

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR – PPGNBC
DEFESA DE MESTRADO

LAÍS TEIXEIRA BONFIM

**Avaliação do efeito citoprotetor do composto homeopático Canova®
em linhagem celular de rim de macaco verde africano (VERO) exposta
ao fármaco dipirona sódica**

Belém
2018

LAÍS TEIXEIRA BONFIM

**Avaliação do efeito citoprotetor do composto homeopático canova®
em linhagem celular de rim de macaco verde africano (VERO) exposta
ao fármaco dipirona sódica**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.

Co-orientadora: Prof. Dra. Tatiane Cristina Mota.

Belém
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B713a Bonfim, Laís Teixeira
Avaliação do efeito citoprotetor do composto homeopático canova® em linhagem celular de rim de macaco verde africano (VERO) exposta ao fármaco dipirona sódica / Laís Teixeira Bonfim. — 2018
50 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
Coorientação: Profa. Dra. Tatiane Cristina Mota.

1. Cultura de células. 2. Mutagênese. 3. Homeopatia. 4. Agentes antiinflamatórios. 5. Células - proteção. I. Bahia, Marcelo de Oliveira, orient. II. Título

CDD 571.6

LAÍS TEIXEIRA BONFIM

**Avaliação do efeito citoprotetor do composto homeopático Canova® em
linhagem celular de rim de macaco verde africano (VERO) exposta ao fármaco
dipirona sódica**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Aprovada em: 01 / 03 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha - IFPA

Prof. Dr. Júlio César Pieczarka - UFPA

BELÉM
2018

Dedico este trabalho aos meus pais Augusto Bonfim e Maria de Nazaré pelo amor e dedicação de uma vida inteira; ao meu filho Luis Mateus por ser minha maior motivação e inspiração; à minha Vó Madalena *in memoriam* e ao meu namorado Vitor Cirilo por toda sua compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará;

Ao programa de pós graduação em Neurociencias e Biologia Celular;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

Ao Deus que tanto amo pelo dom da vida;

Aos meus pais por sempre priorizarem meus estudos;

Aos meus irmãos Lorena e Leandro por fazerem minha vida completa;

Ao meu namorado por me ajudar sempre que precisei de explicações sobre bioestatística;

Aos professores que me inspiraram até aqui, de forma especial meus orientadores Prof. Dr. Marcelo Bahia e Profa.Dra. Tatiane Mota, serei a grata à vocês por toda minha vida;

Ao laboratório de Citogenética Humana e seus professores que desde a iniciação científica me receberam muito bem;

Aos grandes amigos que fiz nesses dois anos, em especial à Ingrid e Mírian, que sempre tiraram minhas dúvidas, Carla, Jorge, Emerson, Lorenona, Regianne e Thayana todos vcs estão no meu coração.

À Juliana que me ajudou em grande partes dos experimentos;

Aos meus amigos de graduação que sempre estão presentes comigo, destaco aqui Luana Calandrini que não mediu esforços pra me ajudar;

Ao meu filho Luis Mateus Bonfim que é minha dose de alegria diária, o amor em forma de pessoa e o grande incentivador de tudo isso.

RESUMO

O paracetamol, a dipirona sódica e o ibuprofeno estão entre os principais medicamentos isentos de prescrição médica disponíveis nas farmácias. Entre estes fármacos, a dipirona sódica tem se destacado na literatura como um dos medicamentos mais utilizados. Apesar de seu amplo uso, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a dipirona sódica apresenta efeitos genotóxicos e citotóxicos. Desta forma, são de grande importância estudos com medicamentos que proporcionem proteção ou que amenizem os eventuais danos causados por esta droga. O composto homeopático Canova® (CA) parece ser um bom candidato para esse fim, uma vez que ameniza os efeitos colaterais de medicamentos a ele associado. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito citoprotetor do CA em linhagem celular de rim de macaco verde africano (VERO) exposta ao fármaco dipirona sódica utilizando os ensaios do cometa, apoptose e imunocitoquímica. Nossos resultados demonstraram através do teste do cometa que a dipirona sódica induziu um aumento no índice de dano (ID) ao DNA da linhagem VERO. No entanto, quando estas células foram co-tratadas com CA nas três concentrações estudadas, observou-se uma redução significativa no ID, o que indica um possível efeito antígenotóxico do CA. Quanto ao ensaio de apoptose e necrose observamos que a dipirona induziu um aumento na percentagem de apoptose tanto em 24 quanto em 48 h. Entretanto, quando este fármaco foi associado ao CA, foi observada uma redução significativa neste efeito nas três concentrações de CA + dipirona. No que diz respeito aos resultados de imunocitoquímica, foi demonstrado um aumento na expressão de caspase 8 e citocromo C quando as células foram expostas à dipirona; em contrapartida, o co-tratamento reduziu significativamente este efeito. Quanto à expressão de caspase 9, observamos que a dipirona induziu um aumento nesta atividade, porém o co-tratamento não apresentou a capacidade de reduzir tal efeito. Desta forma, demonstrou-se, em nossas condições experimentais, que CA age como citoprotetor contra os danos causados pela dipirona.

Palavras-chave: Citoproteção. Dipirona sódica. Canova. Antigenotoxicidade.

ABSTRACT

Paracetamol, sodium dipyrone and ibuprofen are among the main medicines exempt from medical prescription available in pharmacies in Brazil. Sodium dipyrone is highlighted in the literature as one of the most commonly used drugs. Despite its wide use, our research group demonstrated that sodium dipyrone exerts genotoxic and cytotoxic effects. Therefore, studies with medicines that may provide protection or that ameliorate the possible damages caused by sodium dipyrone are very important. The homeopathic compound Canova® (CA) seems to be a good candidate for such purpose, since in combination with other drugs it seems to soften the side effects of such drugs. Therefore, the present work aims to evaluate the possible cytoprotective effect of CA on African green monkey kidney cell line (VERO) exposed to the drug sodium dipyrone using the comet, micronucleus, apoptosis and immunocytochemistry assays. Results obtained by the comet test showed that sodium dipyrone induces an increase in DNA damage index of the VERO line. However, when such cells were co-treated with CA at the three concentrations studied, a significant reduction in the ID was observed, indicating a possible antigenotoxic effect of CA. We observed in the apoptosis and necrosis assays that dipyrone induced an increase in the percentage of apoptosis in both 24 hours and 48 hours. However when the drug was associated with CA, a significant reduction in this effect was observed in the three concentrations of CA + dipyrone. Results on immunocytochemistry showed an increase in the expression of caspase 8 and cytochrome C when cells were exposed to dipyrone. On the other hand, co-treatment significantly reduced such effect. Expression of caspase 9 was also observed after dipyrone treatment, however, co-treatment did not reduce such effect. Therefore, in our experimental conditions CA acted as a cytoprotect agent against the damages induced by dipyrone.

Keywords: Cytoprotection. Dipyrone. Canova. Antigenotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Componentes do medicamento homeopático canova®.....	9
FIGURA 2 Via extrínseca e intrínseca da apoptose.	16
FIGURA 3 Micrografia da classificação de scores do ensaio cometa.	28
FIGURA 4 Efeito do co-tratamento dip + ca em células VERO analisadas pelo ensaio do cometa.	29
FIGURA 5 Micrografia de células da linhagem VERO durante a realização do ensaio de apoptose por marcação fluorescente.....	30
FIGURA 6. Efeito citoprotetor do ca em células VERO no que diz respeito à frequência de morte celular induzida pela dipirona após 24 e 48 h de exposição.	31
FIGURA 7 Efeito do ca na expressão de casp 8 em células VERO expostas à dipirona e analisadas pelo ensaio de imunocitoquímica.	32
FIGURA 8 Micrografia de fluorescência mostrando a expressão de casp 8 em células VERO expostas ao ca durante o ensaio de imunocitoquímica.	33
FIGURA 9 Efeito do ca na expressão de casp 9 em células VERO expostas à dipirona e analisadas pelo ensaio de imunocitoquímica.	34
FIGURA 10 Micrografia de fluorescência mostrando a expressão de casp 9 em células VERO expostas ao ca durante o ensaio de imunocitoquímica.	35
FIGURA 11 Efeito do ca na expressão de citocromo c em células VERO expostas à dipirona e analisadas pelo ensaio de imunocitoquímica.	36
FIGURA 12 Micrografia de fluorescência mostrando a expressão de citocromo c em células VERO expostas ao ca durante o ensaio de imunocitoquímica.	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AAS – ácido acetilsalicílico
- AINE - Antiinflamatório não esteroideal
- APAF 1 - Fator de ativação de proteases associado à apoptose 1
- CA – Canova
- CASP 6 – Caspase 6
- CASP 7 – Caspase 7
- CASP 8 – Caspase 8
- CASP 9 – Caspase 9
- CIT C – Citocromo C
- DIP – Dipirona sódica
- DAF - fluoresceína diacetato
- DCFH-DA - 2`-7`-diclorofluorescina diacetato
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- FBS - Soro Bovino Fetal
- HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
- HO - Hoechst 33342
- ID – Índice de Dano
- IDN – Índice de divisão celular
- MN - Micronúcleo
- MTT – (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio])
- NMU - *N-Metil-N-Nitrosourea*
- PI - Iodeto de propídeo
- PNP – Pontes nucleoplasmáticas
- ROS - Espécies reativas de oxigênio
- VERO - Linhagem de rim de macaco verde africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 AUTOMEDICAÇÃO E ANALGÉSICOS	1
1.2 DAPIRONA SÓDICA	4
1.3 COMPOSTO HOMEOPÁTICO CANOVA®.....	8
1.4 MUTAGENESE E ANTIMUTAGENESE	13
1.5 MORTE CELULAR.....	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 LINHAGEM CELULAR VERO.....	19
3.2 CULTIVO DA LINHAGEM CELULAR	19
3.3 TRATAMENTOS.....	20
3.3.1 Canova	20
3.3.2 Dipirona Sódica.....	20
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
3.5 AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MEIO DOS CORANTES FLUORESCENTES DIFERENCIAIS IODETO DE PROPÍDIO, FLUORESCÉINA DIACETATO E HOECHST 33342.....	22
3.5.1 Princípio da técnica.....	22
3.5.2 Procedimento experimental	22
3.6 ENSAIO DE IMUNOCITOQUÍMICA.....	23
3.6.1 Princípio da técnica.....	23
3.6.2 Procedimento Experimental e Análise das Lâminas	24
3.6.2.1 Fixação das Células.....	24
3.6.2.2 Permeabilização, Bloqueio e Incubação com o Anticorpo Primário	24
3.6.2.3 Incubação com o anticorpo secundário, contra-coloração e desmontagem das lâminas	24
3.7 ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)	25
3.7.1 Princípio da Técnica	25
3.7.2 Procedimento Experimental.....	26
3.7.2.1 Preparação das lâminas	26
3.7.2.2 Eletroforese	26
3.7.2.3 Coloração	27

3.7.2.4 Análise das Lâminas.....	27
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 EFEITO ANTIGENOTÓXICO DO CANOVA EM CÉLULAS VERO TRATADAS COM DIPIRONA E ANALISADAS PELO ENSAIO COMETA	29
5.2 EFEITO ANTICITOTÓXICO DO CANOVA EM CÉLULAS VERO TRATADAS COM DIPIRONA E AVALIADAS PELO TESTE DE APOPTOSE E NECROSE	30
5.3 EFEITO DO CA NA EXPRESSÃO DE CASP8, CASP9 E CITOCROMO C EM CÉLULAS VERO EXPOSTAS À DIPIRONA E ANALISADAS PELO ENSAIO DE IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA	31
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	43
REFERENCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 AUTOMEDICAÇÃO E ANALGÉSICOS

A modalidade dor recebe destaque quando comparada aos diferentes elementos do sistema sensorial, uma vez que apresenta um valor biológico fundamental no que diz respeito às fontes de estímulos agressivos, danosos ou potencialmente danosos e, principalmente, pela identificação de seus pontos-alvo, proporcionando, desta forma, comportamentos variados de defesa no organismo (OLIVEIRA, 1996).

O melhor tratamento da dor é aquele dirigido à sua causa e quando tal prática não é possível, ou quando o tratamento etiológico demorar e aumentar excessivamente o sofrimento do doente, a terapêutica sintomática (concomitante ou não com a etiológica) é uma possibilidade bastante útil e plausível. As finalidades do tratamento da dor incluem a analgesia e a melhora da qualidade de vida e da capacidade funcional do paciente. A terapêutica envolve tanto medidas farmacológicas quanto não farmacológicas, sendo a primeira a mais difundida (OLIVEIRA, 1996; OLIVEIRA & NOGUEIRA, 2001).

Entretanto, a avaliação equivocada da dor tem como consequência a analgesia inadequada, levando ao tratamento inapropriado do paciente. Tudo isso tem origem no desconhecimento da farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos analgésicos ou ainda na informação insuficiente, fornecida aos profissionais da saúde, pelos doentes a respeito dos sintomas OLIVEIRA & NOGUEIRA, 2001). De acordo com Bertoncetto *et al.* (2016), a intervenção analgésica inadequada pode levar ao agravamento do quadro clínico do paciente, tanto pelos efeitos colaterais dos medicamentos, quanto pelo mascaramento dos sintomas; podendo ainda, induzir este paciente à dependência em relação ao fármaco utilizado.

Neste contexto, a automedicação vem sendo destacada como um grande problema, visto que para encurtar os caminhos até a depleção da dor e a consequente obtenção do alívio diante de quaisquer sintomas, especialmente os

mais comuns, como, aqueles decorrentes de viroses banais, o indivíduo se vê impulsionado a utilizar medicamentos populares para gripe, febre, dor de garganta, entre outros, ou ainda, a procurar inicialmente orientação leiga, seja de amigos íntimos ou parentes mais experientes (ALDRIGHI *et al.*, 2001).

A automedicação é um procedimento caracterizado fundamentalmente pela iniciativa de um doente, ou de seu responsável, em obter ou produzir e posteriormente utilizar um produto que acredita apresentar benefícios no tratamento de doenças e alívio de sintomas (SILVA *et al.*, 2013). Segundo Soterio & Santos (2016) existe uma prática da automedicação denominada responsável, a qual consiste na utilização racional de medicamentos aprovados para a venda sem prescrição médica, no intuito de tratar doenças, sinais e sintomas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2012 a administração irracional de medicamentos foi um dos problemas de maior complexidade em saúde pública, estimando-se que pelo menos metade dos medicamentos tenha sido prescrita ou vendida de forma inadequada, sendo que destes, cerca de 50% são consumidos de forma imprópria. Goulart *et al.* (2012) afirmam que a prática da automedicação é ainda favorecida pela indisponibilidade de atendimento médico e pela falta de medicamentos básicos nos serviços de saúde. Desta forma, além de razões culturais, a facilidade na aquisição de medicamentos, a repetição de uma receita e a falta de medicamentos nos serviços de saúde podem contribuir para uma maior taxa de automedicação.

Outra questão interessante é que em países com sistema de saúde pouco estruturado, como é o caso do Brasil, a procura de uma farmácia representa a primeira opção para resolver um problema de saúde, sendo que a maior parte dos medicamentos consumidos pela população é vendida sem prescrição médica. Sabe-se que até mesmo em países industrializados, vários medicamentos comuns de uso mais simples estão disponíveis em farmácias, drogarias ou supermercados, e podem ser obtidos facilmente sem necessidade de receita médica (ALDRIGHI *et al.*, 2001).

Entre os principais medicamentos sem prescrição médica disponíveis nas farmácias, temos: paracetamol, dipirona, ibuprofeno, diclofenaco, nimesulida,

cetoprofeno e o naproxeno. Dentre estes medicamentos, a dipirona destaca-se como uma das mais importantes, uma vez que é amplamente utilizada no Brasil, apesar de ser proscrita em muitos países do mundo, inclusive nos Estados Unidos. Esse fármaco é um derivado pirazolônico de excelente potência analgésica e antipirética e, no Brasil, é considerado um medicamento com comprovada eficácia e baixa toxicidade, apresentando raros efeitos cardiovasculares e respiratórios, exceto em situações de superdosagem ou uso prolongado (GOULART *et al.*, 2012).

Segundo Prado *et al.* (2016) em seu trabalho sobre o uso de medicamentos prescritos e a automedicação em homens no Brasil, ocasião em que foram entrevistados oitenta indivíduos do sexo masculino a respeito de quais fármacos sem prescrição médica os mesmos usavam preferencialmente, os principais medicamentos sem prescrição utilizados por estes indivíduos foram: dipirona sódica, paracetamol, ácido acetilsalicílico (AAS), tanto como monodrogas ou em associações e o diclofenaco. Foi demonstrado ainda, que dentre os quatro fármacos citados acima, a dipirona sódica se destacou como a droga mais utilizada pelos indivíduos entrevistados. Estes achados estão de acordo com as observações de Guzella *et al.* (2015) que afirmam que a dipirona continua sendo o principal antipirético utilizado no Brasil, sendo seguida por paracetamol e AAS.

Soterio & Santos (2016) em seu trabalho sobre automedicação no Brasil, observaram que a classe de medicamentos mais utilizada em todos os estados do país foi a dos analgésicos, entre os quais, a dipirona se destacou por ter sido o único medicamento citado em todos os estados pesquisados. Ferreira *et al.*, (2015) em seu trabalho analisando o uso de medicamentos em prescrições pediátricas, observou que o fármaco mais frequente nessas prescrições foi a dipirona com 54,7% dos 150 pacientes.

De forma semelhante, Oliveira *et al.*, (2012) avaliando a automedicação em idosos, observou que entre os medicamentos mais utilizados sem prescrição, destacam-se, os analgésicos e antipiréticos, dentre os quais, a dipirona apresentou maior proporção de consumo pelos pacientes. Desta forma, podemos observar que entre os medicamentos isentos de prescrição, a dipirona sódica é um dos mais utilizados, sendo, portanto de grande relevância um estudo mais detalhado a

respeito dos possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos deste fármaco.

1.2 DIPIRONA SÓDICA

O ácido 1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilsulfonato, mais conhecido como dipirona, ou metamizol, ou ainda, pelo nome comercial, Novalgina é um fármaco muito utilizado pela população brasileira em diversas apresentações farmacêuticas, como, por exemplo: solução oral, injetável, comprimidos e supositórios. Tal composto é comercializado principalmente como medicamento isento de prescrição (MIP) (CAETANO, 2007).

O Metamizol foi sintetizado pela primeira vez na Alemanha em 1920 e, desde 1922, quando foi introduzido no Brasil com nome comercial Novalgina®, sua comercialização tornou-se mundialmente crescente até a década de 70, quando foram relatados graves casos de agranulocitose relacionados ao seu uso. A maioria dos países do Hemisfério Norte, como, Suécia (1974), EUA (1977) e Japão proscreeveram a dipirona do receituário (VALE, 2006), entretanto, esse fármaco continua sendo utilizado em países como Áustria, Bélgica, Itália, Países Baixos, Turquia, Espanha, Rússia, África do Sul e também na América Latina, devido ao seu baixo custo e comprovada eficácia (ROGOSCH *et al.*, 2012).

A dipirona é extraída do alcatrão (anilina) e pertencente à classe das pirazolonas (antipirina, aminopirina, fenilbutazona, oxfenbutazona), sendo ainda classificada no grupo dos analgésicos-anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) (VALE, 2006). Apesar de ser um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) fraco, a dipirona é conhecida por apresentar um potente efeito analgésico e antipirético, sendo, desta forma, indicada para patologias, como, cefaleias, neuralgias e dores reumáticas de fibras musculares lisas (cólica renal, entre outras), pós-operatórias e de outras origens. Também é indicada para febres causadas por quadros em que a utilização do ácido acetilsalicílico (AAS) não é recomendada (FERREIRA, 2013), sendo, desta forma, recomendada para o tratamento dos sintomas da dengue. Atualmente, a dipirona faz parte da lista de medicamentos do programa Farmácia Popular do Ministério da Saúde (PORTAL DA SAÚDE, 2017), existindo no Brasil, pelo menos 125 produtos à base de dipirona, sendo 71 deles associados à outras

substâncias (GUZELLA *et al.*, 2015).

De acordo com especificações técnicas da empresa farmacêutica EMS, a agranulocitose induzida pela dipirona é uma casualidade de origem imuno-alérgica, durável por pelo menos uma semana. É uma reação muito rara e aceitável, porém pode ser grave implicando risco à vida e podendo ocorrer em qualquer momento durante o tratamento. Além desse efeito, a dipirona também pode causar pancitopenia (diminuição de todas as células hematopoéticas), anemia aplásica, reações cutâneas graves, tais como, reações alérgicas idiossincráticas, broncoespasmo, choque anafilático, necrose epidérmica tóxica, hepatite e hipotensão severa. Pode causar ainda, ulcerações gastrintestinais, nefro e hepatopatias, retenção hídrica, eventos trombóticos e comprometimento cardiovascular, entre outros. Segundo Montoya *et al.* (2009), há relatos também a respeito de sua associação com outras manifestações clínicas mais comuns, como, as do tipo infecciosas (amigdalite, faringite, estomatite ou pneumonia).

Segundo Ibáñez *et al.* (2005) em seu trabalho avaliando a agranulocitose associada à dipirona, o risco absoluto desta manifestação clínica nas doses usuais deste medicamento por curtos períodos de tempo é muito baixo; porém, altas doses ou exposição longa a este fármaco, podem representar fatores favoráveis para induzir e potencializar a sensibilização do paciente.

No estudo de Montoya *et al.* (2009), foram analisados 2.547 prontuários no período de seis meses referentes a pacientes monitorados clinicamente durante o tratamento com dipirona sódica. Não se observou no estudo relatos de agranulocitose associada à dipirona, porém, foram encontrados 69 casos de efeitos mais frequentes da dipirona, como comprometimento hematológico, com incidência de 15,9 %, o que foi correspondente a seis casos de leucopenia e cinco de anemia.

No que diz respeito aos efeitos da dipirona em crianças, Magni *et al.* (2011) analisaram o comportamento antitérmico tanto da dipirona, quanto do ibuprofeno. Neste estudo, foi demonstrado que a dose oral única de ibuprofeno foi capaz de proporcionar uma atividade antipirética mais acentuada que a dose oral única de dipirona, a qual se mostrou eficaz, entretanto, levou um período de tempo maior

para exercer a atividade antipirética. O estudo mostrou ainda que ambas as medicações foram bem toleradas pelos pacientes e seguras em curto prazo.

Além dos trabalhos de natureza clínica, vários outros estudos laboratoriais em animais, vegetais, culturas celulares, entre outros, foram realizados com a dipirona. Um destes estudos foi o de Correa *et al.* (2015), no qual avaliaram a função renal e as alterações morfológicas de ratos tratados com dipirona. Foi demonstrado neste trabalho, por meio da análise morfológica comparativa entre o grupo controle e o grupo tratado, que esse fármaco induziu alterações histopatológicas no rim, como, por exemplo: hemorragia glomerular, congestão renal e processo inflamatório. Os autores observaram também que a dipirona apresenta efeito tóxico sobre a função renal uma vez que induz uma alteração nos níveis de uréia, a qual é considerada um marcador renal.

Pamplona *et al.* (2011) em seu trabalho avaliando os efeitos subcrônicos da dipirona na espécie de peixe *Rhamdia quelens* observaram que a exposição a este fármaco induziu efeitos genotóxicos, como evidenciado pelo ensaio cometa e ainda alterações hematológicas, principalmente em eritrócitos e trombócitos, o que pode sugerir uma situação próxima daquela considerada como anemia. Foram observadas ainda alterações histológicas renais nas três concentrações avaliadas, demonstrando áreas de necrose crônica com deposição fibrosa e alterações parenquimais, além de necrose em vasos de grande calibre.

Em um outro estudo, Arkhipchuk *et al.* (2004) avaliaram o efeito da dipirona em uma variedade de grupos taxonômicos (invertebrados das espécies *Ceriodaphnia affinis* e *Hydra attenuata*; vertebrados das espécies *Carpas crucianas*, *Carassius auratus gibelio* e uma planta da espécie *Allium cepa*), no que diz respeito aos seus efeitos tóxicos, genotóxicos e citotóxicos. Em seus resultados os autores verificaram que a dipirona apresentou uma toxicidade aguda em todos os organismos avaliados na concentração de 6,25%, com 100% de mortalidade animal observada entre 1 e 24 h, além de ausência no crescimento das raízes das plantas.

De forma semelhante Rego *et al.* (2015) avaliaram a toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade da dipirona e paracetamol em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* e na espécie de camarão *Artemia salina*. Foi demonstrado neste estudo que tanto a dipirona quanto o paracetamol apresentaram indícios de toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade.

A dipirona também foi avaliada quanto aos seus efeitos genotóxicos e citotóxicos em linhagem de rim de macaco verde africano (VERO). Neste estudo foi observado que este composto apresentou tanto efeitos citotóxicos, evidenciados pelo ensaio do MTT e padrão de morte celular, quanto genotóxicos, constatados pelo ensaio do cometa. Vale ressaltar ainda que o padrão de morte celular encontrado foi predominantemente apoptótico, com baixos níveis necróticos (GOMES, 2016).

Uma vez que vários trabalhos demonstram os efeitos genotóxicos e citotóxicos da dipirona em diferentes modelos experimentais, é interessante a realização de estudos com substâncias que possam promover uma proteção ou ainda amenizar os danos causados por este fármaco, visto que esta substância é amplamente utilizada pela população brasileira e vendida sem prescrição médica, o que pode expor seus usuários a sérios riscos. Neste contexto, um bom candidato a exercer este efeito protetor é o composto homeopático Canova® (CA), que vem apresentando interessante atividade citoprotetora contra os efeitos tóxicos de diferentes compostos químicos, como descrito na literatura (NASCIMENTO *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2012; MATOS *et al.*, 2016).

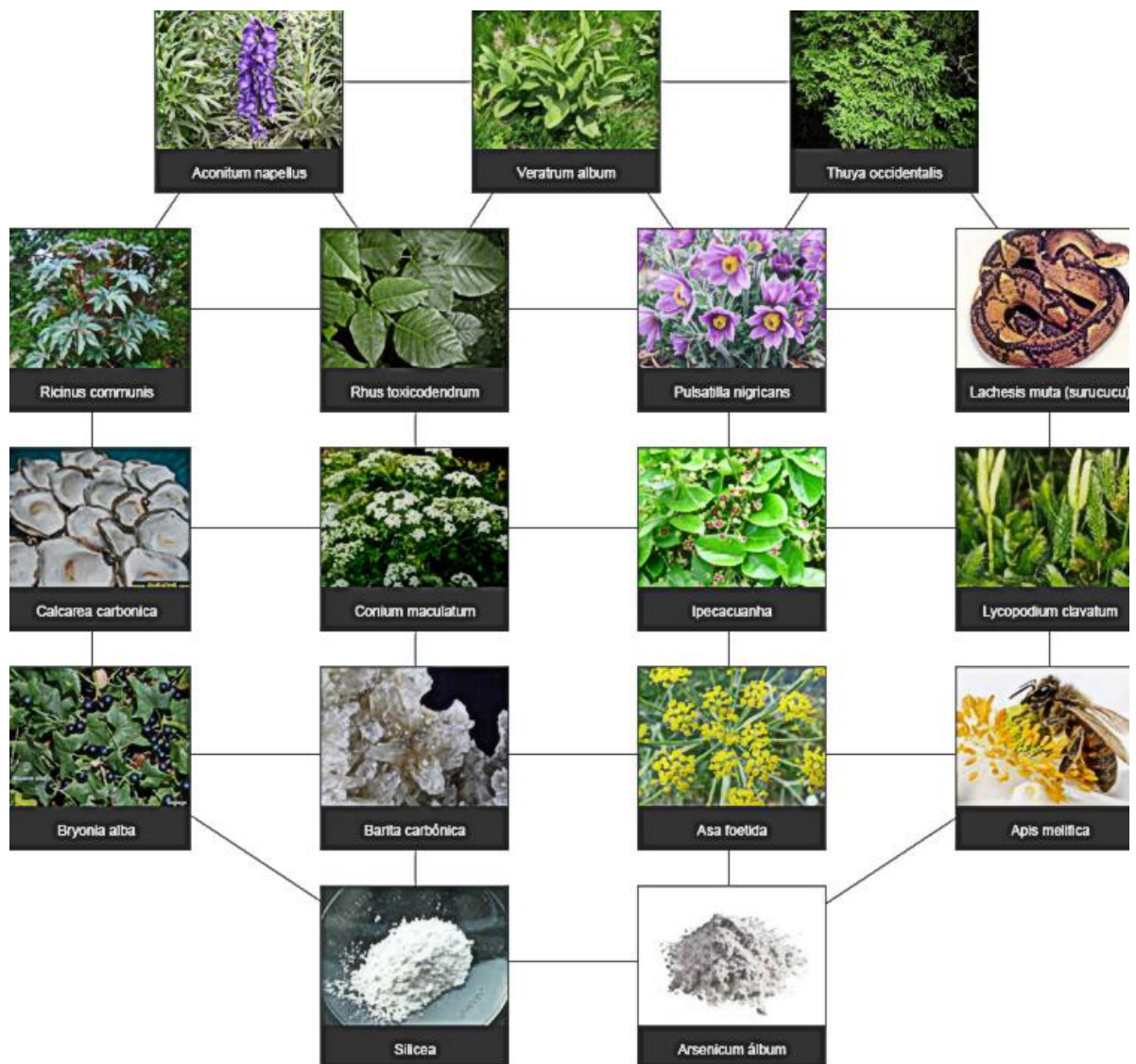
1.3 COMPOSTO HOMEOPÁTICO CANOVA®

Canova® é um composto que vem sendo bastante utilizado no tratamento de pacientes imunodeprimidos e já é prescrito em associação com medicamentos alopáticos usuais. Esta associação proporciona melhoria dos sintomas e, conseqüentemente, da qualidade de vida dos pacientes. Além disso, o CA parece amenizar os efeitos colaterais dos demais medicamentos (CANOVA, 2017).

O CA se encaixa no conceito de medicamento homeopático, pois sua técnica de produção é baseada nos princípios ditados por Hahnemann. Porém, de forma diferente de muitos medicamentos homeopáticos que contém um único componente, o CA possui uma fórmula composta por vários medicamentos homeopáticos (*Aconitum napellus*, *Veratrum album*, *Thuja occidentalis*, *Ricinus comunis*, *Rhus toxicodendrum*, *Pulsatilla nigricans*, *Lachesis muta*, *Calcarea carbonica*, *Conium maculatum*, Ipecacuanha, *Lycopodium clavatum*, *Bryonia alba*, *Barita carbonica*, *Asa foetida*, *Apis mellifica*, *Silicea* e *Arsenicum album*), como pode ser observado na figura 1. Todos esses componentes ajudam a promover um efeito geral mais amplo, o qual vem sendo confirmado tanto em práticas clínicas quanto nas pesquisas científicas de base (CANOVA, 2017).

Desde 1998, a comercialização do medicamento Canova está regulamentada pelo Decreto nº 79.094/77, como Fórmula Magistral. A manipulação e comercialização do medicamento homeopático Canova® está de acordo com o texto descrito na Lei nº 5.991 / 73 que “dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos”. O medicamento Canova® está listado e regulamentado pelo FDA – Food and Drug Administration, dos Estados Unidos, desde seis de maio de 2013 (CANOVA, 2017).

Figura 1 Componentes do medicamento homeopático Canova®.



FONTE: Canova do Brasil (2017)

Moreira *et al.* (2012) observaram que linfócitos cultivados em meio suplementado com macrófagos ativados por CA *in vivo* ou *ex vivo* tiveram um aumento na sua atividade proliferativa em relação aos linfócitos não expostos a tal condição. De forma semelhante, Burbano *et al.* (2009) demonstraram que linfócitos humanos em meio suplementado com macrófagos ativados por Canova, apresentaram um aumento na sua proliferação celular. Esses autores sugerem que CA apresenta potencial para ser utilizado como uma nova terapia adjuvante, uma vez que atua reforçando a própria imunidade do indivíduo.

O CA também foi avaliado quanto aos seus efeitos genotóxicos e citoprotetores em diferentes modelos experimentais. Um destes trabalhos foi o de Nascimento *et al.* (2016), os quais avaliaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos do N-Methyl-Nitrosurea (NMU) quando em associação com CA em linfócitos humanos *in vitro*. Seus resultados mostraram que CA diminuiu significativamente o índice de dano ao DNA (ID), reduzindo ainda o número de células apoptóticas e necróticas. Esses resultados sugerem que CA pode estar atenuando ou protegendo tais células contra os danos causados pelo NMU.

De forma semelhante Matos *et al.* (2016) avaliaram parâmetros bioquímicos, hematológicos e genotóxicos em *Cebus Apella* tratados com NMU por 45 dias, seguido por 30 dias de tratamento com CA. Seus resultados demonstraram que o ID induzido pelo NMU foi reduzido a um nível basal nos animais tratados com CA durante estes 30 dias. Houve também uma redução na taxa de micronúcleos e um aumento na contagem de linfócitos. Esses autores sugeriram que CA pode estar atuando como um modulador de resposta imune e conseqüentemente protegendo estes animais contra a genotoxicidade causada pelo NMU.

Um trabalho que também mostra o envolvimento do CA na modulação imune é o de Feio *et al.* (2014). Tais autores avaliaram a resposta imunológica em animais da espécie *Cebus apella* expostos ao NMU e seguidos pelo tratamento com CA. Seus resultados sugerem que o Canova é capaz de melhorar o sistema imune dos animais aumentando o número de linfócitos T (CD4+) e B e protegendo ainda suas células contra as alterações causadas pelo NMU no ciclo celular. Estes dados demonstram que o CA pode ser bastante útil como um adjuvante na terapia do câncer, podendo reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia.

O efeito protetor do CA em *Cebus apella*, também foi estudado por Leal *et al.* (2012). Neste estudo foram utilizados quatro grupos: um controle sem tratamento, um tratado apenas com ciclofosfamida (CP), um apenas com CA e um co-tratamento com CA e CP. Após um tempo de exposição de 40 dias, os autores observaram que o CA foi capaz de proteger os animais contra os efeitos citotóxicos da CP, uma vez que no grupo co-tratado houve um aumento na contagem de linfócitos, eritrócitos e neutrófilos. Tais contagens foram observados em níveis bem baixos no tratamento

apenas com CP. Nos ensaios de genotoxicidade foi demonstrado que o CA em associação com a CP induziu uma diminuição no índice de dano ao DNA das células destes animais, reduzindo ainda a frequência de micronúcleos.

Estudos demonstrando o efeito antineoplásico do CA também foram realizados. Um destes trabalhos foi o de Sato *et al.* (2005), os quais avaliaram o efeito antineoplásico do CA em sarcomas 180 inoculados em ratos. Constatou-se que no grupo tratado com CA o tumor apresentou uma taxa de crescimento inferior, sendo observado um atraso no surgimento de uma massa tumoral palpável. Vale destacar ainda que neste grupo o tamanho do tumor foi significativamente menor e em 30% dos animais foi observada regressão total da massa tumoral após 20 dias de tratamento. Nas observações histológicas foi percebido um aumento expressivo no número de linfócitos nas adjacências do tumor, bem como um aumento no anel de fibrose. Com base nestes achados e sabendo-se que o sistema imunitário desempenha um papel importante na prevenção do desenvolvimento e controle do crescimento tumoral, os autores sugeriram que o sistema imunológico foi estimulado pelo CA e poderia estar fornecendo uma melhor resposta em relação ao tumor. Esta atividade foi demonstrada por meio da regressão do tumor e por seu isolamento através de uma capsula de tecido fibroso. Desta forma, medicamentos como o CA que fornecem terapia imunológica com base na regulação da defesa antitumor do hospedeiro e sem nenhum efeito colateral, podem ser considerados adjuvantes úteis em terapias anticâncer.

Pereira *et al.* (2004) mostraram que o CA pode modular a atividade de macrófagos na infecção por *Leishmania in vitro*. A partir desse resultado foi realizado um novo estudo *in vivo*, no qual o CA foi administrado por via oral ou subcutânea em ratos por um período de nove semanas com o intuito de controlar a infecção induzida por *L. (L.) amazonensis* em suas patas. O resultado foi a redução das lesões nas patas destes animais em comparação com o grupo controle. Esse estudo também demonstrou que o tratamento com CA diminuiu a carga parasitária, tanto em nível regional (nódulos linfáticos), quanto no baço. Dessa forma, o resultado desse estudo mostra que o CA afeta não apenas os mecanismos de regulação da infecção por *L. (L.) amazonensis*, mas também parece limitar a disseminação do parasita.

Por outro lado, Pupulin *et al.* (2010) avaliaram o efeito do CA em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, porém não obtiveram efeito satisfatório. Para a realização deste estudo, foram utilizados cinco grupos de tratamento: controle infectado e não tratado; infectado e tratado com benzoato (fármaco geralmente utilizado no tratamento contra infecção por *Trypanosoma cruzi*); tratado com CA; co-tratado com benzoato e CA e, por fim, um grupo tratado apenas com o veículo. Foi observado que o co-tratamento com benzoato e CA foi menos eficaz (cura mínima) quando comparado ao grupo tratado com benzoato (cura). Demonstrou-se que o tratamento com CA não suprimiu a parasitemia, levando a morte de 100% dos ratos em um tempo menor que o grupo infectado e não tratado, evidenciando que o CA não apresenta efeito na supressão da infecção por *T. cruzi*.

Cabral *et al.* (2003) analisaram o uso de CA na terapêutica de pacientes oncológicos considerados fora de possibilidade terapêutica e notaram uma considerável melhora clínica com um ganho de peso em mais de 60% dos pacientes após trinta dias de tratamento com o medicamento. Além disso, foi observada uma melhora nos padrões de hemogramas relacionados à anemia e neutropenia e ainda um aumento nos níveis de leucócitos, linfócitos e monócitos.

A literatura mostra ainda que pacientes com HIV tratados com medicamentos antirretrovirais em associação com CA têm sua carga viral diminuída (BERBET *et al.*, 2001). De forma semelhante, Stroparo (2005) observou que após seis meses de tratamento com CA ou CA em associação com antirretrovirais, pacientes com HIV obtiveram melhora no apetite, diminuição da dor, alívio na depressão, diminuição das infecções oportunistas e aumento na contagem de linfócitos CD4 e eritrócitos, sugerindo, portanto, que o CA pode ser considerado uma boa opção no tratamento de soropositivos.

Todos estes estudos mostram que CA apresenta efeitos benéficos incontestáveis (tanto antimutagênicos, quanto anticitotóxicos), facilmente observados em experimentos *in vivo* e *in vitro*, o que reforça seu estudo como um possível candidato a substância citoprotetora contra os efeitos danosos das mais variadas substâncias.

1.4 MUTAGENESE E ANTIMUTAGENESE

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA no processo de divisão celular. De acordo com Gauber *et al.* (2015) o dano ao DNA pode ocorrer com grande frequência no organismo humano e por diferentes motivos. A molécula de DNA pode sofrer lesões espontâneas, devido à instabilidade de suas ligações, em um processo que ocorre normalmente no organismo. Ela também pode sofrer dano como resultado de reações metabólicas endógenas e estresse oxidativo, devido à produção de espécies reativas de oxigênio ou ainda por fontes exógenas como radiações ultravioleta e ionizantes; substratos alimentares, como, por exemplo, alguns conservantes; hábitos pessoais, como, o tabagismo e o alcoolismo; por influência de quimioterápicos e radioterápicos ou ainda por exposição ocupacional, ambiental ou acidental a determinados compostos. Desta forma, Ribeiro *et al.* (2003) concluem que agentes mutagênicos alteram a sequência das bases no DNA, podendo ainda, acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que podem estar associadas ao desenvolvimento de neoplasias.

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e a diversidade das espécies. Muitas mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras, no entanto, podem determinar a morte celular e, por consequência, não são detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorre em genes específicos pode determinar vantagens e um crescimento desordenado das células. Portanto, um composto mutagênico, seria aquele capaz de induzir danos genéticos nas células, enquanto que, compostos antimutagênicos, seriam aqueles que agem de forma inversa, impedindo a formação de mutações causadas por determinados agentes mutagênicos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Neste contexto, sabe-se que existem substâncias naturais ou sintéticas capazes de modular a ação de diversos agentes potencialmente mutagênicos, as quais são genericamente denominadas antimutagênicas. O termo antimutagênese define a redução da frequência ou da taxa de mutações espontâneas ou induzidas,

independentemente do mecanismo envolvido (WATERS *et al.*, 1996).

De acordo com Ferguson (1994) e De Flora (1998), os antimutagênicos podem agir por meio de dois fenômenos, a desmutagênese e a bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, são capazes de inativar um agente mutagênico por ação direta, podendo ser química ou enzimática; ou até mesmo pelo sequestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impedindo sua ligação ao DNA. Por outro lado, os antimutagênicos que agem por meio da bio-antimutagênese atuam como moduladores do reparo e replicação do DNA, agindo em nível celular; podendo, desta forma, inibir possíveis erros dos sistemas de reparo (HARTMAN & SHANKEL, 1990).

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em diferentes modelos experimentais, os quais podem ser empregados para o estudo e identificação dos seus respectivos agentes mutagênicos. Os sistemas celulares de mamíferos, utilizados para a avaliação da mutagenicidade ou antimutagenicidade, abrangem tanto testes *in vitro* quanto *in vivo*. Em qualquer um destes sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, indutores de mutações, e com o antimutagênico, o reversor; pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré ou pós-tratamentos (ANTUNES & ARAUJO, 2000).

A avaliação do potencial mutagênico de vários compostos pode fornecer informações de grande interesse, permitindo, dessa maneira, o conhecimento do risco em potencial à população humana, uma vez que muitas substâncias podem induzir alterações no comportamento normal das células, podendo levar à morte celular e danos oxidativos, entre outros (VIEIRA *et al.*, 2008).

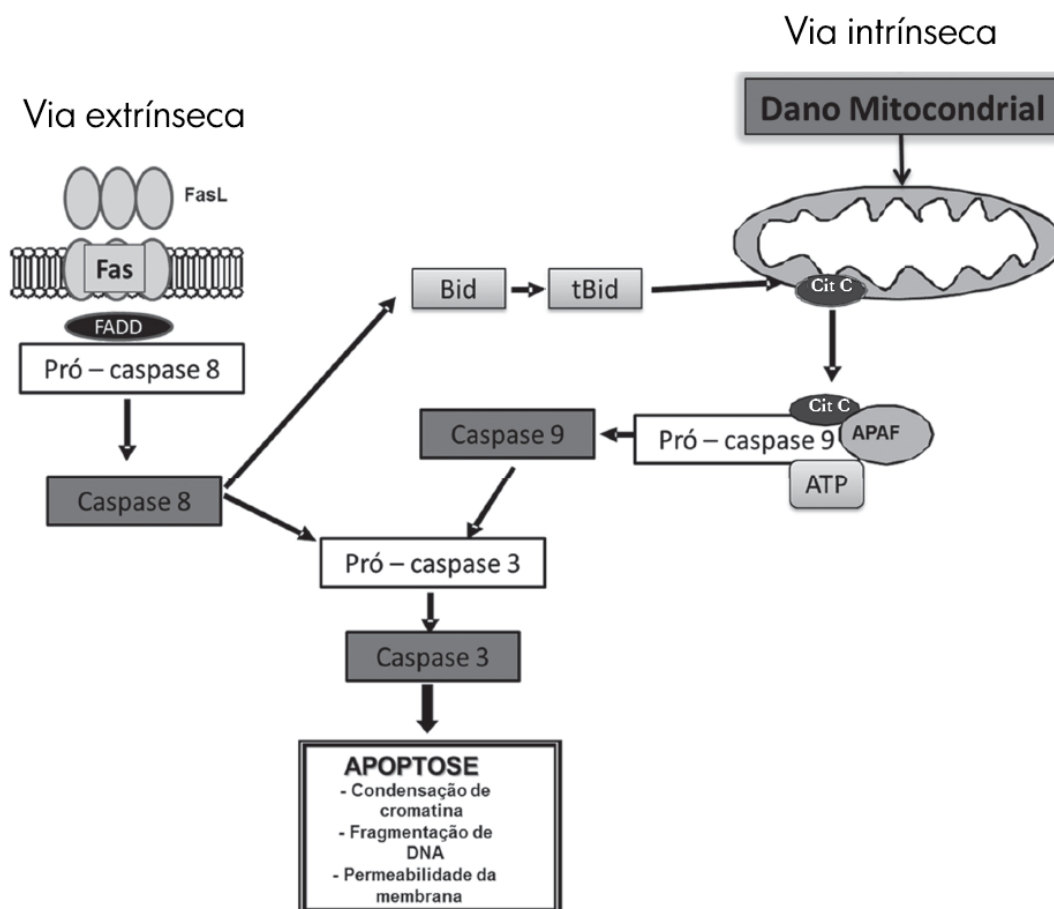
1.5 MORTE CELULAR

A morte celular é um processo que corresponde a uma sucessão de eventos, onde muitas vezes é difícil determinar os fatores que levam à irreversibilidade da lesão, ou seja, muitas vezes é difícil definir como o agente agressor faz com que a célula ultrapasse seu *ponto de não-retorno* (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2013). Se este evento é seguido de autólise e degradação enzimática dos componentes celulares por enzimas lisossomais, ele recebe o nome de necrose. Assim, necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem uma agressão que resulta no aumento do volume celular, condensação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente a ruptura celular. Durante a necrose no organismo vivo, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (GRIVICICH *et al.*, 2007) em decorrência da liberação de moléculas denominadas alarminas, as quais são reconhecidas por receptores celulares, desencadeando o processo inflamatório (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2013).

Outro tipo de morte celular é a apoptose, fenômeno em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam com sua destruição. Diferente da necrose, a célula em apoptose não sofre autólise nem ruptura da membrana citoplasmática, porém é observada uma retração celular, levando a perda da aderência desta célula com a matriz extracelular e com as células adjacentes. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos por membrana. Os prolongamentos da membrana celular aumentam em número e tamanho e se rompem, originando estruturas denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são endocitados por células vizinhas, sem desencadear quimiotaxia nem ativação de células fagocitárias (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2013), o que torna este tipo de morte o preferido na eliminação de células cancerígenas (HAJRA & LIU, 2004).

De acordo com Grivicich *et al.* (2007), diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, como por exemplo: danos ao DNA, níveis aumentados de ROS, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, exposição a drogas citotóxicas, choque térmico, privação de fatores de crescimento, entre outros. Segundo Henriquez *et al.* (2008), tais fatores podem desencadear duas vias apoptóticas (Figura 2), a extrínseca, mediada por receptores de superfície celular e a intrínseca, mediada por danos mitocondriais.

Figura 2 Via extrínseca e intrínseca da apoptose.



FONTE: PEREIRA *et al.*, 2012. Vias extrínsecas e intrínseca da apoptose.

A via extrínseca da apoptose, apresenta como regulador chave, uma proteína denominada caspase-8 (CASP8), a qual é responsável por modular mecanismos de defesa de extrema importância para a célula, como, por exemplo, a hiperproliferação e a tumorigênese. Já na via intrínseca, a principal proteína envolvida é a caspase-9

(CSAP9), a qual é ativada por meio de danos mitocondriais, resultando na liberação da proteína carreadora de elétrons citocromo C. Após liberado no citosol, o citocromo C forma um complexo com a proteína fator de ativação de proteases pró-apoptóticas 1 (APAF-1), o qual irá se ligar a procaspase-9 tornando-a ativa (THEODOROPOULOS *et al.*, 2010). Ambas as vias convergem na utilização das caspases-3 (CASP3), caspase-6 (CASP6) e caspase-7 (CASP7) como caspases efetoras, as quais desencadeiam os eventos típicos do processo, tais como, fragmentação de DNA, condensação da cromatina, entre outros (HAJRA & LIU, 2004; HENRIQUEZ *et al.*, 2008). Entre essas duas vias, está a proteína pró-apoptótica Bid, a qual age como uma molécula de transição entre elas, uma vez que após ser clivada pela caspase-8, induz a translocação de proteínas pró-apoptóticas para a membrana mitocondrial, entre as quais, está a proteína Bax (BILLEN *et al.*, 2008; HENRIQUEZ *et al.*, 2008).

A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular graças ao equilíbrio entre proliferação e morte. A maior importância da apoptose reside no fato de que é este tipo de morte celular a responsável por manter tal equilíbrio (GRIVICICH *et al.*, 2007). Desta forma, alterações neste fenômeno, seja no sentido de induzi-lo, ou bloqueá-lo, podem estar relacionadas a diferentes patologias, desde neoplasias até doenças da imunidade (BOGLIOLO *et al.*, 2013).

Como já discutido anteriormente, vários agentes químicos podem desencadear o processo apoptótico por perturbarem a homeostasia celular. Uma destas substâncias, como já demonstrado por Gomes (2016) é a dipirona sódica, que se apresentou genotóxica e citotóxica em linhagem celular VERO. Assim, o presente trabalho visa avaliar se o medicamento Canova® pode vir a propiciar um efeito citoprotetor em relação aos efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pela dipirona, medicamento amplamente utilizado pela população brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito citoprotetor do composto homeopático Canova® em linhagem celular de rim de macaco verde africano (VERO) exposta ao fármaco dipirona sódica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar o efeito anticitotóxico do Canova® em células VERO co-tratadas com CA e dipirona sódica por meio do ensaio para detecção de apoptose e necrose;
- ❖ Verificar qual via apoptótica está sendo induzida pela dipirona sódica, se a extrínseca ou a intrínseca, e se o co-tratamento com CA apresenta atividade protetora contra este efeito;
- ❖ Avaliar o efeito antígenotóxico do CA em células VERO expostas à dipirona sódica;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGEM CELULAR VERO

A linhagem celular VERO foi primeiramente estabelecida a partir de rim normal de macaco verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*) por Yasumura e Kawakita (1963) na Universidade de Chiba (Japão). Desde então, ela tem sido extensivamente utilizada como substrato celular para vacinas e para estudos de replicação viral. A linhagem VERO utilizada no presente estudo foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas ampolas contendo aproximadamente um milhão de células cada uma. As células foram mantidas em solução de congelamento constituída por 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma ChemicalCo., St. Louis, USA) e 95% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0.1 mg/mL de estreptomicina e 99 U/mL de penicilina. As ampolas foram armazenadas em botijões de nitrogênio líquido por período indeterminado e foram retiradas apenas no momento do descongelamento. Após o descongelamento, as células foram imediatamente transferidas para frascos próprios para cultivo celular com superfície igual a 25 cm², contendo 10 mL de DMEM e 10 % de SBF. Posteriormente, as células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C por 24 horas. Após este período, o meio contendo DMSO foi substituído por um novo meio de cultivo sem DMSO para o melhor crescimento da monocamada celular. Todos os procedimentos envolvendo cultura de células foram realizados em cabine de fluxo laminar.

3.2 CULTIVO DA LINHAGEM CELULAR

As células foram mantidas em estufa de CO₂ 5% à 37°C até que a cultura obtivesse uma boa confluência, ou seja, até que formasse uma monocamada completamente homogênea, o que geralmente ocorria por volta de 72 h após o descongelamento. A confluência celular foi monitorada observando-se o crescimento das células com auxílio de microscópio invertido. Para o subcultivo, o meio de

cultura foi removido e a monocamada lavada duas vezes com 1 mL de solução salina balanceada de Hanks (0,4g de KCl, 0,06g de KH_2PO_4 , 0,04g de Na_2HPO_4 , 0,35g de NaHCO_3 , 1g de glicose, 8g de NaCl, H_2O q.s.p 1000 mL) por aproximadamente 2 min. Após este processo, as células foram dissociadas com 3 mL de tripsina (0,125g de tripsina, 0,02g EDTA diluídos em 100 mL de solução de Hanks) por um período de 3 a 5 min ou até que as células se desprendessem do fundo do frasco de cultivo, sendo possível verificar a soltura em microscópio invertido. Em seguida, a tripsina foi inativada com 3 mL de DMEM suplementado com 10 % de SBF, 0.1 mg/mL de estreptomicina e 99 U/mL de penicilina e a suspensão celular homogeneizada distribuída igualmente para duas garrafas de 25 cm^2 , até que as células obtivessem novamente uma boa confluência. Este procedimento foi novamente repetido até a obtenção de uma quantidade suficiente de células para os experimentos.

3.3 TRATAMENTOS

3.3.1 Canova

O medicamento Canova® (forma líquida) utilizado nos experimentos foi doado pela empresa CANOVA do Brasil. As amostras foram mantidas congeladas, sendo descongeladas somente no momento do uso. Antes da utilização, a solução foi vigorosamente agitada, conforme indicação do fabricante. As concentrações de CA utilizadas no presente trabalho foram definidas de acordo como o trabalho de Seligmann *et al.* (2003).

3.3.2 Dipirona Sódica

Para a realização do presente estudo foram utilizados comprimidos de 500 mg do anti-inflamatório não esteroide dipirona sódica da empresa farmacêutica SEM obtidos comercialmente em farmácias. Para a diluição desta substância foram utilizados dois comprimidos que foram macerados com o auxílio de um pistilo e de um cadinho em 30 mL de água destilada até a obtenção de uma solução homogênea. Em seguida, a dipirona diluída foi filtrada com filtro de seringa estéril para obtenção de uma solução de coloração amarelada. A solução, já estéril, foi

armazenada em tubo de 50 mL a -20 °C. A concentração única de dipirona sódica (5 mM) utilizada no presente estudo foi definida de acordo com os estudos de Gomes (2016).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para análise *in vitro* dos possíveis efeitos citoprotetores do CA foram definidos os seguintes grupos de tratamento:

- ❖ Controle negativo: células cultivadas apenas na presença de meio de cultura DMEM;
- ❖ Dipirona sódica (metamizol sódico): células tratadas com concentração única de 5 mM.
- ❖ Canova: células tratadas com 3 (três) concentrações de CA (4%, 8% e 16%) (v/v);
- ❖ CA + Dipirona sódica (metamizol sódico): células co-tratadas com as 3 (três) concentrações descritas anteriormente de CA e a concentração única de Dipirona sódica (5 mM) (Dipirona sódica + CA 4%, Dipirona sódica + CA 8% e Dipirona sódica + CA 16%). O tratamento com as duas drogas foi realizado simultaneamente.

3.5 AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MEIO DOS CORANTES FLUORESCENTES DIFERENCIAIS IODETO DE PROPÍDIO, FLUORESCEÍNA DIACETATO E HOECHST 33342.

3.5.1 Princípio da técnica

O corante bisbenzidina Hoechst 33342 é permeável às membranas celulares e se une às ligações adenina-timina emitindo fluorescência azul, sendo utilizado para avaliação de ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis. Este corante é frequentemente incubado na presença de substâncias indutoras de apoptose por minutos até horas (KIECHLER & ZHANG, 2002). O Hoechst 33342 é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais da apoptose, período em que a membrana citoplasmática ainda encontra-se íntegra e impermeável a outro corante fluorescente denominado iodeto de propídio (IP). Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células, marcando-as em vermelho. Desta forma, a combinação do Hoechst 33342 com o IP tem sido intensamente utilizada para a diferenciação dos estágios de apoptose e necrose. Pode-se também adicionar o corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca em verde células com membrana celular intacta. Assim, as células são avaliadas de acordo com a coloração e morfologia, sendo que as marcadas com citoplasma verde e núcleo azul intacto são consideradas viáveis; as com núcleo azul condensado ou fragmentado ou núcleo vermelho condensado ou fragmentado são classificadas como apoptóticas e, por fim, as com núcleo intacto vermelho são identificadas como necróticas (HASHIMOTO *et al.*, 2003).

3.5.2 Procedimento experimental

Para este ensaio, $0,5 \times 10^6$ células foram cultivadas em 2 mL de meio DMEM em placas de cultura de 6 poços por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas por 24 e 48 h conforme descrito no item 3.4. Após o tratamento, o meio foi transferido para tubos de 15 mL, uma vez que as células apoptóticas se desprendem com facilidade do fundo da garrafa. Em seguida, as células na placa de cultivo foram lavadas com 2 mL de Hanks e o sobrenadante também transferido para o tubo

juntamente com o meio de cultura. Após essa etapa, as células foram dissociadas com 1 mL de tripsina com o intuito de desprendê-las do fundo da placa. Na sequência, a tripsina foi inativada com a adição do conteúdo do tubo, o qual foi homogeneizado em seus respectivos poços e novamente transferido para o tubo, o qual foi posteriormente levado para centrifugação por 5 min à 1000 rpm. Após este processo, o sobrenadante foi descartado, deixando aproximadamente 300 µL de meio para a ressuspensão das células. Um volume de 100 µL da suspensão celular foi transferido para tubos de microcentrífuga e, em seguida, foram adicionados a estes tubos 7 µL da solução com os três corantes (foram preparados 100 µL da solução corante: 25 µL de Iodeto de propídio [PI] 1mg/ml diluído em água destilada + 50 µL de Fluoresceína diacetato [DAF] 1,5 mg/mL diluído em DMSO + 10 µL de Hoeschst 33342 [HO] 1mg/mL diluído em água destilada + 15 µL de PBS [pH= 8,0]). Após o acréscimo do corante, as células foram levadas ao banho-maria à 37° C por 5 min. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas acrescentando-se 100 µL de amostra em cada uma, as quais foram cobertas posteriormente com lamínulas. Após este processo, as lâminas foram levadas imediatamente para quantificação em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41 com filtro triplo (DAPI, FITC e TRITC). Foram avaliadas 300 células/grupo de tratamento. As células foram classificadas em viáveis, apoptóticas e necróticas.

3.6 ENSAIO DE IMUNOCITOQUÍMICA

3.6.1 Princípio da técnica

A imunocitoquímica é um ensaio baseado na reação entre um antígeno, ou seja, uma proteína ou qualquer outra molécula de interesse e um anticorpo, o qual se apresenta conjugado com uma molécula fluorescente denominada fluorocromo, composto este que absorve luz em um determinado comprimento de onda e emite em outro maior. Um dos fluorocromos mais utilizados é o isotiocianato de fluoresceína (FITC), de cor verde, com absorção em 490 nm e emissão em 520 nm. A visualização e análise dos resultados obtidos por esta técnica, são realizadas por meio de microscópio de fluorescência ou confocal.

3.6.2 Procedimento Experimental e Análise das Lâminas

3.6.2.1 Fixação das Células

Para esta técnica foram semeadas $0,005 \times 10^6$ células/200 μL meio em lâminas com 8 poços (sistema BD). Após 20 h de cultivo, as células foram tratadas por 24 h como descrito anteriormente. Passado o tempo de tratamento, as células foram lavadas três vezes com 100 μL de PBS 1X e então fixadas por 20 min em 100 μL de paraformaldeído 4 %.

3.6.2.2 Permeabilização, Bloqueio e Incubação com o Anticorpo Primário

Foram realizadas 3 lavagens com PBS 1X, sendo uma rápida e duas com agitação por 15 min. Após este processo, as células foram permeabilizadas com 100 μL de Triton X-100 0,5 % + DMSO 1 % + Normal Goat Serum 5 % em câmara úmida por 10 min em TA em leve agitação. Em seguida, a solução de permeabilização foi removida e as células bloqueadas com solução de BSA 5 % por 50 min em leve agitação. Após o bloqueio, as células foram incubadas com 100 μL de anticorpo primário 1:200 (CASP 8 – 8CSP03/sc-56070-mouse monoclonal IgG; CASP 9 – p10 F-7/sc-17784-mouse monoclonal IgG_{2a} e Citocromo C – 2G8/sc-65396-mouse monoclonal IgG) em câmara úmida, protegido da luz à 4 °C de um dia para o outro. Vale ressaltar que o controle da técnica incubado com solução de permeabilização (Triton X-100 0,5 % + DMSO 1 % + Normal Goat Serum 5 %) também foi realizado.

3.6.2.3 Incubação com o anticorpo secundário, contra-coloração e desmontagem das lâminas

No segundo dia, o anticorpo primário foi removido e então foram realizadas três lavagens com BSA 5 %, sendo uma rápida e duas de 20 min em leve agitação. Em sequência, foi realizada a incubação com 100 μL de anticorpo secundário 1:100 (Anti-Mouse IgG-Fab specific-FITC/SIGMA-Aldrich) em câmara úmida, protegido da luz por um período de 2 h à 4 °C. Passada a incubação com o anticorpo secundário, foram realizadas quatro lavagens com PBS 1X, sendo uma rápida e três de 20 min em leve agitação, ressaltando que essas lavagens foram realizadas protegidas da

luz, uma vez que o anticorpo secundário é conjugado com o fluorocromo (FITC). Após as lavagens, foi realizada uma contra-coloração com 100 µL de DAPI (1:10.000) por 2 min em baixa luminosidade. Após esse processo, o DAPI foi removido e foi realizada uma lavagem com PBS 1X por 10 min em leve agitação e protegida da luz. Posteriormente, as lâminas foram desmontadas como indica o fabricante. Por fim, as lâminas foram deixadas secar protegidas da luz de um dia para o outro e então levadas para análise em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRITC. A captura e a análise das imagens foram realizadas pelo programa “Applied Spectral Imaging”. Análises qualitativas, com captura de imagens e análises quantitativas com a contagem de 100 células/grupo de tratamento foram analisadas, sendo que nesta última, as células foram distinguidas entre marcadas e não marcadas.

3.7 ENSAIO DO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

3.7.1 Princípio da Técnica

Esta técnica foi desenvolvida por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, modificada por Anderson *et al.* (1994). Corresponde a um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no DNA (quebra de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas) induzidos por compostos genotóxicos e mutagênicos. Partindo-se do pressuposto de que o DNA encontra-se fortemente compactado dentro do núcleo, formando alças de 5-200 Kpb, as quais se encontram aderidas a uma rede protéica ou matriz nuclear (RAZIN *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2002); se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, sendo maior e mais pesado que o restante dos componentes ocupará um espaço no gel, o qual era anteriormente preenchido pela célula e será retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo denominada nucleóide (COOK; BRAZELL, 1976). Desta forma, o nucleóide é por definição, uma série de alças super enoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual do tamanho do núcleo da célula. Portanto, caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofrerá mudanças, uma vez que as alças de DNA se desenovelam,

tornando-se mais frouxas e formando um halo (VOGELSTEIN *et al.*, 1980).

3.7.2 Procedimento Experimental

3.7.2.1 Preparação das lâminas

As lâminas foram previamente cobertas em solução de agarose (ponto de fusão normal - 1,5 %). Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão na segunda camada de agarose (baixo ponto de fusão - 0,8 %), na qual a amostra foi diluída. Após 3 h de tratamento (23 h de cultura), foram coletados 450 µL de amostra de cada grupo e, em seguida, foi feita uma centrifugação a 1000 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando-se 30 µL para a ressuspensão. Deste conteúdo, 15 µL foram acrescentados em 300 µL de agarose de baixo ponto de fusão, sendo, em seguida, homogeneizado. Subsequentemente, 100 µL deste conteúdo foram aplicados rapidamente sobre cada lâmina contendo agarose e, em seguida, cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas a 4 °C por 5 min até a solidificação da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas cuidadosamente, mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 e 10 % DMSO; pH: 10) e mantidas a 4 °C protegidas da luz.

3.7.2.2 Eletroforese

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

mergulhadas rapidamente em H₂O destilada gelada (4°C) para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese, sendo, em seguida, transferidas para um novo mergulho em H₂O destilada gelada por 5 min para a neutralização.

3.7.2.3 Coloração

As lâminas foram fixadas com etanol a 100% por 3 min e posteriormente coradas com 50 µL de solução de Brometo de Etídio (20 µg/mL). Em seguida, foram cobertas com lamínula (24 X 60 mm) para a realização das análises.

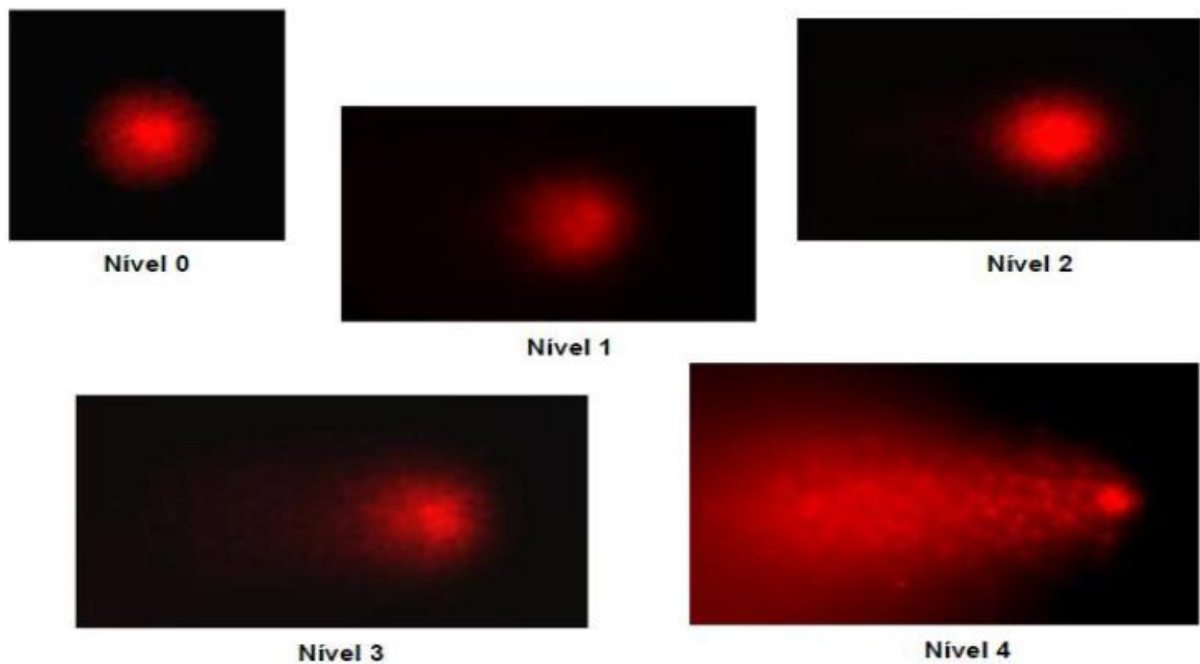
3.7.2.4 Análise das Lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC). O sistema de captura e a análise da imagem foram realizados pelo programa “Applied Spectral Imaging”. A análise foi realizada segundo o padrão de escores (Figura 3), em que, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa (halo), podem ser obtidas cinco categorias (0 - 4), levando-se em consideração a percentagem de DNA na cauda do cometa, o que irá indicar o grau de lesão sofrido pela célula.

- 0 = sem danos (< 5 %)
- 1 = baixo nível de danos (5 – 20 %)
- 2 = médio nível de danos (20 – 40 %)
- 3 = alto nível de danos (40 - 95 %)
- 4 = dano total (≥ 95%)

O índice de dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível pelo escore ao qual ela se enquadra (0, 1, 2, 3 ou 4), somando esses valores, e por fim, o resultado obtido deverá ser dividido por 100, o que corresponde ao total de células analisadas

Figura 3 Micrografia da classificação de scores do ensaio cometa.



FONTE: MOTA *et al.*, 2011. Legenda: Classificação visual dos danos, representados em uma escala de 0-4, sugeridos por Collins *et al* (1997). Imagens de cometas (a partir de linfócitos), coradas com Brometo de Etídio

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

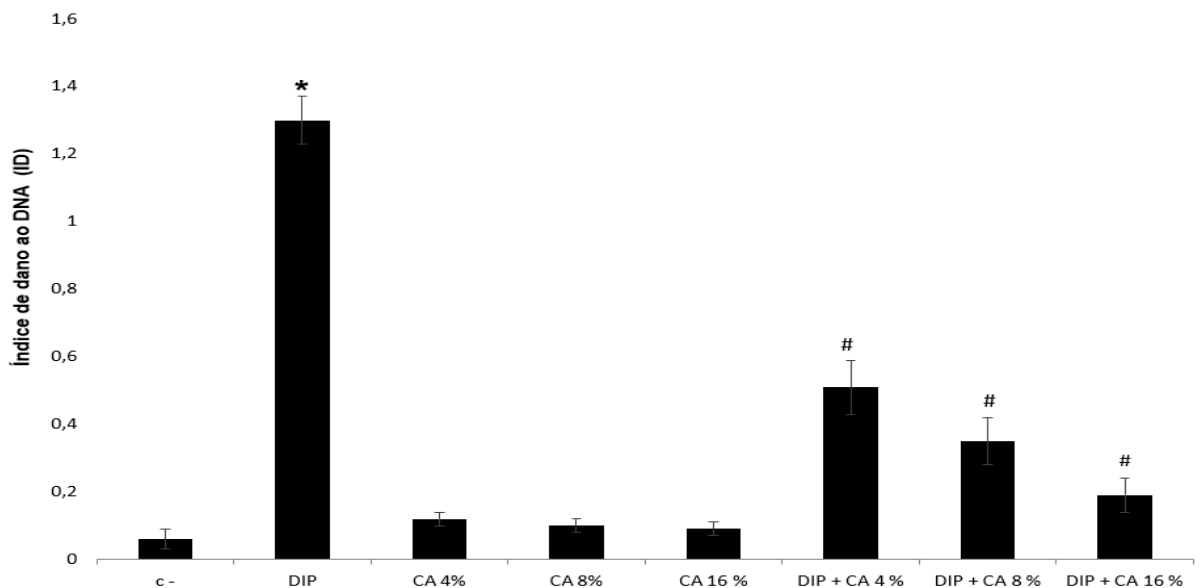
Para a comparação das frequências dos vários parâmetros, os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste Tukey do programa BIOESTAT 5.0 (AYRES *et al*, 2007). Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO ANTIGENOTÓXICO DO CANOVA EM CÉLULAS VERO TRATADAS COM DIPIRONA E ANALISADAS PELO ENSAIO COMETA

Após três horas de tratamento com as substâncias em estudo foi observado que a dipirona induziu um aumento significativo ($p < 0,01$) no índice de dano ao DNA das células em estudo quando comparada ao controle. Quando o co-tratamento com CA e DIP foi realizado, observou-se que o CA induziu uma redução estatisticamente significativa no ID destas células em todas as concentrações avaliadas e de forma dependente da concentração. Desta forma, podemos perceber que a dipirona apresentou efeitos genotóxicos na linhagem estudada e que o CA foi capaz de proteger tais células contra estes efeitos (Figura 4).

Figura 4 Efeito do co-tratamento DIP + CA em células VERO analisadas pelo ensaio do cometa.

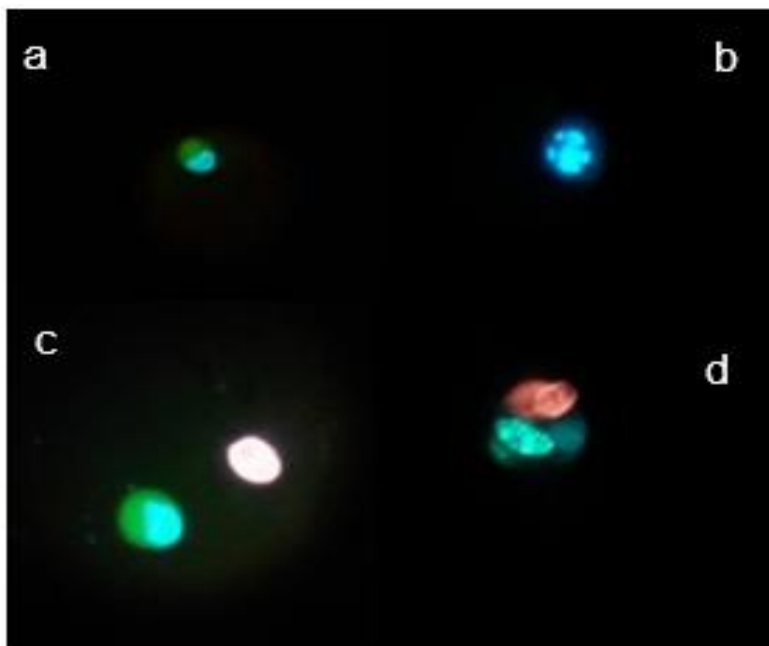


FONTE: Autor. Legenda: Média de três experimentos. * $p < 0,01$ (em relação ao controle negativo) # $p < 0,01$ (em relação à dipirona).

5.2 EFEITO ANTICITOTÓXICO DO CANOVA EM CÉLULAS VERO TRATADAS COM DIPIRONA E AVALIADAS PELO TESTE DE APOPTOSE E NECROSE

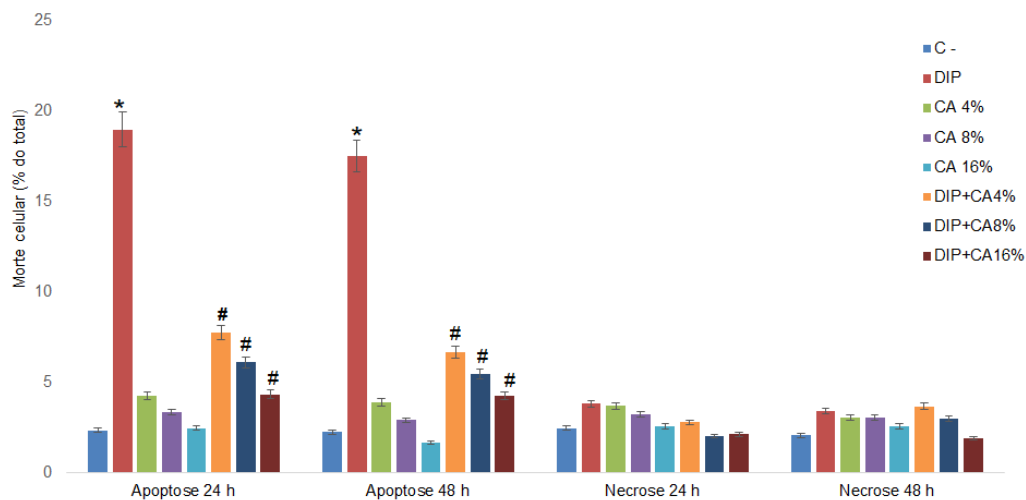
A avaliação da morte celular (Figura 5) após os diferentes tratamentos mostrou que tanto em 24 quanto em 48 h houve um aumento significativo ($p < 0,01$) no número de células apoptóticas no grupo exposto à dipirona, quando comparado ao controle negativo. Quanto ao co-tratamento observou-se uma redução dose-dependente estatisticamente significativa nas três concentrações de CA ($p < 0,01$). O tratamento somente com CA nas três concentrações testadas não induziu apoptose. No que diz respeito à necrose, não foi observado morte celular no grupo exposto à dipirona sódica (Figura 6).

Figura 5 Micrografia de células da linhagem VERO durante a realização do ensaio de Apoptose por marcação fluorescente.



FONTE: Acervo do Autor. Legenda: Em (a), célula normal corada com Hoechst 33342 (HO) que se liga ao DNA corando o núcleo em azul e com Fluoresceína Diacetato (DAF) corando o citoplasma em verde. Em (b), célula em apoptose corada em azul (DAF) e com a formação de corpos apoptóticos. Em (c), célula normal e célula necrótica corada pelo iodeto de propídio em vermelho. Em (d), célula apoptótica e célula necrótica.

Figura 6. Efeito citoprotetor do CA em células VERO no que diz respeito à frequência de morte celular induzida pela dipirona após 24 e 48 h de exposição.

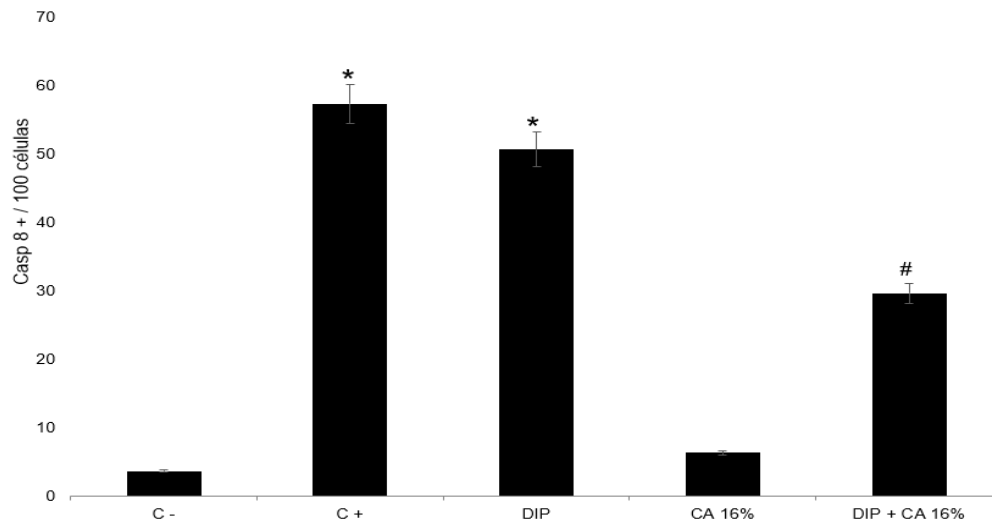


FONTE: Autor. Legenda: Média de três experimentos. * $p < 0,01$ (em relação ao controle negativo). # $p < 0,01$ (em relação à dipirona).

5.3 EFEITO DO CA NA EXPRESSÃO DE CASP8, CASP9 E CITOCROMO C EM CÉLULAS VERO EXPOSTAS À DIPIRONA E ANALISADAS PELO ENSAIO DE IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA

Após 24 h de tratamento com dipirona, foi observado que a linhagem VERO apresentou um aumento significativo de células marcadas para CASP 8 em relação ao controle negativo ($p < 0,01$). Efeito semelhante foi encontrado no tratamento com doxorrubicina, a qual foi utilizada como controle positivo ($p < 0,01$). Porém, quando essas células foram expostas simultaneamente à dipirona e CA, observou-se uma redução significativa na quantidade de células marcadas ($p < 0,01$) (Figura 7).

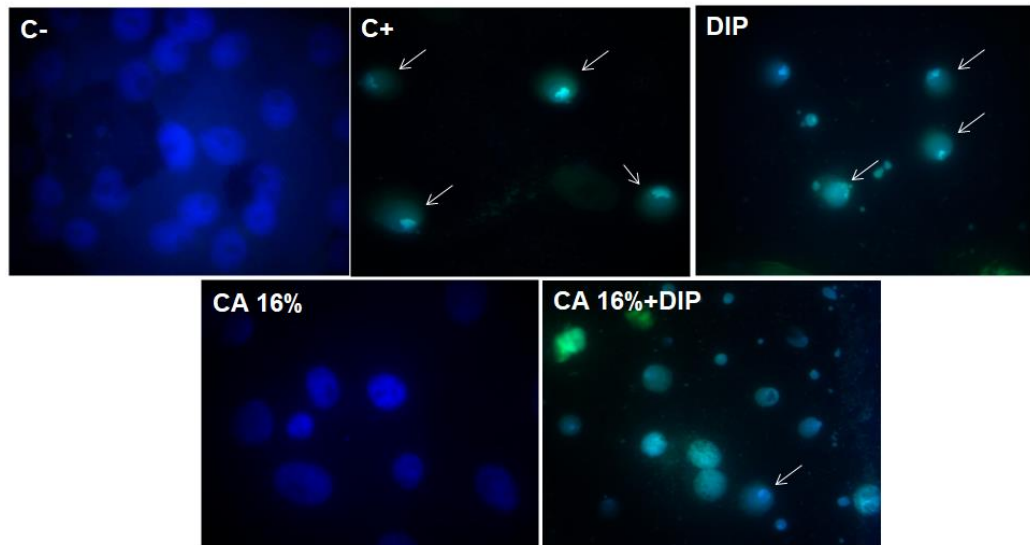
Figura 7 Efeito do CA na expressão de CASP 8 em células VERO expostas à dipirona e analisadas pelo ensaio de imunocitoquímica.



FONTE: Autor. Legenda: Média de três experimentos. * $p < 0,01$ (em relação ao controle negativo). # $p < 0,01$ (em relação à dipirona). 100 células foram analisadas em cada concentração.

Os dados quantitativos mostrados acima estão de acordo com os qualitativos (Figura 8), uma vez que o número de células marcadas após a exposição com dipirona e doxorrubicina foi maior que o observado em células não expostas. Em relação ao co-tratamento, também foi observada uma redução clara de células marcadas.

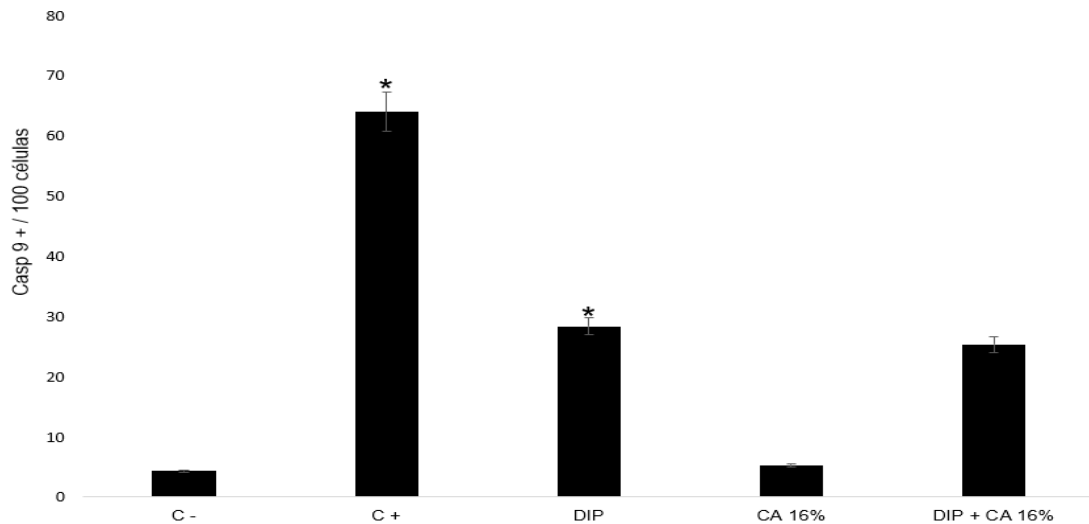
Figura 8 Micrografia de fluorescência mostrando a expressão de CASP 8 em células VERO expostas ao CA durante o ensaio de imunocitoquímica.



FONTE: Autor. Legenda: Fotomicrografia de células VERO obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do CA na expressão da CASP 8 após 24 h de tratamento. As setas indicam marcação positiva em verde.

A dipirone também elevou significativamente a quantidade de células marcadas para CASP 9 em relação ao controle negativo ($p < 0,01$). No entanto, no que diz respeito ao co-tratamento, não foi observada redução de células expressando esta proteína em relação à dipirone. O tratamento com doxorrubicina, também induziu um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$) na expressão de CASP 9 em relação ao controle negativo (Figura 9).

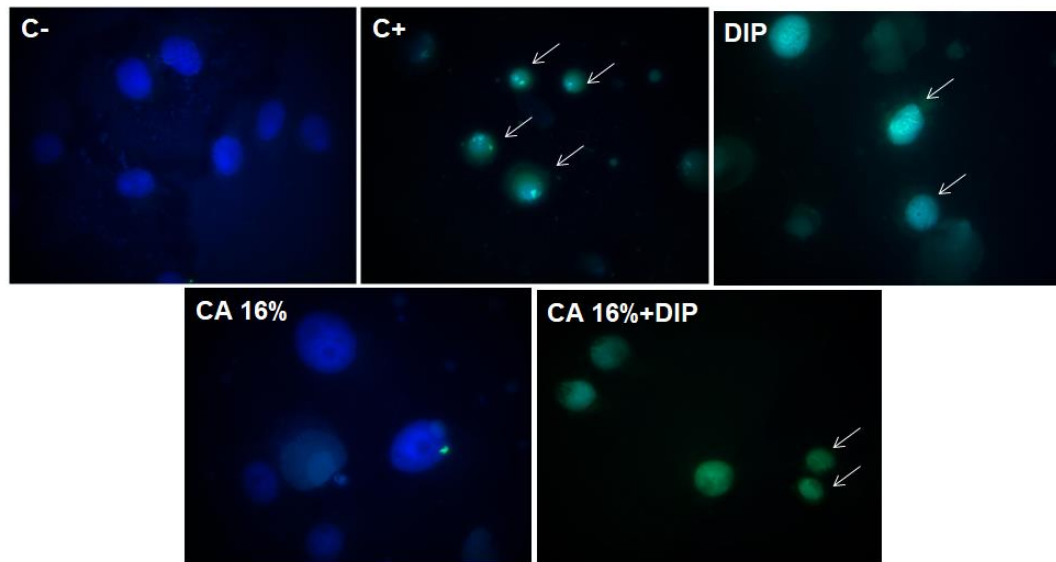
Figura 9 Efeito do CA na expressão de CASP 9 em células VERO expostas à dipirona e analisadas pelo ensaio de imunocitoquímica.



FONTE: Autor. Legenda: Média de três experimentos. * $p < 0,01$ (em relação ao controle negativo). 100 células foram analisadas em cada concentração.

Quando comparamos os dados da figura 9 com os resultados qualitativos é possível perceber que eles se correlacionam, uma vez que se pode observar um número maior de células marcadas para CASP 9 nos grupos expostos à dipirona e à doxorrubicina em relação ao controle negativo. No que diz respeito ao co-tratamento, também, foi observada correlação com os dados quantitativos, uma vez que não observamos uma redução significativa de células marcadas (Figura 10).

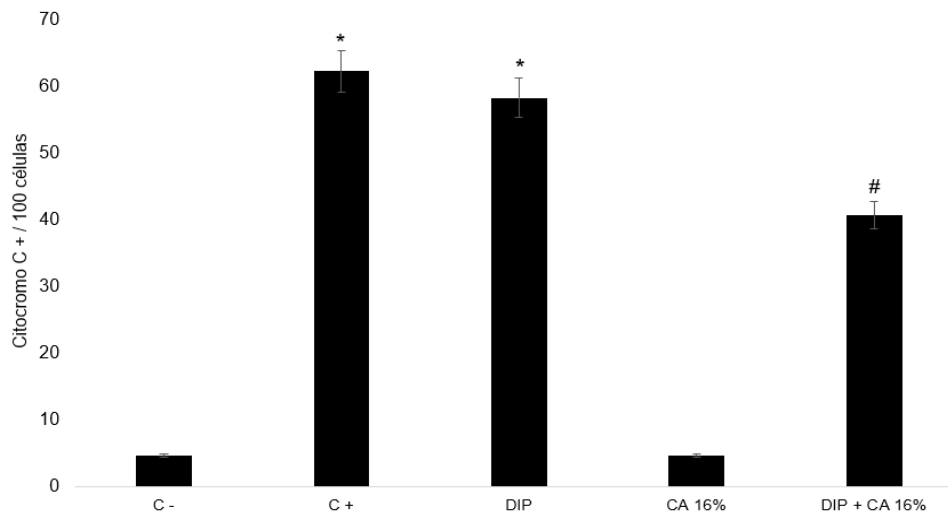
Figura 10 Micrografia de fluorescência mostrando a expressão de CASP 9 em células VERO expostas ao CA durante o ensaio de imunocitoquímica.



FONTE: AUTOR. Legenda: Fotomicrografia de células VERO obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do CA na expressão da CASP 9 após 24 h de tratamento. As setas indicam marcação positiva em verde.

Quanto ao efeito do CA na expressão de Citocromo C das células em estudo, observou-se um aumento significativo de células expressando esta proteína no grupo exposto à dipirone em relação ao controle negativo ($p < 0,01$). Em contrapartida, quando as células foram co-tratadas com dipirone e canova, observou-se uma redução estatisticamente significativa deste efeito ($p < 0,01$), demonstrando, portanto, que CA foi capaz de diminuir a expressão de citocromo C nas células VERO tratadas com dipirone (Figura 11).

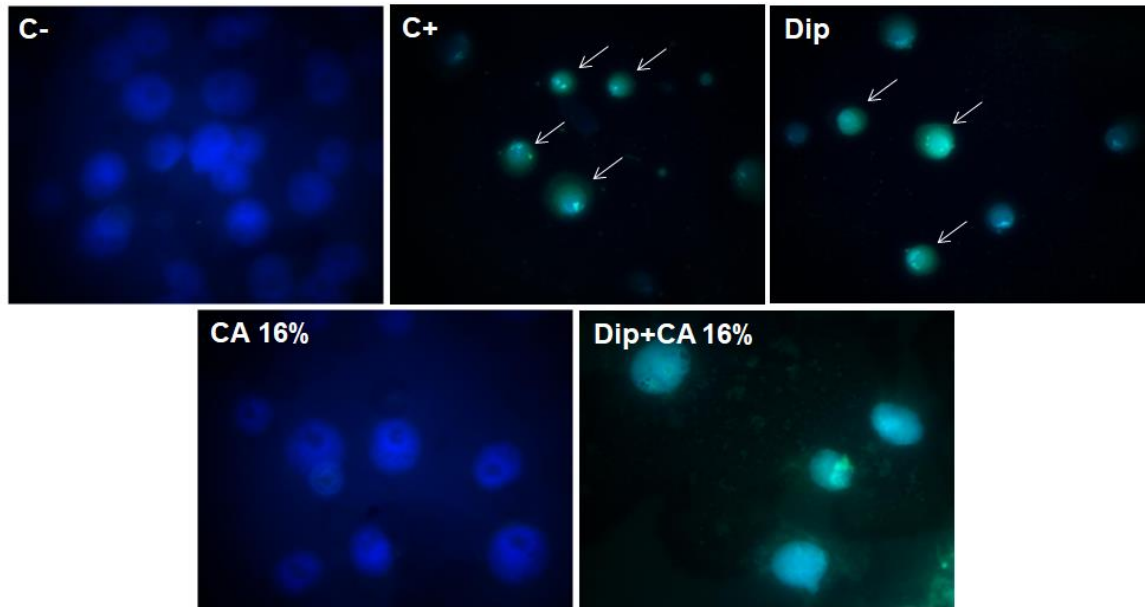
Figura 11 Efeito do CA na expressão de Citocromo C em células VERO expostas à dipirona e analisadas pelo ensaio de imunocitoquímica.



FONTE: Autor. Legenda: Média de três experimentos. * $p < 0,01$ (em relação ao controle negativo). # $p < 0,01$ (em relação à dipirona). 100 células foram analisadas em cada concentração.

Os dados quantitativos mostrados acima estão de acordo com os qualitativos (Figura 12), uma vez que o número de células marcadas após a exposição com o fármaco dipirona e com a doxorrubicina foi maior que o observado em células não expostas. No que se refere ao co-tratamento podemos observar uma redução no número de células marcadas quando comparadas ao tratamento com dipirona.

Figura 12 Micrografia de fluorescência mostrando a expressão de Citocromo C em células VERO expostas ao CA durante o ensaio de imunocitoquímica.



Fotomicrografia de células VERO obtidas no presente estudo por imunocitoquímica de fluorescência, mostrando o efeito do CA na expressão da CIT C após 24 h de tratamento. As setas indicam marcação positiva em verde.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários compostos têm sido testados como potenciais terapias adjuvantes para proteger tecidos saudáveis contra os efeitos tóxicos da radiação, de drogas anticâncer, de substâncias cancerígenas presentes no ambiente, dentre outras. Estas novas terapias podem servir como quimioprotetores contra a toxicidade de agentes antineoplásicos, sem comprometer a eficácia do tratamento, ou como imunomoduladores, substâncias que modificam a imunidade de um indivíduo para favorecer uma resposta imune específica. Isto pode proporcionar uma melhoria na qualidade de vida durante o tratamento com agentes anti-neoplásicos (FEIO *et al.*, 2014). Neste sentido, o presente trabalho buscou investigar se o composto homeopático Canova® tem a capacidade de atuar como protetor dos danos celulares induzidos pelo fármaco dipirona.

Quando as células VERO foram expostas à dipirona e analisadas pelo ensaio cometa, observou-se um aumento significativo no ID ao DNA das mesmas. Entretanto, quando tais células foram co-tratadas com dipirona e CA, observou-se claramente uma redução de forma dependente da concentração no ID ao DNA destas células, ou seja, um claro efeito antígeno-tóxico foi observado em nossas condições experimentais (Figura 5).

Nossos resultados estão de acordo com Gomes (2016) que demonstrou por meio do ensaio cometa que a dipirona também induz danos ao DNA de células VERO. Os efeitos genotóxicos da dipirona também foram avaliados em outros modelos experimentais, como pode ser observado no estudo de Pamplona *et al.* (2011), os quais utilizaram como modelo de estudo, uma espécie de peixe nativo, denominado Jundiá. Em seus resultados foi demonstrado que a dipirona induziu genotoxicidade nestes animais, até mesmo em baixas concentrações, o que corrobora os achados no presente estudo. Outro trabalho que demonstra o efeito genotóxico da dipirona é o de Arkhipchuk *et al.* (2004), os quais utilizaram vários modelos experimentais (plantas, vertebrados e invertebrados), afim de avaliar a genotoxicidade e a citotoxicidade da dipirona e do AAS. Seus resultados mostraram que tanto a dipirona quanto o AAS foram genotóxicos em todos os modelos utilizados.

No presente trabalho não foi observado efeito genotóxico no grupo tratado apenas com CA. Tais resultados estão de acordo com Seligmann *et al.* (2003), os quais observaram que o CA não apresentou efeito genotóxico em linfócitos humanos, resultado este observado por meio de análises de alterações cromossômicas numéricas e estruturais.

O efeito anti-genotóxico do CA foi também observado por outros autores em outros modelos experimentais. Por exemplo, Nascimento *et al.* (2016) demonstraram que o CA reduz significativamente o ID ao DNA de linfócitos humanos expostos ao NMU. Matos *et al.* (2016) demonstraram em seu trabalho que o CA induz uma redução no ID ao DNA e na frequência de micronúcleos em macacos da espécie *Cebus Apella* expostos ao NMU. Tais autores sugerem que o CA possa estar modulando a resposta imune e, conseqüentemente, protegendo esses animais contra a genotoxicidade do NMU. Leal *et al.* (2012) também demonstraram o efeito protetor do CA em *Cebus apela*, porém, diferente de Matos *et al.* (2016) que expôs os animais ao NMU, tais autores expuseram os animais à ciclofosfamida. Seus resultados mostraram que CA foi capaz de proteger os animais contra os efeitos genotóxicos da ciclofosfamida, uma vez que houve uma diminuição no ID ao DNA e na frequência de micronúcleos das células destes animais quando tratados com esta droga.

Apesar da caracterização dos efeitos antigenotóxicos do CA ser difícil, uma vez que são escassos os trabalhos que avaliem tais efeitos, existe na literatura algumas evidências de que o tratamento com CA ativa genes de proteínas citoprotetoras, como o gene Hsp70-1, em macrófagos de camundongos (DE OLIVEIRA *et al.* 2008). Este gene pertence a família das *heat shock proteins* e, segundo uma hipótese de Calini *et al.* (2003), sua translocação para o núcleo, durante o estresse, poderia colaborar para estabilização da estrutura da cromatina, prevenindo que a mesma sofresse dano. É possível que ação semelhante possa ter ocorrido em nossos experimentos, o que explicaria a diminuição do ID observado nas células tratadas simultaneamente com CA e dipirona. No entanto, experimentos adicionais de expressão proteica e de topografia computacional de proteínas seriam necessários para confirmar esta hipótese em nossos experimentos.

No que diz respeito ao ensaio de morte celular, nossos resultados demonstraram um aumento significativo na percentagem de apoptose nas células expostas à dipirona (Figura 6). Estes dados estão coerentes com o trabalho de Gomes (2016) que demonstrou que a dipirona induz morte celular por apoptose em células VERO. A citotoxicidade da dipirona também foi avaliada através do ensaio *Alium cepa* nos estudos de Rego *et al.* (2015), os quais observaram uma diminuição no índice mitótico destas células quando expostas à dipirona.

A apoptose induzida pela dipirona diminuiu significativamente quando as células foram co-tratadas simultaneamente com CA (Figura 6). Tais resultados corroboram os estudos de Nascimento *et al.* (2016), os quais demonstraram em seu trabalho avaliando os possíveis efeitos anticitotóxicos e antigenotóxicos do CA em linfócitos humanos expostos ao NMU, que CA reduziu significativamente a percentagem de células apoptóticas em sua maior concentração (CA 16% + NMU).

Vale destacar ainda que no presente estudo foi observada ausência de citotoxicidade nas células expostas somente ao CA, o que corrobora os achados de Seligmann *et al.* (2003), os quais demonstraram que o CA não é citotóxico em linfócitos humanos.

São inexistentes na literatura estudos que avaliem os efeitos citoprotetores do CA em nosso modelo experimental e, como já observado, ainda são escassos trabalhos que estudem a citoproteção em outros modelos. Entretanto, é possível encontrar trabalhos que avaliem a citoproteção de componentes isolados de CA. Por exemplo, Kundu *et al.* (2000) avaliaram a eficácia da droga homeopática *Arsenicum Album* na redução de efeitos citotóxicos em ratos expostos ao trióxido de arsênico e demonstraram em seus resultados que este fármaco homeopático foi ativo contra a intoxicação sub-letal por arsênico, além de ser capaz de modificar favoravelmente os efeitos tóxicos, genotóxicos e citotóxicos produzidos por este composto.

Outro trabalho neste sentido é o de Datta *et al.* (1999) que avaliaram a eficácia do fármaco homeopático *Arsenicum Album-30* (Ars Alb) na redução dos efeitos genotóxicos produzidos pelo trióxido de arsênio em camundongos. Tais autores, observaram que o medicamento homeopático mostrou capacidade de

proteção contra os danos causados por actinomicina-D (usado como controle positivo) e trióxido de arsênio quando injetados individualmente.

Samadder *et al.* (2013) avaliaram o efeito do extrato de *Pulsatilla nigricans* em células de testículos de ratos expostas ao arsênio. Esses autores observaram um aumento nos níveis de todos os biomarcadores apoptóticos e de toxicidade levando ao dano celular e dano ao DNA nos camundongos intoxicados com tal substância. Interessantemente, este efeito foi inibido ou revertido de forma significativa quando as células foram tratadas com o extrato em questão. Dessa forma, foi possível concluir que o extrato de *Pulsatilla nigricans* apresenta potenciais anti-apoptóticos e capacidade de reparar e proteger as células em estudo de danos ao DNA induzidos pelo arsênio.

Abbas *et al.* (2018) avaliaram a citotoxicidade, mutagenicidade e atividade antioxidante de várias partes da planta *Ricinus communis* em células sanguíneas humanas e bovinas. Tais autores observaram que os extratos mostraram atividade antioxidante variável de acordo com as diferentes partes da planta e com os métodos de extração e ainda que os extratos metanólicos de *R. communis* protegeram as células contra danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta.

Guimarães *et al.* (2010) avaliaram as propriedades anticâncer *in vitro* e *in vivo* do complexo derivado de *Calcareo carbonica* (M8) em um modelo de melanoma murino e mostraram uma redução no número de nódulos e no volume tumorais em após o tratamento com o referido complexo. M8 é composto por *Calcareo carbonica*, *Aconitum napellus*, *Arsenicum album*, *Asa foetida*, *Conium maculatum*, *Ipecacuanha*, *Phosphorus*, *Rhus tox*, *Silicea*, *Sulphur* e *Thuya occidentalis*. Com exceção de *Phosphorus* e *Sulphur*, todos os outros componentes estão presentes na formulação do CA. Os autores sugerem o uso de M8 como terapia promissora para melhorar a resposta imune inata contra células tumorais, diminuindo a adesão celular, a invasão de células malignas ou mesmo induzindo latência direta em neoplasias malignas.

Observou-se no presente estudo que o tratamento das células com dipirona, aumentou de forma significativa a expressão de CASP 8, CASP 9 e citocromo C, o

que corrobora nossos achados de morte celular e reafirma que este fármaco induz apoptose em células VERO, tanto pela via extrínseca, constatada pelo aumento na expressão de CASP 8, quanto pela via intrínseca, devido ao aumento na expressão de CASP 9 e citocromo C. No que se refere ao co-tratamento foi observado que o CA diminuiu significativamente a expressão da CASP 8 (Figuras 7 e 8) e citocromo C (Figuras 11 e 12).

Como já citado anteriormente, a exposição ao CA é capaz de induzir a transcrição de vários genes citoprotetores. Além do Hsp70-1, foi verificado que o CA pode induzir a expressão dos genes GADD45 β e HO-1 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). O gene GADD45 β é um gene anti-apoptótico (DE SMAELE *et al.*, 2001) implicado em sinalização de estresse em resposta a estímulos fisiológicos ou ambientais. Experimentos com células HeLa demonstraram que a proteína deste gene se liga e amplifica os efeitos de Bcl-xl, impedindo a saída de citocromo C da mitocôndria e, conseqüentemente, impedindo a apoptose (SMITH E MOCARSKI, 2005). Tais resultados estão de acordo com a redução da expressão de citocromo C observada no co-tratamento CA16%+dipirona (Figuras 11 e 12).

A diminuição da expressão de CASP 8, também observada no co-tratamento CA16%+dipirona (Figuras 7 e 8), pode estar relacionada com a expressão de HO-1 pelo CA. HO-1 e seus produtos são expressos após estresse físico e químico e apresentam efeitos anti-oxidativos, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios (BAUER *et al.*, 2008). Em um experimento utilizando células epiteliais de cristalino humano, Ma *et al.* (2016) verificaram que a expressão de HO-1 foi capaz de diminuir a expressão de CASP 8 e CASP 3 induzidas por H₂O₂, reduzindo assim, a frequência de apoptose nestas células, da mesma forma que verificado em nossos experimentos. No entanto, o papel dos genes GADD45 β e HO-1 no efeito anti-apoptótico induzido pelo CA também requer confirmação por outras técnicas.

Os resultados do presente estudo mantem abertas e amplificam as possibilidades para futuros usos do CA já demonstradas inicialmente por Nascimeto *et al.* (2016). O presente trabalho reforça a ideia de que, além de atuar como um excelente imunomodulador, o CA tem excelente potencial como citoprotetor, uma

vez que reduz significativamente os danos ao DNA e a apoptose induzidos pelo medicamento dipirona.

7 CONCLUSÃO

- A dipirona induz danos ao DNA de células VERO;
- A dipirona induz morte por apoptose em células VERO;
- O CA não induz danos ao DNA de células VERO;
- O CA não induz morte celular por apoptose;
- O CA protege células VERO contra os efeitos genotóxicos induzidos pela dipirona;
- O CA protege células VERO contra os efeitos citotóxicos induzidos pela dipirona.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; ALI, A.; ARSHAD, M.; ATTA, A.; MEHMOOD, Z.; TAHIR, I. M.; IQBAL, M.; Mutagenicity cytotoxic and antioxidante activities of *Ricinus communis* diferent parts. **Chemistry Central Journal**, **12**:3.Pakistan, 2018.
- ALDRIGHI, J. M.; FONSECA, A. M. DA.; ALDRIGHI, A.P.S.; Automedicação; **Rev. Assoc. Med. Bras.**, **47** (4): São Paulo Oct. /Dec. 2001.
- ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J. & SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res**, **307**: 261-271. 1994.
- ANTUNES, L.M.G.; ARAUJO, M.C.P.; Mutagenicity And Antimutagenicity Of The Main Food Colorings. **Rev. Nutr.**, **13**(2): 81-88, Campinas, 2000.
- ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitaria; Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/bulario-eletronico1>; Acessado em 22 de Fevereiro de 2017;
- ARKHIPCHUK, V. V.; V. V. GONCHARUK,¹ V. P. CHERNYKH,² L. N. MALOSHTAN² AND I. S. GRITSENKO.; Use of a Complex Approach for Assessment of Metamizole Sodium and Acetylsalicylic Acid Toxicity, Genotoxicity and Cytotoxicity; **JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY**, **24**, 401–407 (2004).
- AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. M & DOS SANTOS, A. S. **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém Pará, 2007.
- BAUER, M.; HUSE, K.; SETTMACHER, U.; CLAUS, R.A.; The heme oxygenase-carbon monoxide system: regulation and role in stress response and organ failure. **Intensive Care Med**. **34**, 640-648. 2008.
- BERTONCELLO, K. C. G.; XAVIER, L. B.; DO NASCIMENTO, E. R. P.; LÚCIA NAZARETH AMANTEA; Acute Pain in Emergency: Evaluation and Control through MacCaffery and Beebe Instrument; **J Health Sci.**; **18**(4):251-6, 2016.
- BERBET, A. A.; CASTANHEIRA, P. T.; FELIÚ, D. G. G.; JORGE, A. C.; JUNTA, M. L.; Estudo Clínico Multicêntrico de Pacientes com HIV/Aids submetidos a Tratamento com o Imunomodulador Canova, Associado com Medicamentos Antiretrovirais. 2001.
- BILLEN, L. P.; SHAMAS-DIN, A. & ANDREWS, D. W.; Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, **27** (Suppl 1): S93 - 104. 2008.
- BRASILEIRO FILHO, G.; Bogliolo patologia geral. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.
- BURBANO, R. R.; LEAL, M. F.; COSTA, J. B.; BAHIA, M. O.; LIMA, P. D. L.;

KHAYAT, A. S.; SELIGMAN, I. C.; ASSUMPÇÃO, P. P.; BUCHI, D. F.; SMITH, M. A. C.; Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova; **Homeopathy** **98**, 45–48; 2009.

CABRAL, M.P.; Estudo clínico para avaliação do Imunomodulador Canova® na terapêutica de pacientes oncológicos considerados FPT — Fora de Possibilidade Terapêutica; Soffritti, EM; Nader, JR. Fundação Amor — Entidade Filantrópica de Combate a Dor do Câncer, Juiz de Fora MG; 2003.

CAETANO, N. Guia de Remédios. 7. ed. São Paulo: **Escala**; 2005.

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

CANOVA DO BRASIL; Medicamentos;
<http://canovado brasil.com.br/medicamentos.html>; Acessado em: 14/08/2017.

CAVALCANTI, I.L.; CANTINHO, F.A.DE.F.; ASSAD, A.; MEDICINA PERIOPERATORIA (cap 126. Desmestificando o uso da Dipirona); **SAERJ**; Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro: 2006.

CORREA, B.S.; CAMPANINI, C. A.; PAIVA, L. C. M.; SILVA, R. N. DA.; MALFARA, W. R.; CRISCI, W. R. M.; Evaluation of Renal Function and Morphological Changes in rats Treated with Dipyrone in Different Dosing; **J Health Sci**; **18**(1):28-32; 2016.

DATTA, S.; MALLICK, P.; KHUDA BUKHSH, A. R.; Efficacy of a potentized homoeopathic drug (Arsenicum Album-30) in reducing genotoxic effects produced by arsenic trioxide in mice: II. Comparative efficacy of an antibiotic, actinomycin D alone and in combination with either of two microdoses. **Complementary Theropfesin Medicine**, **7**, 156-163. Índia, 1999. Harcourt PublishersLtd

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res**, **402**, p. 151-158, 1998.

DE OLIVEIRA, C. C.; DE OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L. M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. DE F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**; **52**, 420–432. 2008.

DE OLIVEIRA, C.C.; DE OLIVEIRA, S.M.; GOES, V.M.; PROBST.M.C.; KRIEGER, M.A.; BUCHI, D. DE FREITAS.; Gene Expression Profiling of Macrophages Following Mice Treatment With an Immunomodulator Medication; **Journal of Cellular Biochemistry** **104**:1364–1377. 2008.

DE SMAELE, E.; ZAZZERONI, F.; PAPA, S.; NGUYEN, DU.; JIN, J.; JONES, J.; CONG, R.; FRANZOSO, G.; Induction of gadd45- beta by NF-kappa-B downregulates pro-apoptotic JNK signaling. **Nature** **414**(6861):308–313. 2001.

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

ESSENTIAL MEDICINES AND HEALTH PRODUCTS
http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/en/. Acessado em 24/05/2017;

FEIO, D. C. A.; MUNIZ, J. A. P. C.; MONTENEGRO, R. C.; BURBANO, R. R.; JUNIOR, L. C. DE B.; LIMA, P. D. L.; Evaluation of the Immunological Cellular Response of *Cebus apella* Exposed to the Carcinogen *N*-Methyl-*N*-nitrosourea and Treated with CANOVA®. **in vivo** **28:** 837-842; 2014.

FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Res.**, **307**, p. 395-410, 1994.

FERREIRA, R. M.; IÁSBECK, A. M. M.; FIALHO, S. M.; VARGAS, A. M. P.; ZATTI, R. A.; FRANCO, A. J.; Qualidade De Medicamentos Isentos De Prescrição: Um Estudo Com Marcas De Dipirona Sódica Comercializadas Em Drogarias De Viçosa - Mg; **Anais V SIMPAC - 5** - n. 1; p. 511-518. 2013.

FERREIRA, T. R. & LOPES, L. C. Analysis of analgesic, antipyretic, and nonsteroidal anti-inflammatory drug use in pediatric prescriptions; **J Pediatría** ;**92(1):**81---87, Rio de Janeiro: 2015.

GAUBER, M.A.; MOURA, E.I.; CHAMMAR, R.; Radiometric markers of dna damage: possible targets and current status. **REV MED** 46-56. SÃO PAULO, 2015.

GEOFREY, B.; SMITH&EDWARD, S.; MOCARSKI.; Contribution of GADD45 Family Members to Cell Death Suppression by Cellular Bcl-xL and Cytomegalovirus vMIA. **Journal of virology - 79**, p.14923–14932. No. 23. Dec. 2005.

GOMES, L. M.; Avaliação *In Vitro* Dos Efeitos Genotóxicos e Citotóxicos Do Fármaco Dipirona Sódica (Metamizol Sodium) em Linhagem De Rim De Macaco Verde Africano (Vero); Dissertação – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará. Belém, 2016.

GOULART, I. DA. CRUZ.; CESAR, J. A.; CHICA-GONZALEZ, D.A.; NEUMANN, N.A.; Self-medication of children aged under five years in municipalities in the States of Pará and Piauí: prevalence and associated factors. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, **12 (2):** 165-172 abr. / jun., Recife: 2012.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A.B.; Morte celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**; **53(3):** 335-343. 2007.

GUIMARÃES, F. S. F.; ANDRADE, L. F.; MARTINS, S. T.; ABUD, A. P. R.; SENE, R. V.; WANDERER, C.; TISCORNIA, T. BOLLATI-FOGOLÍN, M.; BUCHI, D.; TRINDADE, E. S.; In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcarea carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model . **BMC Cancer - 10:**113. 2010.

GUZELLA, M. V. V. M.; DE SOUZA, M. P.; ANTUNES, L. B.; DIAS, R. X. L.; JUNIOR, P. C. T. C.; Incidência de agranulocitose devido ao uso de dipirona na América Latina; **Revista de Ciências**, **6**, No 3. 2015.

HAJRA, K. M. & LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, **9**: 691 - 704. 2004.

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Envir. and Molec. Mutagenesis**, **15**, p. 145-182, 1990.

HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A.; KAWAMURA, J.; KAWABE, A.; KAGANOI, J. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator activated receptor γ in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, **9**: 2239–2246. 2003.

HENRIQUEZ, M.; ARMISEN, R.; STUTZIN, A.; QUEST, A.F.G.; Cell Death by Necrosis, a Regulated Way to Go. Current Molecular Medicine. **Bentham Science Publishers Ltd.** **8**, 187-206. 2008.

IBÁÑES, L.; VIDAL, X.; BALLARÍN, E.; LAPORTE, J.R.; Laporte. Agranulocytosis associated with dipyrone (metamizol). **Eur J Clin Pharmacol** **60**: 821–829 DOI 10.1007/s00228-004-0836-y. 2005.

KIECHLER, F.L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, **326**: 27–45. 2002.

KUNDU, S. N.; K. MITRA.; KHUDA BUKHSH, A. R.; Efficacy of a potentized homeopathic drug (Arsenicum-Album-30) in reducing cytotoxic effects produced by arsenic trioxide in mice: IV. Pathological changes, protein profiles, and content of DNA and RNA. **Complementary Therapies in Medicine**, **8**, 157–165, 2000.

LEAL, M. F.; ANTUNES, L. M. G.; LAMARÃO, M. F. V.; SILVA, C. E. A.; SILVA, I. D. C. G.; ASSUMPÇÃO, P. P.; ANDRADE, E. F.; REZENDE, A. P.; IMBELONI, A. A.; MUNIZ, J. A. P. C.; PINTO, G. R.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.; The protective effect of Canova homeopathic medicine in cyclophosphamide-treated non-human primates; **Food and Chemical Toxicology**, **50**. 4412–4420; 2012.

MAGNI, A.M.; SCHEFFER, D.K.; BRUNIERA, B.; Antipyretic effect of ibuprofen and dipyrone in febrile children; **Jornal da Pediatria**; **01**. 36; 2011.

MATOS, L. A.; ALCÂNTARA, D. F. A.; SOUSA, J. M. C.; RIBEIRO, H. F.; LEAL, M. F. MUNIZ, J. A. P. C.; IMBELONI, A. A.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.; BAHIA, M. O.; Evaluation of the Biochemical, Hematological and Genotoxic Parameters of *Cebus Apella* Treated with N-MethylNitrosurea (NMU) Followed by Treatment with a Complex Homeopathic Compound (Canova); **JBT Journal of biotherapy**; **8**-29; 2016.

MONTOYA, G. A.; VACA, C.; PARRA, M. F.; Detección de efectos secundarios asociados a la administración de tramadol y dipirona en un hospital de alta complejidad; **Biomédica**; **29**:369-81. 2009.

MOREIRA, C. O. C.; COSTA, J. F. F. B.; LEAL, M. F.; ANDRADE, E. F.; REZENDE, A. P.; IMPELONI, A. A.; MUNIZ, J. A. P. C.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.; ASSUMPÇÃO, P. P.; Lymphocyte proliferation stimulated by activated *Cebus apella* macrophages treated with a complex homeopathic immune response modifiers; **Homeopathy**. **101**, 74e79; 2012.

MOTA, T.C.; CARDOSO, P.C.; GOMES, L.M.; VIEIRA, P.C.; CORRÊA, R.M.; SANTANA, P.D.; MIRANDA, M.S.;BURBANO, R.M.; BAHIA ,M.O. In vitro Evaluation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Artesunate, An Antimalarial Drug, in Human Lymphocytes. **Environ Mol Mutagen**. **52(7)**:590-4. 2011.

NASCIMENTO, H. F. S.; CARDOSO, P. C. S. C.; RIBEIRO, H. F.; MOTA, T. C.; GOMES, L. M.; KHAYAT, A. S.; GUIMARAES, A. C.; AMORIM, M. I. M.; BURBANO, R. R.; BAHIA, M. O.; In vitro assessment of anticytotoxic and antigenotoxic effects of CANOVA; **Homeopathy**. **105**, 265e269; 2016.

OLIVEIRA JR, J. O & NOGUEIRA M. N.; Dor em Geriatria. In: Netto MP & Brito FC (eds) **Urgências em Geriatria**, **34**:419,2001.

OLIVEIRA JR, J. O.; Dor oncológica. In: Kowalski LA et al (eds). Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. Fundação Antonio Prudente Hospital A.C. Camargo. 49, 1996.

OLIVEIRA,M. A.; FRANCISCO, P. M. S. B.; KAREN SARMENTO COSTA, K. S.; BARROS, M. B. A.; Self-medication in the elderly population of Campinas, São Paulo State, Brazil: prevalence and associated factor; **Cad. Saúde Pública**, **28** (2):335-345, Rio de Janeiro, 2012.

PAMPLONA, J. H.; OBA, E. T.; SILVA, T. A.; RAMOS, L. P.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; ZAMPRONIO, A. R.; ASSIS, H. C. S.; Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelens*; **Ecotoxicology and Environmental Safety**; **74**. 342–349; 2011.

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. The British Infection Society. **Elsevier Ltd.**; **09**.009. 2004.

PORTAL DA SAUDE SUS. BELEM-PA: 2017 Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/17/Lista-medicamentos-redepropria-usuario.pdf>; (Acessado em 16/02/2017).

PRADO, M.A.M.B.DO.; FRANCISCO, P.M.S.B.; BASTOS, F.T.; BARROS, M.B.A. DE.; Use of prescription drugs and self-medication among men. **REV BRAS EPIDEMIOL**. **19(3)**: 594-608. 2016.

PUPULIN, A. R. T.; ARAUJO, S. M.; TOLEDO, M. J. T.; GOMES, M. L.; TAKEJIMA, E.; CUMAN, R. K. N.; AMADO, C. A. B.; Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*; **Experimental Parasitology**

126. 435–440, 2010.

RAZIN, S. V.; GROMOVA, I. I. & IAROVAIA, O. V. Specificity and Functional Significance of DNA Interaction with the Nuclear Matrix: new approaches to clarify the old questions. **Int Rev Cytol.** **162 B:** 405 - 48. 1995.

REGO, S. C.; MATA, A. M. O.; ROSA, M. S. P. S.; ALENCAR, V. O. B.; JUNIOR, A. L. G.; ARARUNA, A. A.; PAZ, M. F. C. J.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; Evaluation of toxicity, cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of dipyrone and acetaminophen on root meristem cells of *Allium cepa*; **Boletim Informativo Geum**, **6**, n. 2, p. 7-14, abr./jun. 2015.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K.; MUTAGÊNSE AMBIENTAL. Canoas: Editora **Ulbra**. 2003.

ROGOSCH, T.; SINNING, C.; PODLEWSKI, A.; WATZER, B.; SCHLOSBERG, J.; LICHTMAN, A. H.; CASCIO, M. G.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V.; NUSING, R.; IMMING, P.; Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). **Bioorg Med Chem.** **20**(1), p.101-107, 2012.

SAMADDER, A.; DAS, J.; DAS, S.; DAS, D.; DE, A.; BHADRA, K.; KHUDA-BAKSH, A. R.; Dihydroxy-isosteviol methyl ester OF *Pulsatilla nigricans* extract reduces arsenic – induced DNA damage in testis cells of male mice: its toxicity, drug-DNA interaction and signaling cascades.; **Journal Chinese Integrative Medicine**, V 10, N 12, CHINA, 2013.

SATO, D.Y.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C. C.;MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D.; Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. Homeopathy; **The Faculty of Homeopathy.** **94**(1):26-32. 2005.

SELIGMANN, I. C.; LIMA, P. D. L.; CARDOSO, P. C. S.; KHAYAT, A. S.; BAHIA, M. O.; BUCHI, D. DE. F.; CABRAL, I. R.; BURBANO, R. R.; The anticancer homeopathic composite “Canova Method” is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. **Genetics and Molecular Research** **2** (2): 223-228 (2003) **Genetics and Molecular Research** **2** (2): 223-228. 2003.

SILVA, J. A. C.; GOMES, A. L.; OLIVEIRA, J. P. S.; SASAKI, Y. A.; MAIA, B. T. B.; ABREU, B. M.; Prevalence of self-medication and associated factors among patients of a University Health Center; **Rev Bras Clin Med.** **11**(1):27-30, São Paulo, 2013.

SINGH, M. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. & SCHNEIDER P. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA in Individual Cells. **Exp. Cell Res.****175:** 184-191. 1988.

SOTERIO, K. A.; SANTOS, M. A.; A Automedicação No Brasil E A Importância Do Farmacêutico Na Orientação Do Uso Racional De Medicamentos De Venda Livre: Uma Revisão; Acadêmica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia; Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 2016.

STROPARO, E.; Pacientes hiv/aids+ tratados com o medicamento homeopático canova: estudo prospectivo observacional em índices laboratoriais, clínicos e de qualidade de vida. **2005**.

THEODOROPOULOS, G. E.; MICHALOPOULOS, N. V.; PANOUSSOPOULOS, S. G.; TAKA, S. & GAZOULI, M. Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumor characteristics. **Pancreas**, **39**: 976 - 80. 2010.

VIEIRA, M. P.; Estudo Do Potencial Mutagênico E Antimutagênico Da *Solanum Paniculatum* L. Pelo Teste Do Micronúcleo Em Camundongos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2008.

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

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A., BROCKMAN, H.E., DE FLORA S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.109-129, 1996.