resposta celular após o tratamento com o Modificador da Resposta Imune Canova® o que permitirá um maior esclarecimento dos mecanismos desse produto no combate das diversas neoplasias.

Desta forma, o presente estudo propõe utilizar o modelo de carcinogênese em primatas não humanos induzidos pelo carcinógeno MNU para a avaliação do mecanismo de ação do CA, como uma ferramenta de pesquisa imunoterapêutica.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o padrão de resposta celular hematopoiética em primatas da espécie *Cebus apella* expostos ao carcinógeno N-Metil-N-Nitrosuréia (MNU) e submetidos ao tratamento com o Modificador da Resposta Imune Canova®, através da análise de parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunes e do ciclo celular.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Acompanhar o peso dos animais durante todo o período experimental.

Avaliar a resposta celular hematopoiética através de parâmetros hematimétricos, leucocitários, linfocitários;

Avaliar os parâmetros bioquímicos de função hepática e renal dos macacos da espécie *Cebus apella*;

Analisar a resposta celular imune através da avaliação do padrão de anticorpos por citometria de fluxo;

Avaliar a cinética do ciclo celular de linfócitos de primatas da espécie *Cebus apella*;

Comparar os resultados obtidos entre os grupos controle e tratados com o carcinógeno N-Metil-N-Nitrosuréia (MNU) e com o Modificador da Resposta Imune Canova®, de modo avaliar a resposta celular frente aos referidos tratamentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte do projeto “Avaliação dos efeitos do bioproduto Método Canova em modelo experimental de câncer gástrico em primatas não humanos”, financiado pelo CNPq (550885/2007-2 CNPq) e coordenado pelo pesquisador Dr. Rommel Burbano (UFPA). O referido projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da UFPA tendo recebido parecer favorável (PARECER MED002-10) para sua execução (Anexo 1).

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS:

Os animais utilizados no experimento são da espécie *Cebus apella* mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas (CENP), sob as condições padrões do CENP, sendo previamente selecionados e separados ao acaso para realização deste trabalho.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de alumínio com dimensões de 80x90x80cm (Figura 4A), dentro de galpões telados, sujeitos ao fotoperíodo natural (figura 4B), com alimentação diária à base de frutas, verduras, legumes, tenébrios (*Zophobasmorio*), ração peletizada (*FOXY Junior Supreme*, 28% proteína bruta; PROVIMI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e água *ad libitum*.



Figura 4 - (A) Recintos de alvenaria revestidos de azulejo e tela metálica, utilizados para alojar os animais, onde se evidencia as gaiolas individuais, (B) Visão externa do galpão experimental I do CENP.

Para identificação e controle os animais possuíam um código de três letras tatuadas na face interna da coxa direita e “microchip” implantado na porção dorsal na região interescapular. Os animais foram pesados antes e a cada coleta de sangue durante todo o período experimental em balança eletrônica de precisão modelo BP Baby da marca Filizola como um dos parâmetros de avaliação de estado geral.

O grupo de estudo consistiu de um total de 13 (treze) animais adultos, divididos em dois grupos principais o controle e o experimental, os grupos foram formados conforme descrito abaixo:

- Grupo controle negativo (CN): 3 animais da espécie *Cebus apella* sem tratamento com CA ou com MNU. Esse grupo recebeu solução salina em vez de MNU e/ou CA;
- Grupo controle positivo 1 (CP1): 1 animal da espécie *Cebus apella* que está a aproximadamente 3 anos recebendo o tratamento com o MNU;
- Grupo controle positivo 2 (CP2): 1 animal da espécie *Cebus apella* que está a aproximadamente 3 anos recebendo o tratamento com o MNU e após esse período recebeu tratamento com o CA durante três dias;
- Grupo experimental 1 (EXP.1): 3 animais da espécie *Cebus apella* receberam o tratamento com o MNU durante trinta e cinco dias;
- Grupo experimental 2 (EXP.2): 3 animais da espécie *Cebus apella* receberam o tratamento com o Canova durante três dias;
- Grupo experimental 3 (EXP.3): 3 animais da espécie *Cebus apella* receberam o tratamento com o MNU durante trinta e cinco dias e após esse período receberam tratamento com o CA durante três dias.

A divisão esquemática dos grupos e do tipo de tratamento está presente na tabela abaixo.

Tabela 4 - Divisão dos grupos controles e experimentais de acordo com o tratamento.

GRUPOS	MNU	CANOVA	Nº DE ANIMAIS
CONTROLE POSITIVO 1	X		1
CONTROLE POSITIVO 2	X	X	1
CONTROLE NEGATIVO			3
EXPERIMENTAL 1	X		3
EXPERIMENTAL 2		X	3
EXPERIMENTAL 3	X	X	3

Os animais receberam o MNU diluído em leite (200 ml) por via oral, durante 35 dias, A solução mãe de MNU (Sigma-Aldrich do Brasil) foi preparada a partir da dissolução de 1,8 g em 25 ml de água destilada. Cada animal recebia diariamente uma solução de 667 µl por via oral, conforme protocolo experimental para estudar a tumorigênese inicial em primatas da espécie *Cebus apella* utilizado por Thorgeirsson *et al* (1994), Souza *et al.* (2002) e Takayama *et al* (2008).

Os animais que receberam tratamento com CA dos grupos controle positivo 2 e experimental 2 e 3 foram administradas três aplicações intravenosas de Canova (1,67 ml/kg), administradas em 0h, 24h e 48h. Este modelo de esquema terapêutico foi adaptado para as cobaias levando em consideração o peso do animal a partir do esquema terapêutico usado no tratamento inicial em humanos (CABRAL *et al.*, 2003; CASTANHEIRA *et al.*, 2001).

A coleta de sangue para a realização de testes para as análises laboratoriais foi realizada em intervalos de 7 (sete) dias durante o tratamento com o MNU, e em intervalos de coletas de 24, 96 horas e 15 dias após o tratamento com Canova.

Na figura abaixo pode ser observado o delineamento experimental utilizado, onde no esquema estão representados os dias de coleta (na seta em azul), os períodos de tratamento com o carcinógeno MNU e/ou com o Modificador da Resposta Imune Canova® de acordo com os grupos de estudo.

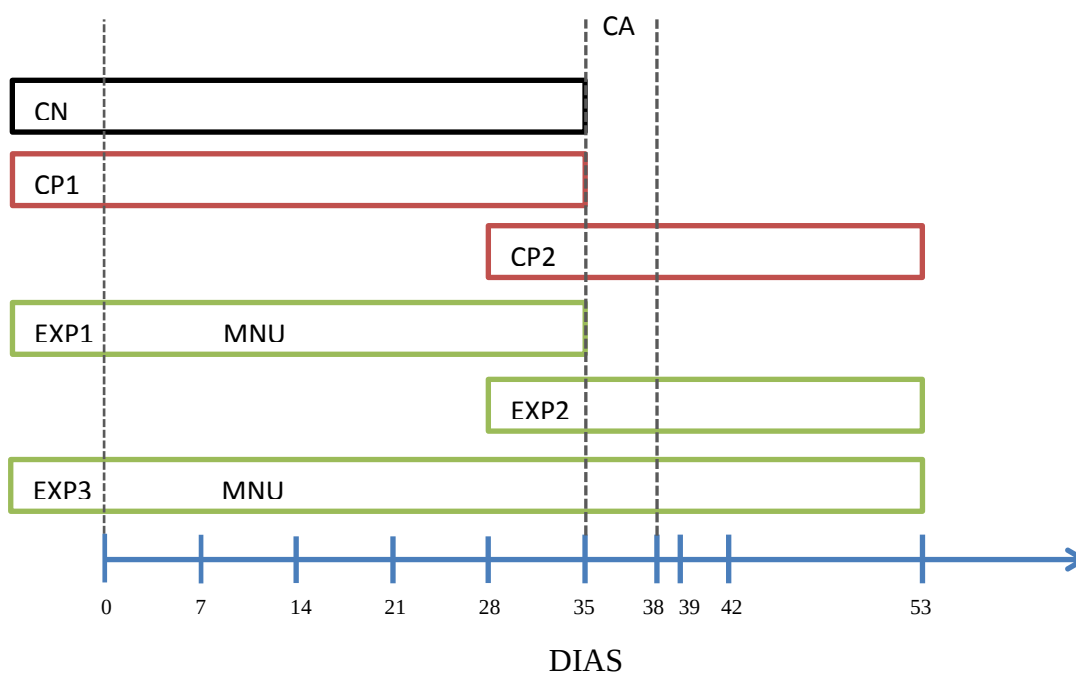


Figura 5 - Esquema do delineamento experimental.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para coleta de sangue periférico os animais foram previamente sedados por injeção via intramuscular de Zoletil® 50 (cloridrato de Tiletamina associado ao cloridrato de Zolazepam) (0,2 ml / kg). Com a utilização de seringas e agulhas descartáveis e após a desinfecção da face interna da coxa, foram coletado 5 ml de sangue por venopunção da veia femoral direita e/ou esquerda (Figura 5), o material foi dividido em vacutainers contendo heparina, EDTA e Gel SST II *Advance*. O material coletado foi encaminhado para posterior análise nos Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Fundação HEMOPA, Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará e Laboratório de Análises Clínicas do CENP.



Figura 5 - Coleta de sangue por venopunção da veia femoral direita.

3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A análise das enzimas Alanina Aminotransferase (TGP), Creatinina, Uréia, Aspartato de aminotransferase (TGO) e Gama-glutamil transferase (GGT), foram realizados no soro dos animais nos dias das coletas de materiais.

O procedimento foi realizado através do Sistema de química seca VITROS® DT60 II (Johnson & Johnson), utilizando kits comerciais próprios e específicos para este sistema, seguindo a metodologia preconizada pelos fabricantes dos kits para cada parâmetro a serem analisados.

3.4. ANÁLISE HEMATOLÓGICA

A análise hematológica foi feita utilizando o contador de células automático para uso veterinário Celm CC-550 para determinação dos seguintes parâmetros hematológicos: Hemácias, Leucócitos, Hematócrito, Hemoglobina, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e plaquetas. O diferencial leucocitário foi feito manualmente, através da identificação de 100 células em esfregaço sanguíneo corado com Wright, utilizando objetiva de 100 vezes.

3.5 CULTURA CELULAR DE LINFOCITOS E TESTE DE CICLO CELULAR

Para análise do ciclo celular, foram utilizadas culturas celular de linfócitos, onde 0,5ml de sangue total periférico coletados com heparina foram semeados em frascos com 5 ml de meio de cultura completo para linfócitos composto de 4% de fitohemaglutinina (PHA - Gibco-Invitrogen), 20% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, Brasil), e 76% de DMEN (Gibco-Invitrogen), incubados a 37°C, por 72 horas.

As células provenientes da cultura de linfócitos foram analisadas a partir do Kit Cycle Test™ PLUS DNA Reagent (Becton Dickinson). A marcação das células foi feita a partir de

100µl da amostra, onde posteriormente adicionou-se 250µl da solução A (Tripsina e tetrahydrocloreto de espermina) que é responsável pela desagregação enzimática dos fragmentos de tecido sólido e digestão das membranas celulares e do citoesqueleto. Em seguida adicionou-se 200µl da solução B (RNase e inibidor da tripsina) e por último adicionou-se 200µl da solução C (Iodeto de propídio e tetrahydrocloreto de espermina) o Iodeto de propídio se liga estequiometricamente ao DNA emitindo fluorescência.

A análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo pode revelar a ploidia celular, a posição da célula no ciclo celular e também estimar frequência das células apoptóticas. A distribuição das células dentro das fases do ciclo celular é baseada em diferenças no conteúdo de DNA entre as células em fase pré-replicativas (G_0/G_1), contra as células que estão replicando o DNA (fase S) versus o pós-replicativo ($G_2 + M$). Estas análises dependem das células a serem marcadas com fluorocromo, como por exemplo, o 4'6-D-2-diamidino phenylindole (DAPI), iodeto de propídio (PI) e o 7-amino-actinomicina (7-AAD) em uma variedade de técnicas que, diferem principalmente pelo modo de permeabilização celular (detergente versus prefixação). Os resultados das medições de conteúdo celular de DNA por citometria de fluxo são geralmente apresentados sob a forma de histogramas de frequência (DARZYNKIEWICZ *et al*, 2010).

A avaliação da fluorescência do iodeto de propídio foi realizada no Citometro de Fluxo FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) Calibur, através do sistema *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson) para três cores.

3.6 IMUNOFENOTIPAGEM

O processamento das amostras foi realizado imediatamente após o recebimento das mesmas (sangue total) de forma padrão de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante (Becton Dickinson e Biolegend), com posterior lise das hemácias evitando-se a seleção ou perda arbitrária de populações específicas de células, e permitindo a enumeração de todas as populações de células da amostra, desta forma, minimizando, as possibilidades de modificações na expressão do antígeno; e reduzindo o tempo de trabalho e de preparação das amostras.

A identificação das populações de células foi feita adicionando-se 50 µl da amostra, 5 µl de anticorpos monoclonais específicos marcados com fluorocromos FITC, PE ou Percyp e

1000 µl da solução de lise diluída em 1:10 (RBC Lysis Buffer 10x - Biolegend), sendo homogeneizado no vortex, incubados no escuro ou na penumbra à temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugado por 5 minutos (RPM 1800), posteriormente, desprezado o sobrenadante e adicionou-se 50 µl de PBS, para posterior aquisição média de 10.000 eventos, e subsequente análise das amostras, no Citometro de Fluxo FACS Calibur, através do sistema Cell Quest Pro para três cores.

O painel de anticorpos utilizado para análise do perfil de resposta celular (Tabela 5), compreende a combinação dos seguintes anticorpos comerciais Becton Dickinson CD45 (PAN), Clone (D058-1283) Isotipo (Mouse IgG1k) FITC, CD3, Clone (SP34-2) Isotipo (Mouse IgG1 Lambda) PerCP, CD4, Clone (L200) Isotipo (Mouse IgG1k) FITC, CD8, Clone (LRPA-T8) Isotipo (Mouse IgG1k) RPE e T/B/NK (CD3, CD45RA e CD161a/NKR-P1A) cell cocktail, Clone (SP34-2, 3G8, L27) FITC, RPE, APC.

Tabela 5 - Pannel de AcMo utilizado para análise do perfil de reposta celular.

TUBOS	AcMo
1	CD45 (Leucogate)
2	CD4/CD8/CD3
3	T/B/NK

3.6.1 Estratégia de aquisição dos dados

Os dados obtidos por meio da imunofenotipagem do sangue periférico foram avaliados utilizando diferentes estratégias de análise, dependendo do fenótipo celular avaliado. Assim, empregando os recursos múltiplos do programa CELL Quest Pro. A análise foi de acordo com a proposta estabelecida por SATHLER-AVELLAR, *et al* (2003). A Figura 6 ilustra as seqüências de passos para os diferentes tipos de análises, que consistiu na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfometricos, através de gráficos de distribuição de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 6A). Apos a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da

população selecionada foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência incluindo as modalidades FL1 *versus* FL3 e FL2 *versus* FSC (Figura 6B).

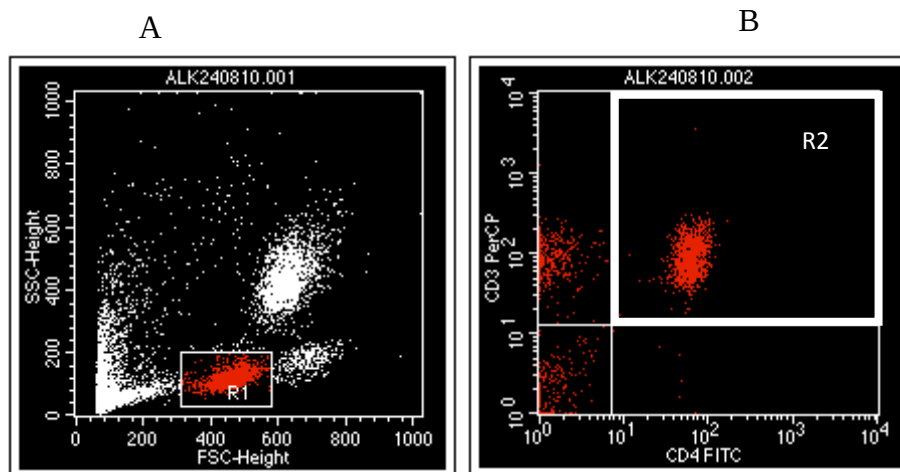


Figura 6 - Sequência de procedimentos para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição CD3 PerCP *versus* CD4 FITC é utilizado para quantificar o percentual das populações ou subpopulações celulares específicas em R1.

Os dados obtidos para análise do ciclo celular, foram realizados em linfócitos utilizando o Kit Cycle TestTM PLUS DNA, onde cada amostra gerava dois gráficos, no primeiro (Figura 7), foi selecionado a população celular de interesse R1, baseada em aspectos morfométricos, dentro da população selecionada o segundo histograma demonstra os resultados em qual o período do ciclo celular as células se encontravam, G₀/G₁, S ou G₂/M (Figura 8).

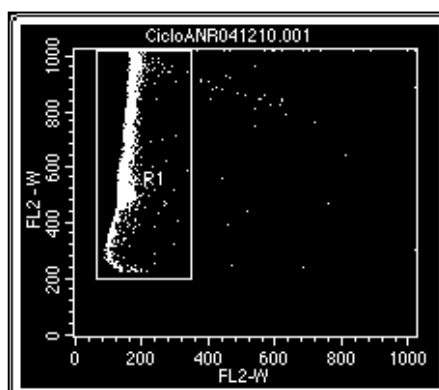


Figura 7 - Histograma de seleção da população celular de interesse (R1).

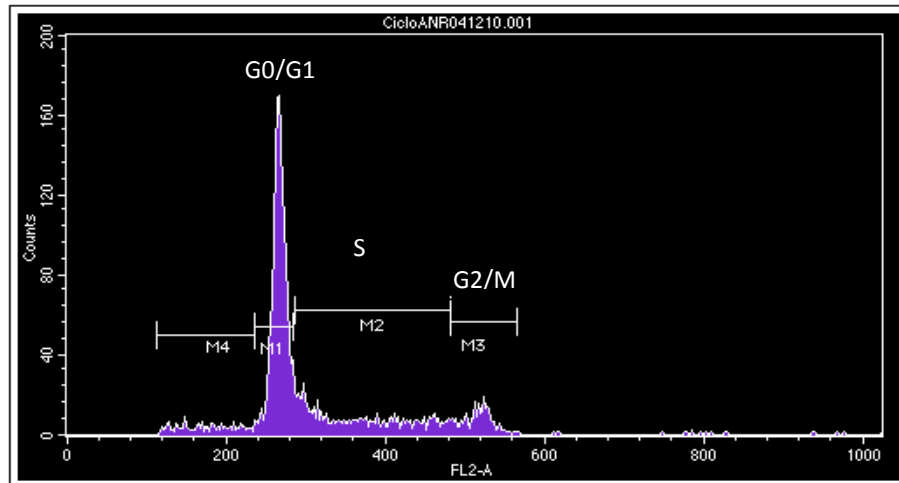


Figura 8 - Histograma do Ciclo Celular – Exemplo de resultado para uma das amostras.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa Microsoft Office Professional Plus 2010 foi utilizado para tratamento de dados, tabelas, cálculos da média, mediana e desvio padrão. O programa Bioestat 5.0 foi utilizado para a realização do teste paramétrico ANOVA, comparando o valor de média entre os grupos e do teste paramétrico t de *Student*, comparando os valores de média observados com os valores descritos na literatura. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS

A avaliação dos resultados dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, da cinética do ciclo celular, da imunofenotipagem e do peso, será analisado através da média de valores obtidos durante todo o período experimental em cada grupo de estudo.

4.1 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

Os animais que compuseram os grupos controle negativo e experimental (1, 2 e 3) não tiveram diferença significativa comparando a média de peso presente na literatura (3,750 Kg) (FERREIRA, 2009). Já os animais do grupo controle positivo (1 e 2) tiveram valores de peso significativamente menores ao serem comparados aos grupos controle negativo e experimentais (1, 2 e 3).

Os valores da média de peso dos animais dos grupos controle e experimental são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 6 - Valores de média e desvio padrão do peso dos animais dos grupos controle (negativo e positivo) e experimentais.

GRUPOS	MÉDIA ± DP
	PESO
CONTROLE NEGATIVO	3,723 ± 0,42
CONTROLE POSITIVO 1	2,158 ± 0,02 ¹
CONTROLE POSITIVO 2	2,213 ± 0,02 ¹
EXPERIMENTAL 1	3,859 ± 0,38
EXPERIMENTAL 2	3,684 ± 0,36
EXPERIMENTAL 3	3,624 ± 0,26

1 - $p < 0.05$ em relação ao grupo controle negativo e todos os grupos experimentais.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os animais do grupo controle negativo tiveram seus parâmetros hematológicos considerados normais, não apresentando diferença estatisticamente significativa ao serem comparados aos valores de normalidade para macacos da espécie *Cebus apella* mantidos em cativeiro (NAVES *et al.*, 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ *et al.*, 2008). O parâmetro valor absoluto de linfócitos foi o único padrão alterado, com valor de média significativamente menor ao descrito na literatura, apesar dos valores de porcentagem de linfócitos ter se apresentado normal.

Os parâmetros hematológicos foram analisados individualmente, sendo realizada a comparação entre as médias dos grupos controles e experimentais utilizando análise de variância (teste ANOVA - paramétrico).

Na análise do hematócrito foi observado que a média dos valores dos grupos controle positivo (1 e 2) foram significativamente menores ao comparados com a média dos valores dos grupos controle negativo e os grupos experimentais (1, 2, e 3).

A média do número de hemácias dos animais dos grupos controle positivo (1 e 2) foram consideradas significativamente menores ao comparada com os valores encontrados nos grupos controle negativo e experimentais (1, 2 e 3). O valor do número de hemácias do grupo controle positivo 1 também se demonstrou menor ao comparado com o grupo controle positivo 2.

Os valores obtidos da análise da hemoglobina apresentaram no grupo controle positivo 1 e 2 média significativamente menor quando comparada com os grupos controle negativo e experimentais. O grupo controle positivo 1 também apresentou valor de média de hemoglobina significativamente maior do que o controle positivo 2.

Na análise da média de leucócitos, os valores obtidos no controle positivo 1 foram significativamente maiores quando comparados aos 3 grupos experimentais e o controle negativo; já o controle positivo 2 teve valores de média significativamente maiores do que os grupos experimentais 1 e 3. O grupo experimental 2 apresentou valores significativamente maiores ao ser comparado com os outros grupos experimentais (1 e 3), bem como com o grupo controle negativo.

Os valores médios das plaquetas dos grupos controle positivo 1 e experimentais 1 e 3 foram considerados significativamente maiores ao serem comparados com o grupo controle negativo. O grupo experimental 3 também apresentou valores significativamente maiores ao

ser comparado com o com os grupos controle positivo 2 e experimental 2. Já o grupo experimental 1 apresentou valores significativamente maiores ao comparado com o grupo experimental 2.

Em relação à comparação entre os valores de média dos neutrófilos segmentados apenas o controle negativo foi significativamente maior quando comparado aos grupos experimentais 1 e 3.

Na comparação entre as médias da porcentagem dos linfócitos os grupos controle positivo 1 e controle negativo apresentaram valores significativamente menores ao serem comparados aos grupos experimentais 1, 2 e 3. O grupo experimental 3 também apresentou valores significativamente maiores ao comparado com o grupo experimental 2.

Na avaliação dos valores absolutos de linfócitos o grupo controle negativo teve valores significativamente menores ao comparado com os controles positivos e todos os grupos experimentais. O grupo controle positivo 1 e o grupo experimental 2 demonstraram valores significativamente maiores quando comparados com os grupos experimentais 1 e 3.

Ao serem comparados os valores das médias dos monócitos entre os grupos, verificou-se que o controle positivo 2 apresentou valores significativamente maiores quando comparado com os grupos controle negativo, controle positivo 1 e experimentais (1, 2, e 3). Já o grupo experimental 1 apresentou valor de monócitos significativamente menor ao comparado com os grupos controle negativo e experimental 2.

Além da análise dos valores de médias dos parâmetros hematológicos citados anteriormente foram analisados, sem apresentar diferença significativa, os seguintes parâmetros: VCM, HCM, CHCM, basófilo, eosinófilo, mielócito e metamielócito.

Os valores obtidos na análise dos padrões hematológicos são descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos parâmetros hematológicos.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	CONTROLE NEGATIVO	CONTROLE POSITIVO 1	CONTROLE POSITIVO 2	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3
	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP
Hematócrito (%)	42,60 ± 1,04	29,85 ± 0,35 ¹	25,40 ± 1,98 ¹	41,87 ± 3,67	41,89 ± 1,87	40,90 ± 3,45
Hemácias (mm ³) X10 ⁶	6,10 ± 0,44	4,60 ± 0,07 ¹	3,62 ± 0,47 ¹	6,09 ± 0,46	6,02 ± 0,43	5,96 ± 0,43
Hemoglobina (G/DI)	14,33 ± 0,68	11,10 ± 0,14 ¹	8,50 ± 0,71 ¹	13,73 ± 1,13	14,06 ± 0,56	13,64 ± 1,15
VCM (u ³)	69,97 ± 3,32	65 ± 0,28	70,42 ± 3,56	68,85 ± 2,14	69,82 ± 2,53	68,69 ± 1,67
HCM (uug)	23,51 ± 0,80	24,15 ± 0,07	23,505 ± 1,14	22,77 ± 1,48	23,31 ± 1,02	22,81 ± 0,59
CHCM (%)	33,61 ± 0,84	37,25 ± 0,21	33,415 ± 0,12	31,78 ± 5,49	32,41 ± 3,18	33,28 ± 0,69
Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	6,90 ± 0,56	15,40 ± 0,69 ¹	12,19 ± 3,66 ²	7,71 ± 2,92	10,55 ± 1,94 ²	6,97 ± 2,68
Plaquetas (x10 ³ /m/mm ³)	109 ± 12,17	125 ± 14,14 ¹	107 ± 26,87	162,73 ± 37,06 ¹	122,56 ± 14,13 ²	177,94 ± 49,60 ^{1 e 3}
Basófilo (%)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,30 ± 0,53	0 ± 0	0,39 ± 0,50
Eosinófilo (%)	1,33 ± 0,52	0 ± 0	3,50 ± 3,54	2,30 ± 2,42	1,56 ± 0,73	2,72 ± 2,49
Mielócito (%)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Metamielócito (%)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Bastões (%)	0,33 ± 0,58	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,11 ± 0,33	0 ± 0
Segmentados (%)	64,67 ± 2,52	59,50 ± 0,70	58 ± 2,83	46,97 ± 14,27 ¹	55,11 ± 7,10	44,50 ± 13,87 ¹
Linfócitos (%)	32,67 ± 2,08	33,50 ± 2,12	34,50 ± 12,02	49,87 ± 14, 29 ⁴	42 ± 6,75 ⁶	51,67 ± 14,03 ⁴
Linfócitos (valor absol.)	2246,33 ± 44,84	5166,35 ± 558,82 ^{1 e 2}	4425,70 ± 2729 ¹	3564,14 ± 1031,10 ¹	4336,68 ± 547,16 ^{1 e 2}	3519,29 ± 1385,39 ¹
Monócitos (%)	1,33 ± 1,15	1 ± 0	4 ± 5,66 ¹	0,53 ± 0,63 ^{5 e 6}	1,22 ± 0,97	0,78 ± 0,88

1 - p<0.05 em relação aos grupos controle negativo e experimentais (1, 2 e 3).

2 - p<0.05 em relação aos grupos experimentais 1 e 3.

3 - p<0.05 em relação aos grupos controle positivo 2 e experimental 2.

4 - p<0.05 em relação aos grupos controles positivo 1 e negativo.

5 - p<0.05 em relação ao grupo experimental 2.

6 - p<0.05 em relação ao grupo controle negativo.

4.2 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS

Na avaliação da uréia, os grupos experimentais apresentaram valores estatisticamente diferentes ao comparados entre si. O grupo experimental 1 teve valores de média significativamente maiores do que grupo experimental 2; já o grupo experimental 3 teve valores de média significativamente maiores ao comparado com os grupos experimentais 1 e 2.

Na análise da Creatinina foram obtidos os seguintes resultados: o grupo controle positivo 2 apresentou valores de média significativamente menores do que os grupos controle negativo e experimentais; já os grupos experimentais 1 e 3 apresentaram valores de média significativamente maiores do que os grupos controle negativo e positivos e grupo experimental 2.

Quanto á análise do TGO, os valores de média deste parâmetro apresentados pelos grupos controle positivo 1 e 2 foram significativamente maiores ao serem comparados com os valores dos grupos controle negativo e experimentais 1, 2 e 3. Já a análise do TGP revelou valores de média significativamente maiores nos grupos controle positivo 1 e 2 quando comparados aos grupos experimentais 1, 2 e 3. No grupo experimental 2 a análise destes parâmetros TGO e TGP foram significativamente menores ao serem comparados com os valores dos seus respectivos grupos controle negativo.

Os valores de média do parâmetro GGT apresentaram-se de forma significativamente maiores nos grupos controle positivo 1 e 2 ao serem comparados com os demais grupos. Os grupos controle positivos também demonstraram valores discordantes ao comparados entre si, sendo os valores do controle positivo 1 significativamente maiores do que o controle positivo 2.

Na tabela a seguir são demonstrados os valores de média e desvio padrão referentes á análise dos parâmetros bioquímicos.

Tabela 8 - Valores de média e desvio padrão obtidos da análise dos parâmetros bioquímicos.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	CONTROLE NEGATIVO	CONTROLE POSITIVO 1	CONTROLE POSITIVO 2	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Ureia (mg/dl)	23,67 ± 7,23	28,50 ± 0,71	19 ± 7,07	27,10 ± 8,75 ⁵	15,78 ± 13,43	39,06 ± 14,45 ²
Creatinina (mg/dl)	0,72 ± 0,04	0,60 ± 0	0,46 ± 0,06 ³	0,85 ± 0,09 ⁴	0,76 ± 0,12	0,86 ± 0,07 ⁴
TGO (U/L)	35 ± 15,52	244 ± 1,41 ³	139,50 ± 81,32 ³	34,10 ± 9,61	20 ± 6,32 ⁵	35,50 ± 12,03
TGP (U/L)	36,67 ± 21,08	351,50 ± 9,19 ³	336,50 ± 50,20 ³	33,30 ± 12,69	25,11 ± 11,57 ⁵	28,94 ± 7,64
GGT/Gama (U/L)	55,67 ± 18,18	9557 ± 15,50 ³	8422,50 ± 1962,20 ³	73,57 ± 16,23	69 ± 23,16	71,61 ± 18,82

1 - p<0.05 em relação ao grupo experimental 2.

2 - p<0.05 em relação aos grupos experimental 1 e 2.

3 - p<0.05 em relação aos grupos controle negativo e experimentais (1, 2 e 3).

4 - p<0.05 em relação aos grupos controle negativo e positivo e experimentais 2.

5 - p<0.05 em relação ao grupo controle negativo.

4.4 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO CICLO CELULAR

Na análise do ciclo celular por citometria de fluxo, obtivemos valores da porcentagem de células que se encontravam nas diferentes fases do ciclo celular, bem como daquelas que possivelmente sofreram processo de morte celular.

Na análise da porcentagem de células que se encontravam na fase do ciclo G_0-G_1 , o controle positivo 1 apresentou valores significativamente menores ao ser comparado com os grupos controle negativo e experimentais. Já o grupo experimental 1 apresentou valor de células nesta fase do ciclo significativamente menor ao comparado aos grupos experimentais 2 e 3.

Em relação à fase S do ciclo celular, o grupo controle positivo 1 apresentou valor de porcentagem de células significativamente maior ao ser comparado com os grupos controle negativo, controle positivo 2 e experimentais (1, 2 e 3). Já o grupo experimental 1 apresentou valores de média nesta fase do ciclo maior ao comparado com o grupo experimental 2.

Na análise da porcentagem de células que se encontravam na fase G_2-M do ciclo celular, os valores da média do grupo controle negativo foram significativamente maiores ao ser comparado com os grupos controle positivo 1 e 2. Da mesma forma, o grupo experimental 3 apresentou valores de média maiores ao ser comparado com os grupos controle positivo 1 e 2 e experimental 1.

Na tabela abaixo são apresentados os dados obtidos na análise do ciclo celular por citometria de fluxo.

Tabela 9 - Valores obtidos de média e desvio padrão da análise do ciclo celular.

CICLO CELULAR	$G_0 - G_1$	S	$G_2 - M$
	MÉDIA $\pm$ DP	MÉDIA $\pm$ DP	MÉDIA $\pm$ DP
CONTROLE NEGATIVO	63,96 $\pm$ 5,22	22,24 $\pm$ 4,32	7,85 $\pm$ 2,13
CONTROLE POSITIVO 1	30,94 $\pm$ 3,79 ¹	56,48 $\pm$ 4,02 ^{1 e 3}	0,41 $\pm$ 0,16 ¹
CONTROLE POSITIVO 2	67,74 $\pm$ 3,10	15,98 $\pm$ 0,28	1,34 $\pm$ 0,93 ¹
EXPERIMENTAL 1	53,16 $\pm$ 14,83 ²	25,40 $\pm$ 13,88 ⁴	4,27 $\pm$ 3,83
EXPERIMENTAL 2	65,04 $\pm$ 5,31	17,21 $\pm$ 4,79	4,64 $\pm$ 2,49
EXPERIMENTAL 3	63,05 $\pm$ 4,70	21,02 $\pm$ 4,63	6,64 $\pm$ 1,59 ⁵

1 - $p < 0.05$ em relação aos grupos controle negativo e experimentais (1, 2 e 3).

2 - $p < 0.05$ em relação aos grupos experimental 2 e 3.

3 - $p < 0.05$ em relação ao grupo controle positivo 2.

4 - $p < 0.05$ em relação ao grupo experimental 2.

5- $p < 0.05$ em relação aos grupos controle positivo (1 e 2) e experimental 1.

4.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM

A análise da imunofenotipagem por citometria de fluxo revelou valores dos marcadores (CD4, CD8, CD3, T, B, e NK) obtidos para os diferentes grupos de estudo.

Os valores observados para a porcentagem de células que expressam o marcador imunológico CD4 apresentou diferença estatisticamente menor quando comparados os valores do grupo experimental 1 aos valores dos grupos controle negativo e experimental 2. Já os valores obtidos do grupo experimental 3 foram significativamente menores ao comparado com os grupos controle negativo e experimental 2.

Na análise dos valores absolutos de CD4, os valores de média do grupo controle negativo apresentaram valores significativamente menores ao comparados com os valores apresentados pelos grupos controle positivo 1 e experimental 2; o grupo controle positivo 1 também apresentou valores de média de CD4 maiores ao ser comparado com os grupos experimentais 1 e 3. Já o grupo experimental 2 apresentou valores significativamente maiores ao comparado com os demais grupos experimentais.

Em relação aos valores médios obtidos do marcador CD3, o grupo experimental 3 apresentou valores significativamente menores ao ser comparado com os grupos controle negativo, controle positivo (1 e 2) e experimentais 2 e 3.

Dos valores observados para o imunomarcador CD8, o grupo experimental 2 apresentou média de valores significativamente menores ao ser comparado com os grupos controle positivo (1 e 2) e experimentais 1 e 3.

Os valores de média dos linfócitos B apresentaram-se significativamente maiores nos grupos experimentais (1, 2 e 3) ao serem comparados com o controle negativo.

Quanto às médias dos valores de linfócitos T, utilizando o *cell cocktail* (T/B/NK) não houve diferença significativa ao ser comparado aos valores obtidos com marcador CD3, este último foi utilizado para realização da análise do fenótipo.

Os valores observados na avaliação dos marcadores imunológicos encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de média e desvio padrão obtidos na análise dos marcadores imunológicos (Imunofenotipagem).

MARCADORES IMUNOLOGICOS	CONTROLE NEGATIVO	CONTROLE POSITIVO 1	CONTROLE POSITIVO 2	EXPERIMENTAL 1	EXPERIMENTAL 2	EXPERIMENTAL 3
	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP	MÉDIA ± DP
CD4 (%)	60,39 ± 6,04	52,27 ± 1,46	53,18 ± 0,79	49,44 ± 6,45 ¹	59,12 ± 12,19	46,41 ± 5,89 ¹
CD4 (Val. abs.)	1357,33 ± 147,75	2704,52 ± 367,36 ^{2 e 3}	2364,4 ± 1486,33 ²	1754,34 ± 544,25	2542,36 ± 535,29 ^{2 e 3}	1634,15 ± 691,80
CD3 (%)	87,65 ± 4,05	90,68 ± 0,61	92,47 ± 0,16	81,79 ± 6,83	83,43 ± 9,11	76,87 ± 8,80 ⁴
CD8 (%)	27,26 ± 4,36	38,41 ± 2,06	39,29 ± 0,95	32,37 ± 7,23	24,31 ± 7,41 ⁵	30,46 ± 7,71
Nk (%)	0,28 ± 0,36	0,22 ± 0,31	0,35 ± 0,23	0,27 ± 0,39	0,07 ± 0,08	0,32 ± 0,44
B (%)	54,57 ± 12,13	67,58 ± 4,57	62,26 ± 3,20	62,48 ± 6,10 ²	61,17 ± 4,33 ²	64,70 ± 3,48 ²

1 - p<0.05 em relação aos grupos controle negativo e experimental 2.

2 - p<0.05 em relação ao grupo controle negativo.

3 - p<0.05 em relação aos grupos experimentais 1 e 3.

4 - p<0.05 em relação aos grupos controles negativo, positivo (1 e 2) e experimental 2 e 3.

5 - p<0.05 em relação aos grupos controles positivo (1 e 2) e experimental 1 e 3.

6 DISCUSSÃO

A literatura demonstra que células do sangue circulante de mamíferos, inclusive de primatas, constituem um ótimo sistema para testar uma substância quanto à sua capacidade em produzir danos no organismo. Estas células sanguíneas constituem ótimas amostras para variados sistemas de tratamento, pois pertencem a um tecido que está em contato direto e constante com quase todos os outros que compõem o organismo, e que além de amplamente disponíveis e facilmente coletadas, possibilitam a realização de vários testes e pós-testes com respostas que geralmente são de fácil e rápida análise (BASES *et al.*, 1979; MORALES-RAMÍREZ *et al.*, 2004; HOFFBRAND, *et al.*, 2007). Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, células do sistema sanguíneo serviriam como um sistema sentinela para avaliação de grupos de alto risco (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

No presente estudo, a resposta celular de primatas não humanos tratados com o agente carcinogênico MNU e o Modificador da Resposta Imune Canova® foi avaliada através da análise de células sanguíneas por métodos hematológicos, bioquímicos e de citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de fazer a caracterização celular da linhagem hematopoética normal e a definição de proliferações celulares malignas (BUCCHERI & LORENZI, 2006). A análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo pode revelar padrões como a ploidia celular, a posição da célula no ciclo celular e também estimar frequência das células apoptóticas (DARZYNKIEWICZ, 2011). Atualmente é um dos métodos mais utilizados na identificação de processos patológicos hematológicos, determinando múltiplas propriedades físicas das células isoladas em suspensão, como também promovendo a identificação dos vários antígenos celulares (receptores protéicos) que podem ser de superfície, citoplasmáticos e nucleares (BACAL & FACHABER, 2003; BASSO *et al.*, 2001).

O conhecimento dos padrões hematológicos e bioquímicos é essencial para determinar os limites entre saúde e doença e para a compreensão das alterações produzidas pela patogenicidade de diversos agentes. Estas análises de hematologia e bioquímica auxiliam no diagnóstico e prescrição de novas terapias clínicas contribuindo para o diagnóstico diferencial em seres humanos e em animais utilizados como modelos de laboratório, bem como na

fisiologia comparativa e etiológicas em estudos (RIVIELLO *et al.*, 2001; NAVES *et al.*, 2006).

A seguir faremos uma correlação entre os resultados obtidos neste estudo e dados presentes na literatura para cada parâmetro avaliado.

6.1 PADRÕES DE PESO

Na análise do estado corpóreo dos animais, através do acompanhamento do peso dos mesmos, observamos que os animais tratados com o carcinógeno MNU (grupos experimentais) apresentaram diminuição de peso durante a realização do tratamento experimental, porém os valores obtidos antes e após o tratamento com o carcinógeno não foram estatisticamente diferentes. Somente os animais dos grupos controle positivo apresentaram diminuição significativa de peso quando comparados com os animais do grupo controle negativo, bem como, com os valores relatados na literatura para a média de peso normal de macacos da espécie *Cebus apella* (FERREIRA, 2009). A perda de peso do animal do grupo controle positivo pode estar, em grande parte, associada ao provável processo neoplásico do trato digestório, no qual a desnutrição e a perda ponderal é muito comum em indivíduos que apresentam comprometimento do trato digestório, principalmente devido à baixa ingestão alimentar decorrente da própria sintomatologia da doença (LEANDRO-MERHI *et al.*, 2008).

6.2 PADRÕES HEMATOLÓGICOS

Os resultados obtidos na análise dos parâmetros hematológicos VCM, HCM, CHCM, basófilo, eosinófilo, mielócito e metamielócito permaneceram inalterados durante a realização deste estudo, não apresentando diferenças estatisticamente significativas ao serem comparados os grupos controle (negativo e positivos) e grupos experimentais, bem como ao serem comparados aos valores obtidos nos grupos citados com os valores relatados na

literatura como padrões de normalidade para esta espécie (NAVES *et al.*, 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ *et al.*, 2008).

De acordo com os parâmetros hematológicos de hematócrito, número de hemácias, hemoglobina, e número de leucócitos no grupo controle positivo, os animais tratados com o carcinógeno MNU por mais de três anos, apresentaram um quadro de anemia. Os valores desses parâmetros anteriormente citados apresentaram-se significativamente menores, quando comparados aos grupos controle negativo, experimentais, bem como com aos valores normais para a espécie citados na literatura (NAVES *et al.*, 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ *et al.*, 2008). A anemia é uma complicação comum em pacientes com doenças de vários tipos, incluindo o câncer. Os mecanismos incluem mudanças mediadas por citocinas, alterações no metabolismo do ferro e diminuição de valores de hemácias e hemoglobina (ADAMSON, 2008).

O aumento de células da linhagem branca nos grupos tratados com o MNU (controle positivo 1 e 2) provavelmente foi devido à resposta inflamatória do animal frente ao provável processo neoplásico, o que está de acordo com os efeitos que esse carcinogênico causa no sistema linfo-hematopoiético (UWAGAWA *et al.*, 1991). Nos grupos tratados com o CA (experimentais 2 e 3), também foi observado o aumento destas células, fato este explicado pela ação deste medicamento, que atua como um modificador da resposta imune, ativando macrófagos e induzindo a produção de células sanguíneas da linhagem branca (ABUD *et al.*, 2006).

Nosso grupo de pesquisa já havia comprovado anteriormente que o CA induz indiretamente a proliferação de linfócitos *in vitro* por meio da ativação de macrófagos (BURBANO *et al.*, 2009), corroborando com estudos anteriores *in vivo* e *in vitro* os quais revelaram a ativação de macrófagos pelo tratamento com esse modificador da resposta imune (PIEMONTE & BUCHI 2002; PEREIRA *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.* 2006; CÉSAR *et al.*, 2008).

Apesar de ser relatado na literatura que o CA pode atuar de forma indireta promovendo o aumento do número de neutrófilos devido a sua ação na proliferação e ativação de macrófagos (LASLO *et al.*, 2006), no presente estudo não observamos esta ação do Modificador da resposta imune. Após tratamento com o MNU a contagem de neutrófilos apresentou-se diminuída (grupo experimental 1), porém após o tratamento com o CA, estes valores não foram restabelecidos (grupo experimental 3), provavelmente devido ao curto período de tempo (3 dias) pelo qual os animais foram tratados com o medicamento.

Os monócitos representam uma grande população de células circulatórias que podem diferenciar em macrófagos ou células dendríticas (SYME *et al.*, 2005). No presente estudo o número de monócitos apresentou-se diminuído no grupo tratado com o MNU (experimental 1) e aumentado nos grupos que receberam o CA (controle positivo 2 e experimental 2), provavelmente pelo fato deste medicamento atuar na ativação de macrófagos via estimulação da diferenciação de monócitos neste tipo celular (SMIT *et al.*, 2008).

Apesar de termos observado o aumento do número de plaquetas tanto nos grupos que receberam o MNU (controle positivo 1 e experimental 1) quanto nos grupos que receberam o Modificador da Resposta Imune Canova® (experimentais 2 e 3), quando comparados ao grupo controle negativo, ao compararmos os valores deste grupos com os valores de normalidade deste parâmetro descrito previamente na literatura (NAVES *et al.*, 2006; RIVIELLO & WIRZ, 2001; WIRZ *et al.*, 2008), os mesmos apresentaram-se normais.

6.3 PADRÕES BIOQUÍMICOS

Apesar de existirem muitas opções entre as substâncias utilizadas para qualificar e quantificar a lesão hepática, optou-se pela dosagem de TGO, TGP e GGT pela facilidade de execução e pela grande frequência com que estas são utilizadas, sejam isoladamente ou acompanhadas de outros métodos de avaliação. Além disso, estes parâmetros são efetivamente os mais utilizados na prática clínica para o acompanhamento de pacientes (SILVA *et al.* 2006).

Os níveis sangüíneos das enzimas hepáticas evidenciam a maior ou menor agressão a que o organismo foi submetido. Um fator de alteração da função hepática ocorre em decorrência da toxicidade apresentada por vários agentes químicos. No presente estudo observamos um aumento significativo dos níveis destas enzimas nos animais tratados por longo período de tempo com o MNU (grupos controle positivo 1 e 2), provavelmente devido a toxicidade provocada pelo tratamento com este carcinógeno. Nos animais tratados com o Modificador da Resposta Imune Canova®, foram observados a diminuição nestes padrões bioquímicos, mostrando que este medicamento, ao atuar sobre as defesas do organismo, não apresenta toxicidade (CASTANHEIRA *et al.*, 2004) e possui um provável efeito hepatoprotetor, já que elevação acentuada nos níveis séricos de TGO e TGP, é indicativo de

dano hepatocelular, geralmente atribuída à liberação dessas enzimas na circulação sanguínea após a ruptura da membrana plasmática nos danos celulares (SHAARAWY *et al.*, 2009). Administração de CA possivelmente pode ter reduzido significativamente os danos hepáticos, através da manutenção da integridade da membrana plasmática de células do fígado, suprimindo assim o vazamento dessas enzimas para o plasma.

Na avaliação de marcadores bioquímicos da função renal os valores da uréia e creatinina também se apresentaram alterados nos grupos que receberam o tratamento de forma aguda com o MNU (grupos experimentais 1 e 3), onde foram encontrados valores significativamente maiores do que nos demais grupos. Estas alterações, bem como as encontradas na análise de enzimas hepáticas, podem ser associadas com os sintomas típicos da intoxicação por drogas carcinogênicas, entre estas o MNU (UWAGAWA *et al.*, 1991).

6.3 CICLO CELULAR

Os dados da análise da avaliação da cinética do ciclo celular dos animais tratados com o carcinógeno MNU (grupos controle positivo 1 e experimental 1) demonstraram que houve um acúmulo de células na fase S do ciclo celular e respectiva redução de células nas fases G_0 - G_1 e em fases de proliferação (G_2 -M). Estes dados corroboram com estudo anterior de Kirkhus e colaboradores (1987) que, analisando células epidérmicas de camundongos tratados com MNU, observaram que este carcinógeno induziu um atraso inicial na progressão do ciclo celular, com acúmulo de células nas fases S e G_2 , seguido por proliferação celular após um curto período de tempo (por volta de 1 semana). Estes resultados de cinética do ciclo celular são consistentes com dados anteriores de estudos de outras substâncias cancerígenas, onde foi demonstrado que antes de promover uma rápida proliferação celular, estes agentes causam um atraso inicial na progressão do ciclo, com acúmulo de células na fase de replicação do DNA (fase S) (KIRKHUS *et al.*, 1987).

Análises de transcriptoma e citometria de fluxo em células da linhagem celular de carcinoma de cólon humano Caco-2 tratadas com compostos N-nitrosos, entre estes o MNU, também demonstraram que estes compostos provocam modificações na regulação do ciclo celular, levando a um acúmulo de células na fase S, bem como a um aumento do número de células apoptóticas (HEBELS *et al.*, 2009).

Quanto à análise da cinética do ciclo celular dos animais tratados com o Modificador da Resposta Imune Canova® (grupos controle positivo 2 e experimentais 2 e 3), verificamos que houve um aumento significativo da porcentagem de células nas fases G₀-G₁ bem como da porcentagem de células em estágio de proliferação celular (fases G₂-M). Estes resultados mais uma vez corroboram com estudos anteriores que revelaram que o CA atua na proliferação e na diferenciação de células hematopoiéticas, ativando a replicação destas células de modo direto ou indireto (PIEMONTE & BUCHI 2002; PEREIRA *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; CÉSAR *et al.*, 2008; BURBANO *et al.*, 2009). Nosso estudo descreve pela primeira vez, no nosso conhecimento, os padrões de cinética do ciclo celular para animais tratados *in vivo* com o Modificador da Resposta Imune Canova®.

6.4 IMUNOFENOTIPAGEM

Macrófagos ativados por CA secretam citocinas e fatores de crescimento (BURBANO *et al.*, 2009) ativando outros macrófagos e recrutando outras células do sistema imunológico tais como linfócitos T, CD4, B e NK que desencadeiam uma resposta imunológica contra células lesionadas (SATO *et al.*, 2005) em acordo com a teoria da vigilância imunitária (FILHO, 2009).

Neste estudo, avaliamos o perfil de distribuição de marcadores imunológicos da resposta imune adaptativa em células de *Cebus apella* tratados com o carcinógeno MNU e o Modificador da resposta imune Canova ®. Desta forma, avaliamos a porcentagem de distribuição de linfócitos B, linfócitos T (CD3+), linfócitos T auxiliar (CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD8+) e células *natural killer* (NK).

Nos grupos tratados de forma aguda com o carcinógeno (experimentais 1 e 3) observamos uma diminuição na porcentagem total de células T (CD3+), onde podemos inferir que o MNU atuou de forma a inibir a proliferação destas células, o que está de acordo com os dados previamente relatados de que carcinógenos nitrosos provocam um atraso inicial na proliferação celular (KIRKHUS *et al.*, 1987; HEBELS *et al.*, 2009). Estes mesmos animais, bem como os do grupo que recebeu o MNU de forma crônica (positivos 1 e 2) apresentaram um padrão de aumento dos níveis de linfócitos T citotóxicos (CD8) e diminuição de linfócitos

T auxiliar (CD4+). Estes achados corroboram com os achados de Frank *et al.* (1992) que, ao avaliar células de linfossarcoma induzidas por MNU em camundongos, observaram que as mesmas apresentavam alta incidência de fenótipo CD4-CD8+.

Já nos grupos tratados com o Modificador da Resposta Imune Canova® (experimentais 2 e 3), pôde ser observado o aumento da porcentagem de linfócitos B, e o valor absoluto de linfócitos T (CD4+), porém estas células também se encontraram aumentadas nos grupos tratados com o MNU (controles positivo 1 e 2, experimental 1). Apesar de ter sido previamente descrito que o CA é capaz de agir aumentando o número de linfócitos e células NK (SATO *et al.*, 2005), no presente estudo não podemos afirmar que este medicamento foi o responsável pelo aumento da população destas células. Provavelmente pela adaptação do período de administração do CA, em macacos, do que o preconizado para humanos (CASTANHEIRA *et al.* 2004) e, desta forma, possivelmente com maior tempo de administração, o medicamento possa exercer seus efeitos modificadores da resposta imune.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o CA pode melhorar a resposta celular de alguns parâmetros hematológicos, bioquímicos e de proliferação celular, apesar de não ter sido encontrado o padrão de resposta imune típica do tratamento com este medicamento. Ainda que o mecanismo exato de ação do CA não esteja esclarecido, seus efeitos de forma geral são benéficos para o organismo. Foi relatado que pacientes com diversos tipos de neoplasias tratados com o CA tiveram melhora no apetite, redução de náuseas e vômitos, seguidos de ganho de peso além de melhora nos padrões de hemograma como redução de anemia, aumento nos níveis de leucócitos, linfócitos e monócitos (CABRAL *et al.*, 2003).

7 CONCLUSÃO

Verificamos que o Modificador da Resposta Imune Canova® minimizou a toxicidade do MNU em *Cebus apella* quando avaliados certos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Adicionalmente, podemos observar a habilidade parcialmente modificadora da resposta imune desse medicamento, por aumentar a contagem de leucócitos, porém sem alterar o padrão de marcadores imunológicos.

A análise da cinética do ciclo celular revelou que o CA atua na proliferação e na diferenciação de células hematopoiéticas, ativando a replicação destas células de modo direto ou indireto, além de descrever pela primeira vez, no nosso conhecimento, os padrões de cinética do ciclo celular para animais tratados *in vivo* com CA.

Desta forma, podemos afirmar que o CA é capaz de restaurar alguns componentes do sistema hematopoiético, e pode desta forma atuar como auxiliar em tratamentos de quimioterapia, aumentando a tolerância e a duração dos mesmos.

A análise comparativa entre os tratamentos com o carcinógeno MNU e o Modificador da Resposta Imune Canova® em primatas da espécie *Cebus apella*, é inovadora e relevante para o desenvolvimento científico e tecnológico da análise oncológica. Acreditamos, por fim, que este estudo gerou novas informações biológicas, que possibilitarão uma melhor compreensão fisiopatológica de processos neoplásicos bem como para o desenvolvimento de novas metodologias antineoplásicas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; SHIV PILLAI; **Imunologia Celular e Molecular**. 6° Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

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 Biology International**, v. 30, n. 10, p. 808-816. 2006.

ADAMSON, J. W. The anemia of inflammation/malignancy: mechanisms and management. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. P. 159-165. 2008.

ALBERT, Bruce. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BACAL N. S.; FACHABER, M. H. W. **Aplicação Prática da Citometria de Fluxo**. 1° ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

BARTH, R. F. & KAUR, B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. **Journal of Neuro-oncology**, v. 94, n. 3, p. 299-312. 2009.

BASES, R.; RUBINSTEIN, A.; KADISH, A.; MENDEZ, F.; WITTNER, D.; ELEQUIN, F.; LIEBESKIND, D. Mutagen-induced disturbances in the DNA of human lymphocytes detected by antinucleoside antibodies. **Cancer Res**. v. 39, n. 9, p. 3524-30. 1979.

BASSO, G.; BULDINI, B.; DE ZEN, L. New methodological approaches for immunophenotyping acute leukemias. **Hematologica**, v.87, n. 7, p. 675–692. 2001.

BERARDI, P.; RUSSELL, M.; EL-OSTA, A.; RIABOWOL, K. Functional links between transcription, DNA repair and apoptosis. **Cell Mol Life Sci**. v. 61, n. 17, p. 2173-2180. 2004.

BUCCHERI, V. Citometria de fluxo em Hematologia. In: LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 4° Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006. Cap. 7, p. 595-613.

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

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**, v. 98, n. 1, p. 45-48. 2009.

BURHOP, K.; GORDON, D.; ESTEP, T. Review of hemoglobin-induced myocardial lesions. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 32, n. 3, p. 353-74. 2004.

BURTIS, Carl A. *et al.* **Fundamentos de Química Clínica**. 6° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CABRAL, M. P.; SOFFRITTI, E. M.; NADER, J. R (2003) **Estudo clínico para avaliação do Imunomodulador Canova® na terapêutica de pacientes oncológicos considerados FPT – Fora de Possibilidade Terapêutica**: Fundação Amor — Entidade Filantrópica de Combate a Dor do Câncer, Juiz de Fora MG. [Acessado em 15/10/2010]. Disponível em http://www.canovado brasil.com.br/trabalhos/TC_Cabral.pdf. 12p.

CANOVA DO BRASIL (2010) **Medicamento Imunomodulador Canova**. [Acessado em 15/10/2010]. Disponível em <http://www.canovado brasil.com.br/index.htm>.

CASTANHEIRA, P. T.; BRITO, J. R.; FISCHER, I.; FELIÚ, D. G. G. (2004) **Qualidade de vida e tratamento de câncer ou AIDS com Imunomodulador Canova®**. [Acessado em 15/10/2010]. Disponível em <http://www.canovado brasil.com.br/uploads/study/TRABALHO CLINICO N°5 - PORTUGUÊS-1267636342.pdf> . 8p.

CASTANHEIRA, P. T.; OLIVEIRA, A. P.; RAJÃO, M. C. S.; KRIEGER, C. O. P.; MODESTO, N. P.; FELIÚ, D. G. G. (2001) **Avaliação do uso de imunomodulador Canova (medicamento homeopático) em pacientes com câncer**. [Acessado em 15/10/2010]. Disponível em http://www.canovado brasil.com.br/trabalhos/TC_Castanheira2.pdf . 25p.

CEDERJ. Ciclo celular - Ilustração da checagem (checkpoints) do ciclo celular. Acessado em 27 Fev 2011. Disponível em: <http://www.ppsus.cederj.edu.br>.

CESAR, B.; ABUD, A. P.; DE OLIVEIRA, C. C.; CARDOSO, F.; GREMSKI, W.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated in vitro with a complex homeopathic medication. **Micron**. v. 39, n. 4, p. 461-70. 2008.

CHAPLIN, D. D. 1. Overview of the human immune response. **J Allergy ClinImmunol**, v. 117, n. 2, s. 2, p. 430-435. 2006.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **J Allergy ClinImmunol**, v. 152, n. 2, s. 2, p. S3-S23. 2010.

DA SILVA FRANCHI, C. A.; BACCHI, M. M.; PADOVANI, C. R.; DE CAMARGO, J. L. V. Thymic lymphomas in Wistar rats exposed to N-methyl-N-nitrosourea (MNU). **Cancer Science**, v. 94, n. 3, p. 240–243. 2003.

DARZYNKIEWICZ, Z. Critical aspects in analysis of cellular DNA content. **Curr Protoc Cytom**, cap. 7, uni. 7.2. 2011.

DARZYNKIEWICZ, Z.; HALICKA, H. D.; ZHAO, H. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. **Adv Exp Med Biol**, v. 676, p. 137-147. 2010.

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**. v. 52, n. 6, p. 420-432. 2006.

DE OLIVEIRA, C. C.; DE OLIVEIRA, S. M.; GOES, V. M.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; BUCHI, D. F. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **J Cell Biochem**, v. 104, n. 4, p. 1364-77. 2008.

DONOVAN, P. & SMITH, G. Mutagenicity of N-ethyl-N-nitrosourea, N-methyl-N-nitrosourea, methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in the developing Syrian hamster fetus. **Mutation Research**, v. 699, n. 1-2, p. 55-57. 2010.

DUFOUR, D. R.; LOTT, J. A.; NOLTE, F. S.; GRETCH, D. R.; KOFF, R. S.; SEEFF, L. B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. **Clin Chem**, v. 46, n. 12, p. 2027-2049. 2000.

EYMIN, B. &GAZZERI, S. Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis. **Cell Adh Migr**, v. 4, n. 1, p. 114-123. 2010.

FAILACE, Renato. **Hemograma: manual de interpretação**. 5º ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 298p.

FEITSMA, H.; AKAY, A.; CUPPEN, E. Alkylation damage causes MMR-dependent chromosomal instability in vertebrate embryos. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 12, p. 4047-4056. 2008.

FERREIRA, Adriano Fernandes. **Perfis hematológicos e bioquímico de macaco prego (*cebus spp.*, Erxleben, 1777) mantidos em cativeiro no estado da Paraíba**. Tese de Doutorado – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2009. 117f.

FILHO, Geraldo Brasileiro. **Bogliolo Patologia Geral**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

FRANK, A. A.; COLLIER, J. M.; FORSYTH, C. A.; OUGHTON, J. A.; KERKVLIT, N. I. Flow cytometric analysis of thymic lymphosarcoma induced by N-methyl-N-nitrosourea in C57B1/6J mice. **Carcinogenesis**. v. 13, n. 3, p. 509-512. 1992.

FRIEDMAN, A.; HU, B.; KAO, C. Y. Cell cycle control at the first restriction point and its effect on tissue growth. **J Math Biol**, v. 60, n. 6, p. 881-907. 2010.

GONÇALVES, B. F.; ZANETONI, C.; SCARANO, W. R.; GÓES, R. M.; VILAMAIOR, P. S.; TABOGA, S. R.; CAMPOS, S. G. Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. **Exp Mol Pathol**, v. 88, n. 1, p. 96-106. 2010.

HEBELS, D. G.; JENNEN, D. G.; KLEINJANS, J. C.; DE KOK, T. M. Molecular signatures of N-nitroso compounds in Caco-2 cells: implications for colon carcinogenesis. **Toxicol Sci**. v. 108, n.2, p. 290-300. 2009.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos em Hematologia**. 5º ed. Porto Alegre. Artmed, 2007.

JANEWAY, Charles A. *et al.* **Imunobiologia: O sistema na saúde e na doença**. 6º ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

KIRKHUS, B.; IVERSEN, O. H.; KRISTENSEN, A. Carcinogenic doses of methyl nitrosourea induce dose response related delay in transit through S and G2 phases in mouse epidermis: a cell kinetic study. **Carcinogenesis**. v. 8, n. 3, p. 369-375. 1987.

LAI, Y. C.; YOSHIKAWA, K.; KIMURA-KAWANAKA, A.; MIKI, H.; SASAKI, T.; TSUBURA, A. Effects of Short-term Pregnancy Hormone Treatment against N-Methyl-N-nitrosourea-induced Mammary Carcinomas in Female Lewis Rats. **In Vivo**, v. 25, n. 2, p. 149-156. 2011.

LASLO, P.; SPOONER, C. J.; WARMFLASH, A.; LANCKI, D. W.; LEE, H. J. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 755-766. 2006.

LEANDRO-MERHI, V. A.; TRISTÃO, A. P.; MORETTO, M. C.; FUGULIN, N. M.; MCLELLAN, K. C. P.; AQUINO, J. L. B. Estudo comparativo de indicadores nutricionais em pacientes com neoplasias do trato digestório. **Arq Bras Cir Dig**, v. 21, n. 3, p. 114-119. 2008.

LONG, G. G.; GOODMAN, D. G.; CREDILLE, K. M.; MANN, P. C.; WILSON, J. M.; CARDY, R. Hematopoietic proliferative lesions in the spleen of rasH2 transgenic mice treated with MNU. **Toxicol Pathol**, v. 38, n. 7, p. 1026-1036. 2010.

LOPES, L.; LYRIS, M. F.; GODOY, C. C.; DE OLIVEIRA, GABARDO, J.; SCHADECK, R. J.; BUCHI, D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, n. 3, p. 277-287. 2006.

MALUMBRES, M. & BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166. 2009.

MATOS, Léoma Albuquerque. **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. 50f.

MORALES-RAMÍREZ P.; VALLARINO-KELLY, T.; CRUZ-VALLEJO, V. L.; LÓPEZ-ITURBE, R.; ALVARO-DELGADILLO, H. In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 207-213. 2004

NAKAYAMA, Y.; INOUE, Y.; MINAGAWA, N.; ONITSUKA, K.; NAGATA J.; SHIBAO, K.; HIRATA, K.; SAKO, T.; NAGATA, N.; YAMAGUCHI, K. Chemopreventive effect of 4-[3,5-Bis (trimethylsilyl) benzamido] benzoic acid (TAC-101) on MNU-induced colon carcinogenesis in a rat model. **Anticancer Research**, v. 29, n. 6, p. 2059-2065. 2009.

NATHWANI, R. A.; PAIS, S.; REYNOLDS, T. B.; KAPLOWITZ, N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. **Hepatology**, v. 41, n. 2, p. 380-382. 2005.

NAVES; E. A.; FERREIRA F. A.; MUNDIM A. V.; GUIMARÃES, E. C. Valores hematológicos de macaco prego (*Cebus apella* - Linnæus, 1758) em cativeiro. **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 125-131, 2006.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205. 2008.

PARK, M. T. & LEE, S. J. Cell cycle and cancer. **J Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 1, p. 60-65. 2003.

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**, v. 51, n. 2, p. 157-164. 2005.

PIEMONTE, M. R. & BUCHI D. F. Analysis of IL-2, IFN-gamma and TNF-alpha production, alpha5 beta1 integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 34, n. 3, p. 255-263. 2002.

PRETORIUS, E.; SMIT, E.; OBERHOLZER, H. M.; STEYN, E.; BRIEDENHANN, S.; FRANZ, R. C. Investigating the ultrastructure of platelets of HIV patients treated with the immuno-regulator, Canova: a qualitative scanning electron microscopy study. **Histol Histopathol**, v.24, n. 4, p. 399-405. 2009.

RABELLO-GAY, M.N. ; RODRIGUES, M.A.R. ; MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos críticos de avaliação. **Soc Bras de Gen.** v. 75, p. 97-103. 1991.

RIVIELLO, M. C.; WIRZ, A. Haematology and blood chemistry of *Cebus apella* in relation to sex and age. **J Med Primatol**, v. 30, p. 308–312. 2001

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 anti-retrovirais. **Braz J Infect Dis**, v. 5, n. 58. 2001

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; REIS, D. D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAUJO-JORGE, T. C.; ANTAS, P. R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA CARVALHO, A.; ELOI-SANTOS, S.M.; FAVATO, D.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scand J Immunol**, v. 58, p. 655-663. 2003.

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**, v. 94, n. 1, p. 26-32. 2005.

SELIGMANN, I. C.; LIMA, P. D.; CARDOSO, P. C.; KHAYAT, A. S.; BAHIA, M. O.; BUCHI, D. F.; CABRAL, I. R.; BURBANO, R. R. The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 2, p. 223-228. 2003.

SHAARAWY, S. M.; TOHAMY, A. A.; ELGENDY, S. M.; ELMAGEED, Z. Y.; BAHNASY, A.; MOHAMED M. S.; KANDIL, E.; MATROUGUI, K. Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. **Int J Biol Sci.** v. 5, n. 6, p. 549-557. 2009.

SILVA, F. N.; REFINETTI, R. A.; EULALIO, J. M. R. Avaliação bioquímica dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico após isquemia e reperfusão hepática em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 33, n. 6, p. 393-397. 2006.

SINGLA, N. & DHAWAN, D. K.; Modulation of carbohydrate metabolism during N-methyl N-nitrosourea induced neurotoxicity in mice: role of curcumin. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 4, p. 660-665. 2010.

SMIT, E.; OBERHOLZER, H. M.; PRETORIUS, E. A review of immunomodulators with reference to Canova. **Homeopathy**, v. 98, n. 3, p. 169-176. 2009.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 5, p. 329-337. 2007.

SOUZA, I. K. F.; SILVA, A. L.; MISUMI, A.; SAVI, D.; CUSTÓDIO, D. S.; MAIA, F. F. R.; CANELA, G. G. C.; DE OLIVEIRA, C. H. C. Estudo histológico e computadorizado das áreas com células parietais e principais no estômago de ratos wistar tratados com pantoprazol e “N-Nitroso-N-methylurea” (NMU). **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 17, n. 4, p. 251-257. 2002.

SYME, R.; BAJWA, R.; ROBERTSON, L.; STEWARD, D.; GLUCK, S. Comparison of CD34 and monocyte-derived dendritic cells from mobilized peripheral blood from cancer patients. **Stem Cells**. v. 23, n. 1, p. 74–81. 2005.

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U. P.; ADAMSON, R. H. Chemical carcinogenesis studies in non-human primates. **Proc Jpn Acad Ser B**, v. 84, n. 6, p. 176-188, 2008.

THOMPSON, H. J. & SINGH, M. Rat models of premalignant breast disease. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 4, p. 409-420. 2000.

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

TOMITA, H.; TAKAISHI, S.; MENHENIOTT, T. R.; YANG, X.; SHIBATA, W.; JIN, G.; BETZ, K. S.; KAWAKAMI, K.; MINAMOTO, T.; TOMASETTO, C.; RIO, M. C.; LERKOWIT, N.; VARRO, A.; GIRAUD, A. S.; WANG, T. C. Inhibition of Gastric Carcinogenesis by the Hormone Gastrin Is Mediated by Suppression of TFF1 Epigenetic Silencing. **Gastroenterology**, v.140, n. 3, p. 879-891. 2011.

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.

TSUBURA, A.; YOSHIZAWA, K.; KUWATA, M.; UEHARA, N. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials. **Histology Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 933-944. 2010.

UWAGAWA, S.; TSUDA, H.; INOUE, T.; TAGAWA, Y.; AOKI, T. Enhancing potential of 6 different carcinogens on multi-organ tumorigenesis after initial treatment with N-methyl-N-nitrosourea in rats. **Jpn J Cancer Res**. v. 82, n. 12, p. 1397-1405. 1991.

VASCONCELOS, Shélida Braz. **Avaliação morfológica do baço, linfonodo e fígado de macacos-prego *Cebus apella* tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA**. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília. Brasília. 2008. 88f.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif**, v. 36, n. 3, p. 131-149. 2003.

VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 23, n. 29, p. 235-271. 2011.

VIALARD, J. F.; LACOMBE, F.; BELLOC, F.; PELLEGRIN, J. L.; REIFFERS, J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. **Cancer Radiother**, v. 5, n. 2, p. 109-129. 2001.

WIRZ, A.; TRUPPA, V.; RIVIELLO, M. C. Hematological and plasma biochemical values for captive tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Am J Primatol**, v. 70, n. 5, p. 463-472. 2008.

YANG, J. N.; LUO, L.; LIN, S. C.; CHEN, J. M.; LI, D.; HU, S. X. N-methyl-N-nitrosourea-induced apoptosis of photoreceptor cells in Sprague-Dawley rats via nuclear factor-kappaB. **Chinese Medical Journal**, v. 118, n. 13, p. 1081-1086. 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

ZENG, J.; SUN, Y.; WU, K.; LI, L.; ZHANG, G.; YANG, Z.; WANG, Z.; ZHANG, D.; XUE, Y.; CHEN, Y.; ZHU, G.; WANG, X.; HE, D. Chemopreventive and chemotherapeutic effects of intravesical silibinin against bladder cancer by acting on mitochondria. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 1, p. 104-116. 2011.

ZULLIGER, R.; LECAUDÉ, S.; EIGELDINGER-BERTHOU, S.; WOLF-SCHNURRBUSCH, U. E.; 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**. 15 jan 2011.



PARECER MED002-10

Projeto: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODUTO MÉTODO CANOVA EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS.

Coordenador: Prof. Dr. Rommel Rodrigues Burbano

Área Temática: Medicina

Vigência: 01/2010 a 01 2012

Nº no CEPAE-UFPA: MED-02-10

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE-UFPA, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR E PRORROGAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de janeiro de 2010

Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa
Com Animais de Experimentação da Universidade
Federal do Pará