

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GISLAINE JANAINA FALKOWSKI TEMPORINI

Medicamentos altamente diluídos promovem regulação imunológica e efeito protetor na fisiopatologia de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Maringá
2017

GISLAINE JANAINA FALKOWSKI TEMPORINI

Medicamentos altamente diluídos promovem regulação imunológica e efeito protetor na fisiopatologia de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor (a) em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Silvana Marques de Araújo

Maringá
2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

GISLAINE JANAINA FALKOWSKI TEMPORINI

Medicamentos altamente diluídos promovem regulação imunológica e efeito protetor na fisiopatologia de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Silvana M. de Araújo
Universidade Estadual de Maringá DBS/UEM

Prof^ª. Dr^ª. Denise L. Aleixo
Universidade Centro Universitário de Maringá - Unicesumar

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana N. Ferraz
Universidade Estadual de Maringá – Lepac/UEM

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Falavigna Guilherme
Universidade Estadual de Maringá – DBS/UEM

Prof^ª. Dr^ª. Tatiane França Perles de Mello
Universidade Estadual de Maringá – DBS/EUM

Aprovada em: 23/03/2017

Local de defesa: sala 1, bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho a Deus, *“Porque tudo vem de Ti, e a tua mão to damos”* I Crônicas 29:14

AGRADECIMENTOS

Ao DEUS presente em minha vida, ao meu amigo e fiel companheiro, o DEUS DA MINHA SALVAÇÃO, que com grande amor tem cuidado da minha vida, me mostrando o caminho a ser percorrido e por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida.

A meu esposo que com muito carinho, paciência, companheirismo tem me compreendido na falta de tempo e pelo grande apoio que não me tem faltado.

Ao meu Filho Victor, pelo seu sorriso sincero e singelo que me incentiva sempre.

Aos meus pais e irmãos que me apoiaram.

O meu mais profundo agradecimento à Prof.^a Dr.^a. Silvana Marques de Araújo, minha orientadora que se tornou uma querida amiga, que me conduziu neste percurso de aperfeiçoamentos e aprendizados com paciência, confiança, dedicação, carinho, força e extrema compreensão, pois além de ser uma excelente pesquisadora, sua gentileza está expressa em atos de demonstrações de carinho e compreensão nos momentos difíceis que passamos ao longo da jornada desta vida. Sil, você foi muito mais do que uma orientadora, foi uma grande amiga que tem me dado muitos conselhos e me ensinado muito. A você, minha eterna gratidão.

Aos professores e técnicos do laboratório de Parasitologia, compartilhando dos seus conhecimentos intelectuais, indispensáveis para minha formação acadêmica.

Aos Homeopatas clínicos, Nelson Roberto Pala, Luiz Gilson Esper, Terezinha Barion, por compartilhar seus conhecimentos, auxiliando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de doutorado e do laboratório, Ana Teston, Andréia, Angela, Franciele, Camila, Carina, Carolina, Denise, Érika, Fabiana, Larissa, Neide, Paula, Patrícia, pelo auxílio nos experimentos, convivência e companheirismo ao longo do desenvolvimento do trabalho e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do mesmo.

EPÍGRAFE

“Quem é injusto, seja injusto ainda; e quem é sujo, seja sujo ainda; e quem é justo, seja justificado ainda; e quem é santo, seja santificado ainda. E, eis que cedo venho, e o meu galardão está comigo, para dar a cada um segundo a sua obra. Bem-aventurados aqueles que guardam os seus mandamentos, para que tenham direito à árvore da vida, e possam entrar na cidade pelas portas. E o Espírito e a esposa dizem: Vem. E quem ouve, diga: Vem. E quem tem sede, venha; e quem quiser, tome de graça da água da vida”.

Apocalipse: 22:11-12; 14; 17

Medicamentos altamente diluídos promovem regulação imunológica e efeito protetor na fisiopatologia de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes medicamentos diluídos acima da constante de Avogadro, em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*, no Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá, Paraná. Em ensaio cego, controlado e randomizado, foram utilizados 84 camundongos suíços machos, com 8 semanas de idade, infectados IP (1400 tripomastigotas cepa Y-*T.cruzi*) distribuídos em 8 grupos: GCaus – Grupo tratado com *Kalium causticum* 13c (n=10), GCon – Grupo tratado com *Conium maculatum* 13c (n=11), GLy – Grupo tratado com *Lycopodium clavatum* 13c (n=10), GCIC – Grupo tratado com veículo de preparação dos medicamentos constitucionais (solução hidroalcoólica 7%) (n=11), GLB – tratado com *L. clavatum* e organoterápico de baço 13c (n=10), GLC – tratado com *L. clavatum* e organoterápico de coração 13c (n=10), GLBC – tratado com *L. clavatum*, organoterápicos de baço e coração 13c (n=11) e GCICO tratado com veículo de preparação (solução hidroalcoólica 7%) dos medicamentos constitucionais e organoterápicos (n=11). Os medicamentos foram preparados segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira. O tratamento com o *L. clavatum* foi realizado 48 horas antes e após a infecção. Após 96 e 144 horas da inoculação o *L. clavatum* foi oferecido associado ou não a organoterápicos, de acordo com os grupos pré-selecionados. Os medicamentos e seu veículo foram dinamizados e oferecidos diluídos em água (1mL/100mL) *ad libitum*, em bebedouro âmbar, *over night*. Parâmetros imunológicos (citocinas), número de megacariócitos, células de Kupffer e índice de apoptose, parâmetros clínicos e sobrevida foram avaliados em GCIC, GCaus, GCon, GLy. Parâmetros parasitológicos, clínicos e sobrevida foram avaliados em GCICO, GLB, GLC, GLBC. O grupo GLy em relação ao GCIC apresentou predominância de resposta Th1 com aumento de TNF- α e diminuição de IL-6, apresentando maior sobrevida, menor morbidade com maior consumo de água, temperatura corpórea, quantidade de megacariócitos, células de Kupffer, hepatócitos e esplenócitos em apoptose com maior número de corpos apoptóticos no fígado. O grupo GCon apresentou aumento de resposta Th2 com aumento de IL-4, agravamento da infecção com mortalidade precoce dos animais. O grupo GLBC apresentou pico de parasitos significativamente menores, e maior período pré-patente em relação ao GCICO (p<0,05), o que indicou efeito protetor. O GLBC e GLB tiveram maior temperatura e peso corporal em relação ao GCI ao longo da infecção (p<0,05).

No entanto o aumento do consumo de ração foi significativamente maior somente no GLBC em relação ao GCI no fim do período patente ($p < 0,05$). Os resultados demonstram que os medicamentos altamente diluídos são capazes de alterar o curso da infecção murina por *T. cruzi*, promovendo efeito protetor por meio de alterações de respostas imunológicas e fisiopatológicas em benefício ao hospedeiro, abrindo caminho para uma alternativa de tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: apoptose, citocinas, *Conium maculatum*, *Kalium causticum*, *Lycopodium clavatum*, *Trypanosoma cruzi*.

Highly diluted drugs promote immune regulation and protective effect in mice infected by *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO

The aim of this study was to evaluate the effects of different medications diluted above the Avogadro constant in mice infected with *Trypanosoma cruzi* in the Laboratory of Chagas Disease of the Universidade Estadual de Maringá, Paraná. In a blind, controlled and randomized assay, 84 Swiss male mice, 8 weeks old, IP infected, (1400 trypomastigotes of Y strain-*T.cruzi*) were allocated into 8 groups: GCaus - Group treated with *Kalium causticum* 13c (n=10), GCon - Group treated with *Conium maculatum* 13c (n=11), GLy - Group treated with *Lycopodium clavatum* 13c (n=10), GCIC – Group treated with vehicle for preparation of constitutional medications (7% hydroalcoholic solution) (n=11), GLB - treated with *L. clavatum* and organotherapeutic of spleen 13c (n=10), GLC - treated with *L. clavatum* and organotherapeutic of heart 13c (n=10), GLBC - treated with *L. clavatum*, organotherapeutic of spleen and heart 13c (n=11) and GCICO - treated with vehicle for preparation (7% hydroalcoholic solution) of constitutional and organotherapeutic medications (n=11). The medications were prepared according to the Farmacopéia Homeopática Brasileira. Treatment with *L. clavatum* was performed 48 hours before and after infection. 96 and 144 hours after inoculation, *L. clavatum* was offered associated or not associated with organotherapeutics, according to the pre-selected groups. The medications and their vehicle were succussed and offered diluted in water (1mL/100mL) *ad libitum*, in amber drinking bottle for 16 hours. Parasitological, clinical parameters and survival were evaluated in GCICO, GLB, GLC, GLBC. Immunological parameters of cytokines, megakaryocytes, Kupffer cells, apoptosis, clinical parameters and survival were evaluated in GCIC, GCaus, GCon, GLy. The GLy group, compared with GCIC, had predominance of Th1 response with TNF- α increase and IL6 decrease, presenting higher survival, less morbidity with higher water consumption, body temperature, higher number of megakaryocytes, Kupffer cells, hepatocytes and splenocytes in apoptosis with a greater number of apoptotic bodies in the liver. The GCon group had increased Th2 response with IL-4 increase, worsening of infection with early mortality of the animals. The GLBC group had a significantly lower peak of parasites and the highest pre-patent period compared with GCICO ($p<0.05$). GLBC and GLB had higher temperature and body weight compared with GCI throughout the infection ($p<0.05$). However, the increased feed intake was significantly higher only in GLBC compared with GCI at the end of patent period ($p<0.05$). There was no significant difference in survival of groups GLB, GLC, GLBC compared with GCICO. The results demonstrate that the highly diluted medications are capable of altering the course of murine infection with *T. cruzi*, promoting a protective effect through alterations of immunological and pathophysiological responses, promoting benefits to the host, opening the way for an alternative approach for the treatment of Chagas disease.

Keywords: apoptosis, cytokines, *Conium maculatum*, *Kalium causticum*, *Lycopodium clavatum*, *T. cruzi*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 A. The relationship between survival and the number of megakaryocytes and Kupffer cells (spleen and liver, respectively) on the 8th day after infection in groups of animals infected with *T. cruzi*; B. Concentration of cytokines (pg/mL) on the 8th day after infection in Swiss male mice, 8 weeks old, infected with *T. cruzi* – Y strain; C. cytokine ratio (balance Th1/Th2) on day 8 after infection in Swiss male mice, 8 weeks old, infected with *T. cruzi* – Y strain; D. Spleen cut with high number of megakaryocytes (40X - GLy); E. Liver cut with a small number of Kupffer cells (40X - GCI). Immunohistochemistry technique, stained with Harris hematoxylin. GLy - animals treated with *Lycopodium clavatum*; GCI animals treated with the vehicle preparation of highly diluted *Lycopodium clavatum* 13c.....43

Figure 1 Kaplan-Meier curve of mice infected with 1,400 blood trypomastigotes of Y strain of *T. cruzi*, treated with 7% alcoholic solution of highly diluted compounds (GCI), *Kalium causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy).....56

Figure 2 A: Average body weight (g) from the 1st to the 23rd days of infection; B: Average feed intake (g) from the 1st to the 23rd day of infection; C: Average water consumption (mL) from the 1st to the 23rd day of infection; D: Average body temperature (°C) from the 1st to the 23rd day of infection of Swiss male mice, 1,400 blood trypomastigotes of Y strain of *T. cruzi*, treated with 7% alcoholic solution (GCI) of highly diluted compounds, *Kalium causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). * p<0.05 compared with GCI.....57

Figure 3 Serum concentration (pg/ml) of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10 and IL-17 on the 8th day after infection in Swiss male mice, 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle of highly diluted compounds (GCI), *Kalium Causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c

(GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). n=3 animals per group; * p<0.05 compared with GCI between groups for the same cytokine.....59

Figure 4 Ratios of IL-6/IL-4, IL-6/IL-10, IL-2/IL-4, IL-2/IL-10, TNF α /IL-4, TNF α /IL-10, IFN γ /IL-4, IFN γ /IL-10, IL-2/IL-17, IL-6/IL-17, TNF α /IL-17, IFN γ /IL-17 (balance Th1/Th2 and Th1/Th17) on the 8th day after infection in Swiss male mice, 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle of highly diluted compounds (GCI), *Kalium Causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). n=3 animals per group; *p<0.05 compared with GCI between groups for the same relationship between cytokines. Letters a, b, c, d, e, f = individualized cytokines with better definition.....60

Figure 5 Mean of the number of hepatocytes TUNEL+, splenocytes TUNEL + and apoptotic phagocytosed bodies (Liver) in histological sections of Swiss male mice, 8 weeks-old, inoculated with 1400 trypomastigotes of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* on the 8th day after infection (40X magnification). Immunohistochemistry method: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP Nick end labeling (TUNEL) and APOPTAG (Millipore). n=3 animals per group; *p<0.05 compared with the GCI for each parameter.....61

Figure 6 Section of liver of Swiss male mice, 8th day of infection with 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle of highly diluted compounds (GCI), *Kalium causticum* 13c (GCaus) , *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). n=3 animals per group; Technique used: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP Nick end labelling (TUNEL) - APOPTAG (Millipore). 40x objective. Arrow (→): hepatocytes undergoing apoptosis; Oval shape (o): apoptotic bodies - phagocytic cells with phagocytic vacuole with apoptotic material.....62

Figure 7 Section of spleen of Swiss male mice, 8th day of infection with 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle

of highly diluted compounds (GCI), *Kalium causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). n=3 animals per group; Technique used: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP Nick end labeling (TUNEL) - APOPTAG (Millipore). 40x objective. Arrow (→): splenocytes undergoing apoptosis.....63

Figura 1 Curva de parasitemia média de camundongos “Swiss” machos, 8 semanas de vida, submetidos ao inoculo com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com solução hidroalcoólica a 7º GL (GCI); *Lycopodium clavatum* e organoterápico de coração (GLC); *Lycopodium clavatum* e organoterápico de baço (GLB); *Lycopodium clavatum*, organoterápicos de baço e coração (GLBC).....79

Figura 2 Análise de sobrevivência de camundongos “Swiss” machos, 8 semanas de vida, submetidos ao inoculo com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com solução hidroalcoólica a 7º GL (GCI); *Lycopodium clavatum* e organoterápico de coração (GLC); *Lycopodium clavatum* e organoterápico de baço (GLB); *Lycopodium clavatum*, organoterápicos de baço e coração (GLBC).....80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Mean values and standard deviation for survival and number of Kupffer cells (liver) and megakaryocytes (spleen) per microscopic field on Swiss male mice of 8 weeks old infected with Y strain of *T. cruzi*.....43
- Tabela 1 Quantitative clinical parameters and overall survival (probability) evaluated in Swiss male mice, 8 weeks-old, inoculated with 1400 trypomastigotes of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, in groups GCI, GCaus, GCon and GLy.....57
- Tabela 2 Qualitative clinical parameters evaluated in Swiss male mice, 8 weeks-old, inoculated with 1400 trypomastigotes of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, for the groups GCI, GCaus, GCon and GLy.....58
- Tabela 1 Parâmetros parasitológicos em camundongos Swiss, machos, oito semanas, infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y, tratados com associação de medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* 13c (L), organoterápicos de baço (B), organoterápico de coração (C) e com solução hidroalcoólica a 7% (GCI).....79
- Tabela 2 Parâmetros clínicos em camundongos Swiss, machos, oito semanas, infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y, tratados com associação de medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* 13c (L), organoterápicos de baço (B), organoterápico de coração (C) e com solução hidroalcoólica a 7% (GCI).....82

Tese elaborada e formatada conforme as
normas da ABNT e das publicações
científicas:

Cytokine – An Official journal of the International
Cytokine and Interferon Society (ICIS) (artigo 1)

disponível em:

<https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622815?generatepdf=true>;

Microbial Pathogenesis (artigo 2)

disponível em:

<<https://www.elsevier.com/journals/microbial-pathogenesis/0882-4010?generatepdf=true>>;

European Journal of Integrative Medicine (artigo 3)

disponível em:

<https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/717842?generatepdf=true>

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO I	16
1.1	Doença de Chagas	16
1.2	Imunofisiopatologia da doença de Chagas	18
1.3	Apoptose	20
1.4	Infecção experimental: Modelo murino	21
1.5	Homeopatia: Medicina Integrativa e Complementar	22
1.6	Justificativa	25
1.7	Objetivos	26
1.8	Referências	26
2	CAPÍTULO II	37
2.1	Artigo 1: Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in <i>Trypanosoma cruzi</i> infected mice treated with <i>Lycopodium clavatum</i>	38
2.2	Artigo 2: Up-regulation de apoptose acompanha melhora clínica e maior sobrevivência de camundongos infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com <i>Lycopodium clavatum</i> altamente diluído	49
2.3	Artigo 3: Associação de medicamentos homeopáticos promove diminuição da parasitemia e melhora clínica em camundongos infectados pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
3	CAPÍTULO III	87
3.1	Conclusões	87
3.2	Perspectivas	88
4	Apêndice	89

CAPÍTULO I

DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) é uma zoonose que ocorre principalmente na América Latina, sendo endêmica em 21 países (WHO, 2016). Através da crescente migração de latino-americanos que não sabem que estão infectados, ocorreu aumento do número de pacientes, em países desenvolvidos não endêmicos (DNDi, 2016a,b; WHO, 2016).

A grande escala de migração rural-urbana e imigração de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi* para países não endêmicos resultam em crescente disseminação e globalização da DC (CDC, 2015; DNDi, 2016a,b). Antes detectada apenas na América Latina, estima-se hoje que existam 5,7 milhões de pessoas infectadas em todo mundo, e 25 milhões estão em risco de contraí-la (DNDi, 2016a,b).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2015) no período de 2000 a 2013 foram notificados 1.570 casos agudos da DC no Brasil. Os estados brasileiros com maior número de casos registrados foram o Pará, com 1.173 casos (74,7%), Amapá com 146 casos (9,3%), o Amazonas com 78 casos (5%). No período de 2013 a 2015, foram registrados 33 óbitos por DC aguda no Brasil. Aproximadamente 7.000 casos de óbitos mundiais por ano ainda são contabilizados (WHO, 2016).

O *T. cruzi* é encontrado em animais vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos) podendo apresentar-se sob as formas amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas e, raramente, promastigotas em seus ciclos de vida (HOARE, 1972).

As manifestações clínicas são a expressão da grande variedade de comprometimento orgânico que pode ser observado na doença de Chagas. Uma das formas de apresentação clínica da DC é a fase aguda com duração média de dois meses. Em 95% dos casos é assintomática ou inaparente, podendo desenvolver febre, mialgia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, anorexia e vômito. É representada por infecção generalizada do *T. cruzi* com abundante parasitemia e formas amastigotas presentes em quase todos os órgãos, com presença de infiltrado inflamatório, principalmente no miocárdio (RASSI *et al.*, 2010). Pode ser fatal devido à miocardite grave, entretanto são raros os casos onde isto acontece.

As manifestações crônicas ocorrem em aproximadamente 30 a 40% dos casos, podendo ter curso como forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardio-digestiva,

após 10 a 30 anos da infecção inicial (RASSI Jr *et al.*, 2012). As lesões cardíacas ocorrem em 20 a 30 % dos indivíduos (RASSI *et al.*, 2010), podendo levar à insuficiência cardíaca progressiva, aneurismas apicais, tromboembolismo e morte súbita em dois terços dos infectados. A morte por insuficiência cardíaca refratária pode ocorrer em 25 a 30% e tromboembolismo em 10 a 15% dos casos (RASSI Jr. *et al.*, 2001; COURA, PEREIRA, 2012). Já as manifestações digestivas são caracterizadas por disfunções gastrointestinais, através do desenvolvimento de megaesôfago, megacolon ou ambos, afetando de 10 a 15% dos pacientes infectados (RASSI *et al.*, 2010), iniciando por incoordenação motora (disperistalse) devido ao comprometimento do sistema nervoso autônomo (plexos mioentéricos), afetando diferentes partes do tubo digestivo com repercussão no esôfago e cólon (MAIFRINO *et al.*, 2005).

Nos neonatos infectados a forma assintomática é a mais frequente, seguido pela hepatoesplenomegalia. No entanto, alguns recém-nascidos podem apresentar calcificações cerebrais em 30% dos casos, hipotonia muscular, anemia, icterícia, hiperbilirrubinemia, febre, insuficiência cardíaca, microcefalia, meningoencefalite, crises convulsivas e morte (PEHRSON *et al.*, 1982; MOYA, MORETTI, 1997; SALEME *et al.*, 1971).

Pacientes transplantados, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), podem sofrer reativação da DC, provocando aumento de tripomastigotas sanguíneos com novas manifestações clínicas (LAMBERT *et al.*, 2006; RASSI *et al.*, 2012).

A doença de Chagas não possui tratamento eficaz, tendo o benznidazol como único medicamento disponível no Brasil, não aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), porém aprovado pela ANVISA (BERN, 2015; BRASIL, 2013) para fins terapêuticos. Um estudo multicêntrico (BENEFIT) demonstrou a ausência de benefício clínico deste medicamento, tornando a situação epidemiológica desafiadora nos procedimentos de vigilância, controle, diagnóstico e tratamento da doença de Chagas (MORILLO *et al.*, 2015). No entanto, o Consenso Brasileiro em doença de Chagas recomenda o tratamento com o BZ para pacientes diagnosticados na fase aguda (acidentes laboratoriais, imunossuprimidos, sujeitos a reativação da infecção, infecção congênita) e crônica recente para prevenir complicações da doença (DIAS *et al.*, 2016). Assim existe a necessidade de mais estudos em modalidades de tratamentos que sejam

mais eficazes e que garantam uma melhor qualidade de vida aos pacientes (RASSI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012).

IMUNOFISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A resposta imunofisiopatológica contra o *Trypanosoma cruzi* é complexa e envolve ampla variedade de populações celulares (BASSO 2013). A fase aguda caracteriza-se por uma produção exacerbada de citocinas inflamatórias (CUNHA-NETO *et al.*, 2009). Os mecanismos patogênicos desencadeadores da infecção por *T. cruzi* estão ligados a múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida do hospedeiro e também do próprio parasito que mantém lesões inflamatórias, consequência deste protozoário evadir do meio intracelular (amastigotas) para o extracelular (tripomastigotas). Com isso, o parasito passa a ser continuamente combatido e tem a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro (TELLERIA, TIBAYRENC, 2010). No entanto, ele pode persistir indefinidamente, assim como a resposta imune. Lesões teciduais resultantes dessa atividade imunológica prolongada acumulam-se e, eventualmente, levam às alterações funcionais musculares e nervosas características da doença de Chagas (LO PRESTI *et al.*, 2014). Células e mecanismos efetores do sistema imune são responsáveis tanto pelo controle da multiplicação do parasito nos tecidos como pelas lesões locais resultantes da atividade antiparasitária (BRENER *et al.*, 2000).

A autoimunidade tem sido proposta na patogênese das lesões por *T. cruzi* (SADIGURSKY *et al.*, 1982). Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorre inibição de IL-2 (HAREL-BELLAN *et al.*, 1983). A up-regulation de IL-4 produz efeitos citotóxicos inespecíficos exacerbados, liberados preferencialmente por células Th2 (MALE *et al.*, 2007; MENTINK-KANE *et al.*, 2011).

As células Th17 foram identificadas em camundongos deficientes da subunidade p40 da IL-13 (CUA *et al.*, 2003). Inicialmente as propriedades pró-inflamatórias da IL-17 foram demonstradas, sendo associada aos processos patológicos de algumas doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes (RUTITZKY; STAKECKER, 2006). Logo após surgiram estudos relacionando esta citocina ao bom prognóstico de doenças infecciosas (MIYAZAKI *et al.*, 2010). Recentemente, Noster e col. (2015), mostraram que além de ação pró-inflamatória as células Th17 também desempenham papel anti-inflamatório. Embora estas células tenham surgido como uma população de

células essenciais que são capazes de regular o sistema imunológico e prevenir o desenvolvimento de algumas doenças, pouco se sabe a respeito do envolvimento das células Th17 em infecções por *Trypanosoma cruzi*, e os poucos estudos ainda são controversos, dificultando a elucidação completa de mecanismos envolvidos com a resposta Th17.

A infecção por protozoários desencadeia a up-regulation de IL-6 e em condições inflamatórias ocorre o seu aumento drástico (ZYGNER *et al.*, 2015; DITTRICH *et al.*, 2015). Em um estudo realizado por Truyens e colaboradores (1994), foi demonstrado que injeções de anticorpo anti IL-6 em camundongos infectados por *T. cruzi*, retardam a mortalidade dos animais, mudando o curso da infecção.

Na infecção aguda são detectados altos níveis de TNF- α e IFN- γ , resultantes de resposta Th1, provocam caquexia e mortalidade precoce (TRUYENS *et al.*, 1999). Durante a multiplicação parasitária, o IFN- γ exerce ação antiparasitária juntamente com o TNF- α , aumentando a captação de L-arginina com o aumento da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) para sintetizar óxido nítrico (NO) e ativação dos macrófagos, via NF- κ B e STAT1 para execução de efeito letal anti-parasitário (DAS *et al.*, 2010; GANSTER *et al.*, 2001). Assim, o NO se torna essencial no aumento parasitário, período no qual as células NK são conhecidas por controlar a infecção, sendo dispensáveis após este período, quando os níveis parasitemicos são controlados por células CD8+ (PANIS *et al.*, 2011).

Na resposta imune inata, o *T. cruzi* induz a ativação de células NK, que tem relação com a destruição de células-alvo e com a produção de citocinas, como IFN- γ e TNF- α (CARDILLO *et al.*, 1996) envolvidas na sensibilização de outras respostas imunes. A infecção dos macrófagos por *T. cruzi* pode induzir a secreção de IL-12 por essas células, a qual induz a produção de IFN- γ e TNF- α pelas células NK resultando no controle da parasitemia e da mortalidade, porém em excesso induzem a lesões graves que podem levar os animais à morte (DOS REIS, 2011; TELLERIA, TIBAYRENC, 210).

A modulação de resposta Th1 é um dos mecanismos envolvidos na fagocitose de amastigotas intracelulares (MIYAZAKI *et al.*, 2010). A presença de parasitos nos tecidos desencadeia a secreção de citocinas inflamatórias como resposta ao protozoário e também para a quebra dos mecanismos de tolerância imunológica (DOS REIS, 2011). A expressão de resposta Th2, com elevada concentração de IL-10 e IL-4 tem sido

correlacionada com o processo patofisiológico da doença, de tal modo que a sua inibição resulta em efeito protetor (CENCI *et al.*, 1998). A IL-10 tem mostrado inibir a síntese do INF γ pelas células NK induzidas pelo parasito, na qual exerce papel fundamental no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias (MALE *et al.*, 2007; MENTINK-KANE *et al.*, 2011). O aumento de IL-17 provoca reações inflamatórias em camundongos infectados por protozoários (Guedes *et al.*, 2010).

O envolvimento de células hematopoiéticas na fisiopatologia e na eliminação do *T. cruzi* é dependente de ações combinadas de vários tipos celulares, incluindo macrófagos, linfócitos TCD4+, TCD8+ e hiperprodução de anticorpos pelas células B (BRENER, GAZZINELLI 1997; KAYAMA, TAKEDA, 2010; DOS REIS, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013). No entanto, o envolvimento de megacariócitos nesta infecção ainda é desconhecido, podendo haver uma tendência em aumento, assim como observado por Al-Sohaibani (1996) em biópsias de medula óssea de pacientes infectados por *Leishmania donovani*.

A cepa Y de *T. cruzi*, apresenta tropismo para as células do sistema mononuclear fagocitário através do parasitismo de macrófagos do baço e fígado, caracterizado por inflamação severa destes órgãos (TIBAYRENC; TELLERIA, 2010). Tribulatti *et al.*, (2005) demonstraram em camundongos infectados por *T. cruzi*, que o baço não é o órgão principal na remoção de plaquetas alteradas, indicando participação de outros fagócitos neste processo, assim como os macrófagos residentes no fígado, conhecidos como células de Kupffer. Desta forma, pesquisas envolvendo a participação destas classes celulares na infecção por *T. cruzi* são necessárias para elucidação da relação parasito *versus* hospedeiro.

APOPTOSE

Atualmente sabe-se que a apoptose está presente em todos os estágios de vida dos organismos multicelulares, incluindo desenvolvimento, crescimento e homeostase durante a maioridade e envelhecimento, sendo objeto de muitos estudos (HUPPERTZ *et al.*, 1999; NIKITAKIS *et al.*, 2004; THUSHARA *et al.*, 2015).

A morte celular pode ser programada (apoptose, morte celular autofágica, piroptose) ou passiva (necrose). A apoptose é a mediada por diversos mecanismos, assim como o envolvimento de enzimas apoptóticas da família das proteases cisteiniais aspartato-específicas (COUILLIN *et al.*, 2011).

As características morfológicas da apoptose incluem a retração tanto do citoplasma quanto do núcleo, e a geração de fragmentos celulares chamados corpos apoptóticos, que fagocitados por células intactas, posteriormente são destruídas. Neste tipo de morte celular, ocorre pouca disfunção tecidual, marcada pela ausência de inflamação (BERGSBAKEN *et al.*, 2009).

A apoptose pode ocorrer tanto em processos fisiológicos quanto patológicos para conservar elementos celulares essenciais, tendo como reguladores positivos os fatores de crescimento e os proto-oncogenes, capazes de estimular a progressão do ciclo celular e como reguladores negativos os supressores tumorais que agem de modo contrário inibindo os reguladores positivos (PAROLIN; REASON, 2001; POON *et al.*, 2010).

Na infecção por *T. cruzi*, pode ocorrer inibição ou ativação de apoptose em células hospedeiras (HEUSSLER *et al.*, 2001; DOS REIS, 2011). Através de estudos *in vivo* e *in vitro* foram demonstrados que parasitos intracelulares, bem como células hospedeiras, sofrem apoptose durante a invasão por *T. cruzi* (DE SOUZA *et al.*, 2008, ZHANG *et al.*, 1999; TOSTES *et al.*, 2005) e fagócitos infectados apresentam níveis mais elevados de apoptose em comparação com células não fagocitadas (DE SOUZA *et al.*, 2008, DE SOUZA *et al.*, 2008).

INFECÇÃO EXPERIMENTAL: MODELO MURINO

Existem várias cepas descritas na literatura e que são utilizadas em estudos experimentais. A cepa Y é uma das mais estudadas, foi isolada de caso agudo humano e caracterizada por Pereira da Silva & Nussenzweig em 1953 (SILVA, NUSSENZWEIG, 1953). Na infecção murina esta cepa apresenta período pré-patente de 3-5 dias (BORGES *et al.*, 1983; PINTO *et al.*, 1986; DE SOUZA *et al.*, 2008). A curva de parasitemia observada em camundongos é característica, com pico máximo de parasitos entre o 7º-12º dias após a infecção (PINTO *et al.*, 1999).

A infecção experimental de forma semelhante à patologia apresentada pelo homem permite avaliar mecanismos biológicos, fisiológicos, bioquímicos, imunológicos, comportamentais e clínicos. Por este motivo, o estudo experimental tem sido amplamente utilizado nos mais diversos modelos animais, objetivando estudar as mais diversas doenças, incluindo a infecção por *T. cruzi* com a finalidade curativa, testando novas terapêuticas na busca de uma melhor abordagem de indivíduos

infectados pelo *T. cruzi*, tentando melhorar a qualidade de vida dos pacientes (COURA, PEREIRA 2012).

O modelo animal ideal para infecção experimental deve atender à capacidade de sobrevivência após a fase aguda, demonstrando condições similares à infecção humana. Devem ser consideradas a quantidade de tripomastigotas inoculadas, a via de inoculação e o tipo de cepa já que estes parâmetros influenciam na patologia da doença, revelando peculiaridades de tropismo tecidual, grau de infecciosidade, curva de parasitemia, mortalidade entre outras características (PINTO *et al.*, 1986; DA MATA *et al.*, 2000; ANDRADE, 1974).

O camundongo é o animal mais utilizado na pesquisa da doença de Chagas, podendo ser definido por linhagem e cepa, o qual poderá ser infectado pelas diferentes vias de inoculação (intradérmica, intraperitoneal, intraconjuntival ou oral) (ANDRADE *et al.*, 2002; COURA, PEREIRA, 2012).

HOMEOPATIA: MEDICINA INTEGRATIVA E COMPLEMENTAR

A medicina complementar/alternativa é difundida pelo mundo e a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem estimulando o uso destes métodos. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (PNPIC-SUS)”, com o intuito de incentivar e apoiar projetos de assistência, ensino e pesquisas nas diversas esferas do SUS, juntamente com outras práticas não convencionais (BRASIL, 2006).

A utilização dos medicamentos altamente diluídos está prevista e incluída nas PNPIC-SUS (BRASIL, 2006) e recentemente incentivada pela Portaria 187/2015, que cria o Serviço de Farmácia Clínica na rede pública do Distrito Federal, representando importante reconhecimento da homeopatia/medicamentos altamente diluídos no SUS.

Os medicamentos altamente diluídos podem ser derivados de plantas, animais ou minerais. O medicamento homeopático *Lycopodium clavatum* é derivado de uma planta rasteira da família Lycopodiaceae e as partes utilizadas são provenientes dos esporos secos que por trituração, rompem-se as cápsulas dos esporos convertendo-se em massa untuosa de coloração amarela clara, brilhante (BRASIL, 2011). O *Kalium causticum* é medicamento homeopático mineral preparado a partir da cal, da porcelana e do bissulfeto, os quais são submetidos a tratamentos físicos seguidos por destilação, produzindo uma solução que contém essencialmente o amoníaco (ou solução aquosa do

gás NH₃) com base cáustica derivado de um mineral (ALLEN, 1982). O medicamento homeopático *Conium maculatum* é derivado de uma planta herbácea da família Umbelífera e as partes utilizadas são provenientes principalmente dos frutos, porém em toda a planta são encontrados alcalóides (ALLEN, 1982).

Os medicamentos altamente diluídos podem ser preparados de diferentes formas. Medicamentos constitucionais são os homeopáticos propriamente. Bioterápicos são preparações medicamentosas obtidas a partir de produtos biológicos, quimicamente indefinidos: secreções, excreções, tecidos, órgãos, produtos de origem microbiana e alérgenos. Essas preparações podem ser de origem patológica (nosódios) ou não patológicas (sarcódios), elaboradas conforme a farmacotécnica homeopática (BRASIL, 2011). Os organoterápicos são medicamentos altamente diluídos, obtidos de órgãos ou glândulas endócrinas de animais saudáveis, baseado no princípio da "Identidade Biológica" onde uma função prejudicada é reestabelecida com a administração do seu homólogo sadio (ROZENCWAJ, 2010; FONTES, 2014) Estudos mostram que a administração destes medicamentos pode interferir nos mecanismos anatômicos, fisiológicos, imunológicos, dependendo da diluição administrada (CASTILHOS *et al.*, 2002; CASTILHOS *et al.*, 2003a). Existe pouco material bibliográfico sobre este medicamento, e até onde nos foi possível pesquisar, não encontramos estudos controlados que tratam dos organoterápicos na infecção por *T. cruzi*, apesar das observações clínicas confirmarem sua indicação e eficácia para outras patologias (CASTILHOS *et al.*, 2003b).

O grande compilador da Homeopatia foi o médico alemão Samuel Hahnemann, nascido no século XVII (1755-1843). Seus fundamentos teóricos-práticos do modelo homeopático foram sistematizados no *Organon da arte de curar*, cuja primeira edição foi publicada em 1810 (HAHNEMANN, 2001), fundamentada em quatro pilares: princípio de cura pelos semelhantes, experimentação dos medicamentos em indivíduos sadios, emprego de medicamentos dinamizados e prescrição de substâncias simples (medicamento único) (TEIXEIRA, 2010). Segundo o *princípio de cura pelos semelhantes (similia similibus curentur)*, substâncias que causam sintomas nos indivíduos sadios podem ser utilizadas para tratar sintomas semelhantes nos indivíduos doentes, com o intuito de estimular uma reação do organismo (vital ou homeostática) contra os seus próprios distúrbios (TEIXEIRA, 2003; TEIXEIRA, 2009).

O medicamento único deve possuir a capacidade de englobar todo o quadro sintomático individualizado do paciente/animal doente (LUNA, 2007). O médico homeopata deve conhecer o paciente, investigando os seus sintomas mentais/comportamentais, gerais e locais, sensações, sintomas concomitantes e alternantes, e especialmente os sintomas raros e peculiares para determinar a sua constituição e temperamento (WEIR, 2011; LUNA, 2007). Estas peculiaridades definem o que em homeopatia se chama de modalidade e lateralidade, que constituem uma ferramenta muito útil para encontrar o medicamento *simillimum* (SÁNCHEZ, 2006).

A homeopatia trata do organismo de forma integral e não apenas seus sintomas físicos. Os sintomas não podem ser tratados sem que se compreendam as características físicas e mentais do indivíduo (LOCKIE, 2001).

A idéia de medicamento constitucional se baseia na escolha de um medicamento de acordo com certas características físicas e psicológicas do indivíduo, formulando assim um quadro de substâncias possíveis para o paciente (CAMPBELL, 2011). O medicamento constitucional age no mesmo organismo humano contra a doença em questão, restabelecendo a homeostase do sistema biológico (LESSER, 2011).

Os medicamentos homeopáticos apresentados em diluições acima de $1:10^{24}$ (12cH), têm demonstrado bons resultados, mesmo ultrapassando o limiar de dispersão da matéria, onde não há presença de substância original, denominado de constante de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$) (REGER et al., 1997; CALABRESE, 2015; SANDRI et al., 2015). Em estudos recentes com o medicamento *Lycopodium clavatum*, diluído acima da constante de Avogadro foram observados efeitos satisfatórios na aprendizagem e memória em ratos (HANIF et al., 2015) e inibição da inflamação em camundongos infectados por *T. cruzi* (LOPES et al., 2016).

Existem diversas teorias que tentam explicar o mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos (BELLAVITE et al., 2015), uma delas é a “memória da água”, que tenta buscar provas sustentáveis da capacidade da água de armazenar propriedades de substâncias que foram altamente diluídas e assim, transferir esta informação para outros sistemas nos organismos vivos. Esta propriedade passa pelo entendimento do que sejam “clusters”, ou seja, são agregados de moléculas de água de tamanho e forma específicos ao campo magnético dos solutos dinamizados, que

induzem novas propriedades à água independente da presença do soluto (ENDLER *et al.*, 2010). Desta forma, a organização da água seria um processo dinâmico e associado a interações eletromagnéticas, de longo alcance e baixíssima intensidade (BELLAVITE, 2002). No entanto, os equipamentos atuais não conseguem comprovar a existência destes “clusters” acima do número de Avogadro (KAYNE, 2006).

Recentemente diversos pesquisadores mostraram diferentes ações de medicamentos altamente diluídos na infecção murina por *T. cruzi*, reduzindo o parasitismo e modulação da resposta inflamatória (LOPES *et al.*, 2016; SANDRI *et al.*, 2015), mudança no curso da curva de parasitemia (FERRAZ *et al.*, 2016), modulação da resposta imune (FALKOWSKI-TEMPORINI *et al.*, 2016), no entanto, apesar de evidências que esses medicamentos agem no sistema biológico, a informação transmitida a este sistema ainda é uma incognita (FERRAZ *et al.*, 2016).

JUSTIFICATIVA

A importância da doença de Chagas como um problema de saúde pública, acrescida ao limitado arsenal medicamentoso disponível para o tratamento da infecção por *T. cruzi*, evidenciam a necessidade da busca de novos medicamentos como alternativa ao tratamento convencional, principalmente na fase crônica, onde a toxicidade medicamentosa e o alto custo do tratamento de complicações da infecção tornam-se fatores limitantes na terapêutica da doença (BORGES *et al.*, 2012). O encontro de uma medicação altamente diluída que controle a infecção experimental de camundongos por *T. cruzi*, além de constituir esperança no tratamento alternativo da doença de Chagas, contribuiria para o entendimento do mecanismo destas medicações.

O uso de medicamentos altamente diluídos para o tratamento e profilaxia de doenças infecciosas e parasitárias tem sido largamente investigado por diversos pesquisadores realizando experimentos controlados (LOPES *et al.*, 2016; FERRAZ *et al.*, 2016; SANDRI *et al.*, 2015), porém a utilização desta terapia ainda tem sido alvo de ataques em virtude de suas falhas metodológicas na maioria dos estudos realizados (VIGANÒ *et al.*, 2015). Desta maneira, uma das formas de validar os experimentos com medicamentos altamente diluídos é a realização de estudos controlados, cegos, randomizados por sorteio, com número apropriado de animais por grupo, avaliação de marcadores biológicos e métodos estatísticos adequados para análise de resultados. Sendo assim, o estudo dos efeitos de medicamentos altamente diluídos, conduzidos

adequadamente pode contribuir na busca de novas alternativas de tratamento na infecção pelo *T. cruzi* e no entendimento de fatores que interferem na ação destes medicamentos.

OBJETIVOS

GERAL

Investigar o efeito de medicamentos altamente diluídos na infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi*.

ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros clínicos de animais infectados com *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com os medicamentos constitucionais *Lycopodium clavatum*, *Kalium Causticum*, *Conium maculatum*;

Detectar o envolvimento de apoptose do baço e fígado em animais infectados com *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com três medicamentos constitucionais, através da detecção *in situ* de DNA fragmentado;

Analisar o perfil imunológico a partir de dosagens de citocinas no soro de animais infectados com *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com os medicamentos constitucionais *Lycopodium clavatum*, *Kalium Causticum*, *Conium maculatum*;

Avaliar o número de células de Kupffer no fígado e megacariócitos no baço de animais infectados com *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com medicamento constitucional *Lycopodium clavatum*;

Investigar parâmetros clínicos e parasitológicos de animais infectados com *T. cruzi* submetidos ou não a associação de medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* e organoterápicos de baço e coração;

Avaliar a sobrevida de animais infectados por *T. cruzi* e tratados com *Lycopodium clavatum*, *Kalium Causticum*, *Conium maculatum*, organoterápico de coração, baço e associação dos organoterápicos de baço e coração.

REFERÊNCIAS

AL-SOHAIBANI, M.O. Bone marrow histopathological changes in visceral leishmaniasis. **Annals of Saudi medicine**, v.16, n.3, p.304-307, 1996.

ALLEN TF. The Encyclopedia of pure materiamedica. Repr., Jain B. Publishers, New Delhi, 1982.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v. 100, p.269-275, 2002.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do recôncavo baiano, **Revista de Patologia Tropical**, v. 3 p.65–121, 1974.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p.1-10, 2013.

BELLAVITE, P. Medicina biodinâmica: a força vital, suas patologias e suas terapias. Papirus editora, Campinas-SP, 2002, 480p.

BELLAVITE, P.; SIGNORINI, A.; MARZOTTO, M.; MORATTI, E.; BONAFINI, C.; OLIOSO, D. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. **Homeopathy**, v. 104, p.139-160, 2015.

BERGSBAKEN, T.; FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 2, p.99-109, 2009.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n.5, p.456-466, 2015.

BORGES, M.M.; MELLO, D.A.; TEIXEIRA, M.L.; DA SILVA, J.D.B. Estudo experimental de *Zygodonto myslasiurus* (rodentia-cricetidade) com cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v.17, p.387-393, 1983.

BORGES, A.R.; AIRES, J.R.; HIGINO, T.M.; DE MEDEIROS Md.; CITÓ, A.M.; LOPES, J.A.; DE FIGUIREDO, R.C. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exp Parasitology**, v.132, n. 2, p.123–128, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Boletim Epidemiológico, v.46, n.21, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Consultoria Jurídica. Advocacia Geral da União. Nota Técnica nº250/2013. Brasília, agosto de 2013. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/26/Benznidazol.pdf>>. Acesso 26 abr. 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Farmacopéia Homeopática Brasileira. 3ª edição. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: Acesso em: 8 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2006. Gabinete do Ministro. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Diário Oficial da União, Brasília (DF). 4 maio; seção 1 (84): 20-5.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio do Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, n. 2, p. 103–110, 1997.

CALABRESE, E.J. Hormesis: principles and applications. **Homeopathy**, v. 104, n.2, p.69-82, 2015.

CAMPBELL, A. The concept of constitution in homeopathy. **Homeopathy**, v.100, p.79-82, 2011.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukine 10: role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p.128-134, 1996.

CASTILHOS, L. R.; PINTO, L. F. Terapêutica Homeopática nas Ovariopatias Císticas de Bovinos Leiteiros, Monografia. Rio de Janeiro: IHB, 2002. 40p.

CASTILHOS, L.R.; SOUZA, J.C.; PINTO, L F; ALBUQUERQUE, F.T.; FILGUEIRAS, E. P. Avaliação da terapêutica homeopática nas ovariopatias císticas de bovinos leiteiros. Dissertação. Lavras: UFLA, 2003a. 53p.

CASTILHOS, L. R.; SOUZA, J.C.; PINTO, L.F.; ALBUQUERQUE, F.T.; FILGUEIRAS, E. P. Avaliação da Terapêutica Homeopática nas Ovariopatias Císticas de Bovinos Leiteiros. **Homeopatia Brasileira**. v. 9, n. 1, p. 5 - 15, 2003b.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Centers for Disease Control and Prevention, Center for Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria: Chagas Disease in the Americas. CS24221-A Rev. January 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/resources/chagasdiseaseintheamericas2015.pdf>> Acesso 25 abr. 2016.

CENCI, E.; MENCACCI, A.; FÈ D'OSTIANI, C.; DEL SERO, G.; MOSCI, P.; MONTAGNOLI, C.; et al. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity

in mice with invasive pulmonary aspergillosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, n. 6, 1750-60, 1998.

COUILLIN, I.; PÉTRILLI, V.; MARTINON, F (EDS.). The inflammasomes. Progress in Inflammation Research, Springer, Basel, 224 p., 2011.

COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p.286-296, 2012.

CUA, D.J.; SHERLOCK, J.; CHEN, Y.; MURPHY, C.A.; JOYCE, B.; SEYMOUR, B.; et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, p.744-748, 2003.

CUNHA-NETO, E.; NOGUEIRA, L.G.; TEIXEIRA, P.C.; RAMASAWMY, R.; DRIGO, S.A.; GOLDBERG, A.C.; et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso)**, v. 104, p.252-258, 2009.

DA MATA, J.R.; CAMARGOS, M.R.; CHIARI, E.; MACHADO, C.R. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism, **Brain Research Bulletin**, v. 53, p.153-162, 2000.

DAS, P.; LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; CHAKRAVORTTY, D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. **PLoS Pathogens**, v6, n. 6, e1000899, 2010.

DE SOUZA, E.M.; MEUSER-BATISTA, M.; BATISTA, D.G.; DUARTE, B.B.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; SOEIRO, M.N.C. *Trypanosoma cruzi*: alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 3, p.331-337, 2008.

DIAS JCP, RAMOS Jr. NA, GONTIJO ED, LUQUETTI A, SHIKANAI-YASUDA MA, COURA JR, TORRES RM, et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015, Epidemiol. Serv. Saúde 25 (2016) 7-86.

DITTRICH, A.; HESSENKEMPER, W.; SCHAPER, F. Systemns biology of IL-6, IL-12 family cytokines. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p.595-602, 2015.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*): DNDi recebe Prêmio de 2 milhões de euros da WellcomeTrust para desenvolver nova droga contra a doença de Chagas.

Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-impressao/310-12-03-2012-dndi-welcome-trust.htm>>. Acesso em: 13 set. 2016a.

DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative. About Chagas disease: What is Chagas disease? Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>>. Acesso 5 abr. 2016b.

DOS REIS, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n.2, p.84-90, 2011.

ENDLER, P.C.; THIEVES, K.; FRASS, M.; BONAMIN, L.; SCHERR, C.; BAUMGARTNER, S. Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10-23: a bibliometric study. **Homeopathy**, v. 99, n.1, p.25-36, 2010.

FALKOWSKI-TEMPORINI, G.J.; LOPES, C.R.; MASSINI, P.F.; BRUSTOLIN, C.F.; SANDRI, P.F.; FERREIRA, E.C.; ALEIXO, D.L.; PALA, N.R.; DE ARAÚJO, S.M. Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*, **Cytokine** v.88, p. 57-61, 2016.

FERRAZ, F.N.; VEIGA, F.K.; ALEIXO, D.L.; SPACK, M.; ARAÚJO, S.M. Different treatment schemes and dynamizations of *Trypanosoma cruzi* biotherapies: what information do they transfer to the organism in infected mice? **Homeopathy**, v. 105, n.4, p.305-310, 2016.

FONTES, O.L. Farmácia Homeopática: Teoria e Prática. 4º Edição; Editora Manole; Barueri - SP; 2014. 354p.

GANSTER, R.W.; TAYLOR, B.S.; SHAO, L.; GELLER, D.A. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p.8638-8643, 2001.

GONÇALVES, V.M.; MATTEUCCI, K.C.; BUZZO, C.L.; MIOLLO, B.H.; FERRANTE, D.; TORRECILHAS, A.C.; et al.; NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n. 10, e2469, 2013.

GUEDES, P.M.M.; GUTIERREZ, F.R.; MAIA, F.L.; MILANEZI, C.M.; SILVA, G.K.; PAVANELLI, W.R.; et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a

central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n.2, e604, 2010.

HAHNEMANN S. Organon da arte de curar, 6ª ed, São Paulo: Robe Editorial, 2001, pp 248.

HANIF, K.; KUMAR, M.; SINGH, N.; SHUKLA, R. Effect of homeopathic *Lycopodium clavatum* on memory functions and cerebral blood flow in memory-impaired rats. **Homeopathy**, v. 104, n.1, p.24-28, 2015.

HEUSSLER, V.T.; KÜENZLI P.; ROTTENBERG, S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n.11, p.1166-1176, 2001.

HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D.; EISEN, H. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n.11, 3466-3469, 1983.

HOARE, C.A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H-G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anatomy and Embryology**, v. 200, n.1, p.1-18, 1999.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 7, p. 511-517, 2010.

KAYNE, S.B. Homeopatia: Aspectos científicos, médicos e farmacêuticos – Teoria e Prática, 2ª Ed. Loures, Lusodidacta, 2006.

LAMBERT, N.; MEHTA, B.; WALTERS, R.; ERON, J.J. Chagasic encephalitis as the initial manifestation of AIDS. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p.941-943, 2006.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P.W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p.123-520, 1979.

LESSER, O. Constitution and constitutional treatment. **Homeopathy**, v. 100, p. 21-26, 2011.

LO PRESTI, M.S.; ESTEVES, B.H.; MOYA, D.; BAZÁN, P.C.; STRAUSS, M.; BÁEZ, A.L.; et al. Circulating *Trypanosoma cruzi* populations differ from those found

in the tissues of the same host during acute experimental infection. **Acta Tropica**, v. 133, 98-109, 2014.

LOCKIE, A. Manual de terapias naturais - Homeopatia, Porto, Livraria Civilização Editora, 2001.

LOPES, C.R.; FALKOWSKI, G.J.S.; BRUSTOLIN, C.F.; MASSINI, P.F.; FERREIRA, E.C.; MOREIRA, N.M.; et al. Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, v. 105, n. 2, p.186-193, 2016.

LUNA, S.P.L. Sebenta de Homeopatia Veterinária. Comunicação apresentada em Medicinas Alternativas na rotina do Medico Veterinário, FMV-ULHT, Lisboa, 2007.

MAIFRINO, L.B.M.; AMARAL, S.O.N.; WATANABE, I.; LIBERTI, E.A.; ZOUSA, R.R. *Trypanosoma cruzi*: Preliminary investigation of NADH-positive and somastotatin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. **Experimental Parasitology**, v. 111, p.224-229, 2005.

MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D.B.; ROITT, I. Immunology. Mosby, Elsevier, 7^o ed., 2007, 26-159.

MENTINK-KANE, M.M.; CHEEVER, A.W.; WILSON, M.S.; MADALA, S.K.; BEERS, L.M.; RAMALINGAM, T.R.; WYNN, T.A. Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. **Gastroenterology**, v. 141, n. 6, p. 2200-2209, 2011.

MIYAZAKI, Y.; HAMANO, S.; WANG, S.; SHIMANOE, Y.; IWAKURA, Y.; YOSHIDA, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 1150-1157, 2010.

MORILLO, C.A.; MARIN-NETO, J.A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, JR. A.; ROSAS, F.; et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1295-1306, 2015.

MOYA, P.; MORETTI, E. Doença de Chagas Congênita. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico Geral. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1997. p.383-410.

NIKITAKIS, N.G.; SAUK, J.J.; PAPANICOLAOU, S.I. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic and developmental diseases; and therapeutic opportunities. **Oral Surgery, Oral**

Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, v. 97, n.4, p.476-90, 2004.

NOSTER, R.; DE KONING, H.; SALLUSTO, F.; ZIELINSKI, C. Two types of human Th17 cells with pro- and anti-inflammatory properties and distinct roles in autoinflammation. From 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases Dresden, Germany. 30 September - 3 October 2015. **Pediatric Rheumatology**, v. 13, Suppl 1, O49, 2015.

PANIS, C.; MAZZUCO T.L.; COSTA, C.Z.; VICTORINO, V.J.; TATAKIHARA, V.L.; YAMAUCHI, L.M.; YAMADA-OGATTA, S.F.; et al. *Trypanosoma cruzi*: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p.58-65, 2011.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38, n. 2, p.138-144, 2001.

PEHRSON, P.; WALHGREN, M.; BENGTSSON, N. Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.3; p.449, 1982.

PINTO, F.H.; RIBEIRO, R.D.; BELDA NETO, F.M.; PRADO JR, J.C. Estudo comparativo da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p.133-40, 1986.

PINTO, P.L.S.; TAKAMI, R.; NUNES, E.V.; GUILHERME, C.S., OLIVEIRA JR, O.C.; GAMA-RODRIGUES, J.; OKUMURA, M. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (y strain) in mice. **Revista do Hospital das Clínicas**, v.54, p.141-46, 1999.

POON, I.K.; HULETT, M.D.; PARISH, C.R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 3, p.381-397, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p.275-291, 2012.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p.1388-1402, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, S.G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 76, p.75-96, 2001.

- REGER, D., GOODE, S., MERCER, E. Química - Princípios e Aplicações, 1ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, pp. 110, 1997.
- ROZENCWAJ, J. Organotherapy, Drainage & Detoxification: A starting point to safe practice for Homeopaths, Herbalists, Naturopaths, Traditional Healers and enlightened Medical Doctors. Ed. Emryss. Kandern, Germany, 2010, 284 p.
- RUTITZKY, L.I.; STADECKER, M.J. CD4 T cells produzind pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, Suppl 1, p.327-330, 2006.
- SADIGURSKY, M.; ACOSTA, A. M.; SANTOS-BUCH, C.A. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. The **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 5, p.934-941, 1982.
- SALEME, A.; YANICELLI, G.; IÑIGO, L. Enfermedad de Chagas-Mazzaen Tucumán. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 69, p.162, 1971.
- SÁNCHEZ, C.M.; BLÁZQUEZ, J.R.T. Homeopatia Veterinária - Matéria Médica, Casos Clínicos e comentários, Dilema Editora, Madrid, pp. 5-9, 10-14, 21-27, 29-33, 2006.
- SANDRI, P.; ALEIXO, D.L.; FALKOWSKI, G.J.S.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.D.; GOMES, L.M.; HERNANDES, L.; et al., *Trypanosoma cruzi*: Biotherapy made from trypomastigote modulates the inflammatory response. **Homeopathy**, v. 104, n. 1, p.48-56, 2015.
- SCHOFIELD, C.J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J.P. The process of domestication in Triatominae. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p.375-378, 1999.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica Biologia São Paulo**, v. 20, p.191-201, 1953.
- SOUZA, V.A.; NAKAMURA, C.V.; CORRÊA, A.G. Atividade Antichagásica de Lignananas e Neolignananas. **Revista Virtual de Química**, v.4, p.197-207, 2012.
- TEIXEIRA, M.Z. Homeopatia nas doenças epidêmicas: conceitos, evidências e propostas. **Revista de Homeopatia**, v. 73, n. 1-2, p.36-56, 2010.
- TEIXEIRA, M.Z. Antidepressants, suicidality and rebound effect: is a new evidence of the similitude natural law?, **Homeopathy**, v. 98, n. 2, p.114-121, 2009.
- TEIXEIRA, M.Z. Homeopathic use of modern medicines: utilisation of the curative rebound effect. **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 2, p.276-283, 2003.

TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. American Trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. In: TRUYENS, C. AND YVES, C. (Coord.). Immunology: Host – Parasite Interacion. Elsevier, 2010, p. 601-641.

THUSHARA, R.M.; HEMSHEKHAR, M.; BASAPPA; KEMPARAJU, K.; RANGAPPA, K.S.; GIRISH, K.S. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 93, n. 3, p.149-158, 2015.

TIBAYRENC, M.; TELLERIA, J. American Trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. In: DE LANA, M.; MACHADO, E.M.M. (Coord.). *Biology of Trypanosoma cruzi and Biological diversity*. Elsevier, 2010.

TOSTES, S.J.; BERTULUCCI, R.R.D.; ARAUJO, P.G.; RODRIGUES, V.J. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. **International Journal of Cardiology**, v. 99, n. 2, p.233-237, 2005.

TRIBULATTI, MV; MUCCI, J.; ROOIJEN, N.V.; LEGUIZAMÓN, M.S.; CAMPETELLA, O. The trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Induces Thrombocytopenia during Acute Chagas' Disease by Reducing the Platelet Sialic Acid Contents. **Infection and Immunity**, v.73, n. 1, p. 201-207, 2005.

TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses, **Infection and Immunity**, v. 62, n. 2, p.692-696, 1994.

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; LUCAS, R.; DE BAETSELIER, P.; BUURMAN, W.A.; CARLIER, Y. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 67, p.5579-5586, 1999.

VIGANÒ, G.; NANNEI, P.; BELLAVITE, P. Homeopathy: from tradition to science? **Journal of Medicine and the Person**, v. 13, n.1, p.7-17.

WEIR, M.B. Homeopathic philosophy: its importance in the treatment of chronic diseases. **Homeopathy**, v. 100, n. 1-2, p.11-17, 2011.

WHO. World Health Organization. Enfermedad de Chagas (Trypanosomiasis Americana). Disponível em: <http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/>. Acesso em: 14 set.2016.

ZHANG, J.; ANDRADE Z.A.; YU Z.X.; ANDRADE, S.G.; TAKEDA, K.; SADIRGURSKY, M.; et al. Apoptosis in a canine model of acute chagasic myocarditis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 3, p.581-596, 1999.

ZYGNER, W.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; BAŚKA, P.; DŁUGOSZ, E. Low T3 syndrome in canine babesiosis associated with increased serum IL-6 concentration and azotaemia. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 1-2, p.23-27, 2015.

CAPÍTULO II

Artigo 1: “Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*.”

Artigo publicado no periódico: *Cytokine* e disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466616304690>>

Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*

Gislaine Janaina Falkowski-Temporini^{a*}, Carina Ribeiro Lopes^a, Paula Fernanda Massini^a, Camila Fernanda Brustolin^a, Patricia Flora Sandri^b, Érika Cristina Ferreira^a, Denise Lessa Aleixo^a, Nelson Roberto Pala^c, Silvana Marques de Araújo^d.

^aPost-Graduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Brazil.

^bPost-Graduate Program in Biosciences and Physiopathology, Universidade Estadual de Maringá, Brazil.

^cHomeopath Volunteer, Maringá, Brazil.

^dDepartment of Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Brazil.

Abstract

We investigated the number of megakaryocytes, Kupffer cells and ratios of Th1/Th2 and Th1/Th17 cytokines in survival of mice infected with Y strain of *Trypanosoma cruzi* and treated with *Lycopodium clavatum*. In a blind, randomized and controlled assay, Swiss male mice, 8 weeks-old, infected with 1,400 trypomastigotes (Y strain) were divided into groups and treated with: GLy – *Lycopodium clavatum* dynamization13c and GCI - alcohol solution 7° GL (vehicle medicine). The treatment was offered two days before infection and on the 2nd, 4th and 6th days after infection, overnight (1mL/100mL) and *ad libitum*. Parameters assessed were: survival rate, number of megakaryocytes and Kupffer cells, cytokines dosage (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17), Th1/Th2 and Th1/Th17 ratios. The increase in megakaryocytes, Kupffer cells, predominance of Th1 response, with increased TNF- α , IL-10, TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-17 and decreased IL-6 IL-6/IL-4, are related to increased survival in mice infected with *T. cruzi* and treated with *Lycopodium clavatum* 13c. This result demonstrates the possibility of an alternative approach for the treatment of Chagas disease with dynamized drugs.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; *Lycopodium clavatum*; megakaryocytes; Kupffer cells; Th1 response.

Abbreviations: Th1, T helper cell type 1; Th2, T helper cell type 2; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IFN- γ , interferon gama; IL-10, Interleukin 10; IL-4, Interleukin 4; IL-17, Interleukin 17; IL-6, Interleukin 6.

1. Introduction

It has been more than one century since Chagas disease was discovered, yet there is still no effective treatment [1]. *Trypanosoma cruzi* infection involves up and

down regulation of cytokines and defense cells that depend on the host-parasite interaction, with consequences in immunopathology/resistance to infection [2]. Several studies have attempted to describe immunological mechanisms involved in the pathogenesis of this disease, however, there are still limitations in the current knowledge of immunoregulation and relationship between Kupffer cells, megakaryocytes and survival of *T. cruzi* infection [3].

The stimulus of megakaryopoiesis was observed in the replacement of platelets in inflammation and coagulation [4] and also occurs in the defense against infections. It has been observed in the defense against *T. cruzi* [5], although its contribution to the defense mechanism of the acute phase of infection seems not to be efficient and its relation to the survival of infected animals is still contradictory [6]. On the other hand, activation of platelets and macrophages seems to contribute to regeneration of different pathological conditions in which the synthesis of Th1, Th2 and Th17 cytokines are involved. As already known, platelets have megakaryocytes as their precursors [4,7]. Different mechanisms control *T. cruzi* infection in order to maintain homeostasis [2]. Kupffer cells are able to repair tissue damage caused by parasites [3,6].

The use of highly diluted medicines in animals has demonstrated immunomodulatory effects, explaining some of the mechanisms involved in host-parasite relationship [8]. Although dynamization equal to or above 12c ($1:10^{24}$) does not present detectable traces of the original substance because they have exceeded the Avogadro constant (6.02×10^{23}), studies have shown the negative regulatory character of inflammation by highly diluted *Lycopodium clavatum* in *T. cruzi* infection [9]. In this sense, the therapeutic intervention in murine infection by *T. cruzi* has shown to be an important tool in the research of new approaches for this infection. The aim of this study was to evaluate the number of megakaryocytes, Kupffer cells and Th1/Th2, Th1/Th17 cytokine ratios and the survival of mice infected by *T. cruzi* and treated with *Lycopodium clavatum* dynamization 13c.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

The experiment was performed twice as a blind, controlled and randomized trial. Swiss male mice, 8-weeks old, from Central Vivarium (Universidade Estadual de Maringá) were used. Experimental procedures were approved by ethics committee,

conducted in accordance with animal testing research and humane endpoint guidelines (protocol 54/2011-CEAE/UEM). Animals were kept in the laboratory of experimentation for a week before the experiment began controlled temperature and humidity, with an artificial lighting photoperiod of 12 hours (light/dark), with water and food *ad libitum*.

2.2. Groups and infection

Animals were infected intraperitoneally with 1.400 blood trypomastigotes of *T. cruzi*-Y strain and were divided into two groups so that the mean body weights were statistically similar among groups: GLy: animals treated with *Lycopodium clavatum* 13c (n=10); GCI: animals treated with alcohol 7° GL (vehicle medicine) (n=11).

2.3. Selection and preparation of substances

By using idiosyncratic characteristics presented by healthy Swiss mice, the Homeopathic Materia Medica and the Lynx Expert System Software (Albuquerque, USA), homeopathic doctors concluded for the constitutional medication *Lycopodium clavatum*.

L. clavatum and alcohol 7° GL were prepared in centesimal dynamization 13c (1:10²⁶ dilution) and mechanical agitation (AUTIC®10-50) for 33 seconds (\cong 3Hz). Low dynamization was selected because it is an acute infection in small animals [10]. *Lycopodium clavatum* was prepared from the diluted mother tincture (Deutsche-Homöopathie-Union-Germany) with grain alcohol (Agro-Industrial Tarumã Ltda, São Pedro do Turvo-Brazil) at 70° GL until 12c dynamization. The 13c dynamization, used to treat the animals, was prepared in alcohol 7° GL, according to the Farmacopéia Homeopática Brasileira [11].

2.4. Treatment schedule

Medicine was administered orally, diluted in water (1mL/100mL) offered *ad libitum* in an amber bottle, two days before infection and on the 2nd, 4th and 6th days after infection overnight (during 16 hours, from 5 p.m. to 9 a.m.), ensuring the action of the medication on the immune system, before and after infection.

GCI group received only 7° GL hydroalcoholic solution also diluted in water (1mL/100mL) in the same treatment schedule.

2.5. Survival

Survival of each animal was noted during 90 days and group survival was expressed as average lifetime, considering GLy (n=7) and GCI (n=8).

2.6. Quantification of megakaryocytes and Kupffer cells

On the 8th day of infection (day of maximum peak of parasitaemia), three animals from each group (GCI; GLy) were euthanized after deep anesthesia (300 mg/kg ketamine chlorhydrate + 30 mg/kg xylazine) for collection of liver and spleen. After histological procedures, four sections of 5 μ m thickness of each organ were cut and stained with Harris hematoxylin. Megakaryocytes and Kupffer cells were counted in 20 (liver) and 10 (spleen) random microscopic fields/section with 40X objective (Olympus-CBA, Tokyo, Japan) totaling 240 and 120 fields/group.

2.7. Cytokines

The cytokines IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6 (pro-inflammatory cytokines, Th1 response) IL-4, IL-10 (anti-inflammatory cytokines, Th2 response) and IL-17 (Th17 response), were measured in serum (pg/mL) on the 8th day of infection (peak of parasitemia), of three animals/group (GCI; GLy), obtained through cardiac puncture, using the commercial kit BDTMCytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 (CBA) (BD-Biosciences- Pharmingen, San Diego-USA) with analysis by flow cytometer (BD-CantoII-FCS) following manufacturer's instructions. The quantification of each cytokine was obtained using specific software (FCAP-Array, Becton-Dickinson).

2.8. Ratio Th1/Th2, Th1/Th17

The average ratios Th1/Th2 and Th1/Th17 of cytokines was determined for each group considering IL-6/IL-4, TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-10, TNF- α /IL-17, and was calculated by dividing the values obtained for Th1 cytokines by the Th2 or Th17 cytokine dosages of each animal. The average value was calculated afterward.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by comparing treated and control groups using the Student's "t" test for data with normal distribution and Mann-Whitney test for

data with unspecified distribution. The normality of the data was determined by the Shapiro-Wilk test. Statistica 8.0 software was used. Survival analysis was performed using nonparametric estimation of the Kaplan-Meier and Logrank test using R.3.2.0 software. The significance level adopted was 5%.

3. Results

The table and the figure summarize data and display the relationship between the parameters studied.

3.1. Survival

The GLy group had a significantly higher survival time in days (50.1 ± 37.3) compared to GCI (26.8 ± 25.6) ($p=0.02$) (Table 1), with 3 surviving animals among 7 infected in GLy (3/7) and one in eight in GCI (1/8).

3.2. Quantification of megakaryocytes and Kupffer cells

The average number of megakaryocytes and Kupffer cells was significantly higher in GLy group ($p<0.05$) (Table 1).

3.2. Cytokines and ratio Th1/Th2, Th1/Th17

The animals that received treatment with *L. clavatum* presented TNF- α and IL-10 dosages significantly higher ($p<0.05$) whereas the IL-6 dosage was lower ($p=0.02$) when compared to control group GCI.

Regarding to the remaining cytokines, there was no significant difference between the groups, although a trend toward a reduction of IL-4, IL-17 was observed, whereas IFN- γ showed a trend toward an increase compared to the control group. There was no statistical difference for IL-2 values between GLy and GCI groups. GLy showed predominance of Th1 response by increased TNF- α , even with a decrease in IL-6. GLy showed also increase in TNF- α /IL-4 ($p<0.05$) and TNF- α /IL-10 ($p<0.05$) ratios and decrease in IL-6/IL-4 ratio. Likewise, Th1 response was prevalent when the TNF- α /IL-17 ratio was evaluated, and such ratio was significantly increased in GLy ($p<0.05$). In summary, the results show the predominance of the Th1 response in GLy by the increase of TNF- α (Figure 1).

Table 1 - Mean values and standard deviation for survival and number of Kupffer cells (liver) and megakaryocytes (spleen) per microscopic field on Swiss male mice of 8 weeks old infected with Y strain of *T. cruzi*.

Groups	Survival (Days)	Kupffer cells (Number)	Megakaryocytes (Number)
GCI	26.8 ± 25.6	6.7 ± 3.2	0.2 ± 0.6
GLy	50.1 ± 37.3*	12.8 ± 5.5*	1.2 ± 1.7*

GCI – group treated with alcohol solution 7° GL (vehicle medicine)

GLy – group treated with *Lycopodium clavatum* 13c

* p<0.05

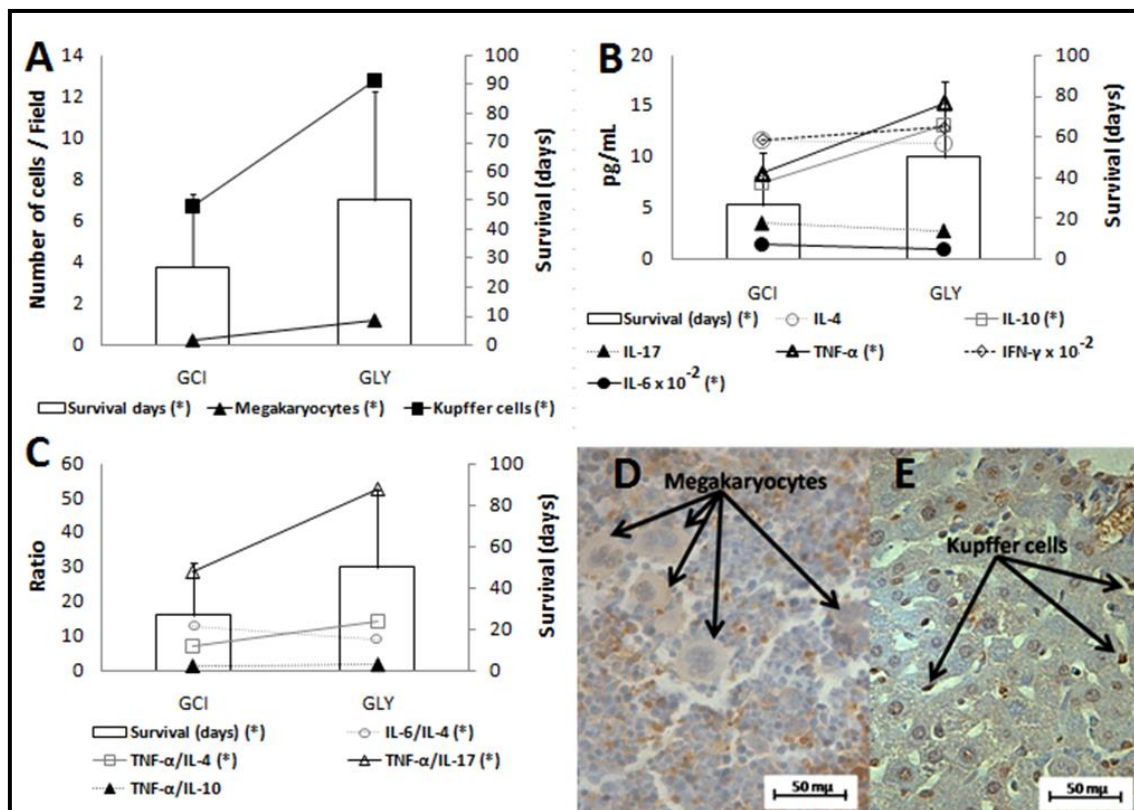


Fig 1. A. The relationship between survival and the number of megakaryocytes and Kupffer cells (spleen and liver, respectively) on the 8th day after infection in groups of animals infected with *T. cruzi*; B. Concentration of cytokines (pg/mL) on the 8th day after infection in Swiss male mice, 8 weeks old, infected with *T. cruzi* – Y strain; C. cytokine ratio (balance Th1/Th2) on day 8 after infection in Swiss male mice, 8 weeks old, infected with *T. cruzi* – Y strain; D. Spleen cut with high number of megakaryocytes (40X - GLy); E. Liver cut with a small number of Kupffer cells (40X - GCI). Immunohistochemistry technique, stained with Harris hematoxylin. GLy - animals treated with *Lycopodium clavatum*; GCI animals treated with the vehicle preparation of highly diluted *Lycopodium clavatum* 13c. (*) Statistical significance p<0.05.

4. Discussion

The modulation of the infection, with the increase of survival, was triggered by the action of the highly diluted medicine, and such effect involved a change in pattern of cytokine secretion and cell recruitment.

The effectiveness of *Lycopodium clavatum* has already been observed in the reduction of the inflammatory response in mice infected with *T. cruzi* [9]. However, this is the first time that its protective action was verified, with relationship between increase in survival, increase of the number of megakaryocytes, Kupffer cells and predominance of Th1 response in mice infected with *T. cruzi*.

The role of platelets (derived from megakaryocytes) has been recently recognized in the activation of the immune response to eliminate pathogens [4]. The immune-endocrine imbalance is a key determinant of parasite persistence [3]. Through rapid and effective immune response against the parasite, megakaryocytes and Kupffer cells in spleen and liver participate in the immune modulation, by stimulating a predominantly Th1 response and promoting a balanced host-parasite relationship during infection.

Infections caused by protozoa promote IL-6 up-regulation and also, under inflammatory conditions, it is possible to observe a drastic increase of this cytokine [4,7]. However, in addition to the anti-inflammatory function, mediated by classic signaling, IL-6 may act by trans-signaling, regulating pro-inflammatory mechanisms [12]. Our results showed reduction of IL-6 and IL-6/IL-4 ratio in GLy group, counterbalancing the increase in IL-10 (Th2) and preventing pathogenic damage by excessive Th1 response, by the increase of TNF- α , shifting the balance of activation of naïve T-cells to formation of Th2 [2,12]. This dynamic between cytokines decisively influenced the lower progression of pathogenesis, which is characterized in this infection by an intense inflammatory process. Thus, it provides protective action and is consistent with the observed lower mortality rate of infection in GLy with increased survival.

Recently, it has been suggested that IL-17 expression (Th17) is related to the progression of *T. cruzi* infection [13], while Th1 is related to host resistance [2]. On the other hand, Th1 response participates in the regulation of Th17 response [7]. Thus, understanding the dynamics of Th1/Th17 regulation is of fundamental importance in the pathological process of this infection [14]. In this work, GLy showed, concomitantly

with the increase in the number of megakaryocytes and Kupffer cells, significant increase in the ratio TNF- α /IL-17 by increasing TNF- α , resulting in predominance of Th1 response, leading to improved outcome of the infection, although the levels of IL-17, have not been differentiated from GCI.

TNF- α and IFN- γ are associated with the specific immunoregulation in response to pathogens, by acting through different mechanisms of action when the immunological homeostasis is needed, and this may induce activation of macrophages [10]. In this work, the TNF- α dosage, on the day of the peak number of parasites has shown the ability of highly diluted *L. clavatum* to induce biological activity, stimulating chemical mediators and cells in a balanced way in order to modulate the course of infection. Although some studies have shown that TNF- α stimulation causes excessive cellular damage and that this cytokine is related to the severity of infection, its equilibrated secretion in physiological doses warrants its benefits [2]. This balanced modulation with benefits was observed with the treatment with *Lycopodium* that promoted greater survival of animals infected with a highly virulent strain. Thus, such interleukin was essential for the immune homeostasis of GLy group, stimulating megakaryocytes and Kupffer cells [4,7]. The trend of increase in the concentration of IFN- γ corroborates other studies that indicate its influence on the increase of defense cells [7].

Treatment with dynamized *Lycopodium clavatum* induced modulatory response, balancing the parasite *versus* host relationship, resulting in benefits to the treated animals when compared to GCI, with promising action against *T. cruzi*, [9]. Several studies describe that chemical components from *Lycopodium* have the ability to promote allosteric interactions that are associated to changes in the conformational dynamics and functional transitions of the target protein, which enhance or inhibit specific cellular functions, affecting the health condition of the animal [15]. With the premise of the lack of organic matter and active principle of *L. clavatum* 13 c, our work demonstrates its ability to affect the biological system.

In summary, although our data show a significant direct relationship between the increase of megakaryocytes, Kupffer cells and predominance of Th1 response with benefit to the host expressed by an increase of survival with the treatment of murine *T. cruzi* infection with dynamised *L. clavatum*, these variables would not be able to guide towards the physiological balance of the body by themselves. Therefore other functions

should be assessed, as well as their reflections considering the complexity of the immune system and the tangle of the immune homeostasis orchestration.

Funding Information

This study was financed by Fundação Araucária, PROAP-CAPES, and was granted a CAPES' social demand scholarship

Conflict of Interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Ethical approval

The study was approved by the Standing Committee on Ethics in Research Involving Animals, according to CEAE 54/2011.

References

1. C.A. Morillo, J.A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi, Jr., F. Rosas, et al., Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373 (14) (2015) 1295-1306.
2. F.S. Machado, W.O. Dutra, L. Esper, K. Gollob, M.M. Teixeira, S.M. Factor, et al., Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.* 34 (6) (2012) 753-770.
3. A. Morrot, S.R. Villar, F.B. González, A.R. Pérez. Evasion and immuno-endocrine regulation in parasite infection: Two sides of the same coin in Chagas disease? *Front Microbiol.* 7 (2016) 704.
4. S. Haas, J. Hansson, D. Klimmeck, D. Loeffler, L. Velten, H. Uckelmann, et al., Inflammation-induced emergency megakaryopoiesis driven by hematopoietic stem cell-like megakaryocyte progenitors. *Cell Stem Cell.* 17 (4) (2015) 422-434.
5. L.F. Umekita, I. Mota. Role of platelets in the in vivo removal of *T. cruzi* from circulation. *Braz J. Med. Biol. Res.* 23 (6-7) (1990) 593-596.
6. A. Molina-Berríos, C. Campos-Estrada, M. Lapier, J. Duaso, U. Kemmerling, N. Galanti, et al., Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease. *Parasitol. Res.* 112 (7) (2013) 2731-2739.

7. I. Raphael, S. Nalawade, T.N. Eagar, T.G. Forsthuber. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 74 (1) (2015) 5-17.
8. P. Sandri, D.L. Aleixo, G.J.S. Falkowski, A.D. Nascimento Júnior, L.M. Gomes, L. Hernandez et al., *Trypanosoma cruzi*: Biotherapy made from trypomastigote modulates the inflammatory response. *Homeopathy*. 104 (1) (2015) 48-56.
9. C.R. Lopes, G.J.S. Falkowski, C.F. Brustolin, P.F. Massini, E.C. Ferreira, N.M. Moreira et al., Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Homeopathy* 105 (2) (2016) 186-193.
10. E.J. Calabrese. Hormesis: principles and applications. *Homeopathy* 104 (2) (2015) 69-82.
11. Brasil. Farmacopéia Homeopática Brasileira, third Ed., Comissão da Farmacopéia Brasileira, 2011.
12. J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, S. Rose-John. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta*. 1813 (5) (2011) 878–888.
13. D.A.L. Rodriguez, L.E. Echeverría, C.I. González, J. Martin. Investigation of the role of IL-17A gene variants in Chagas disease. *Genes and Immunity*. 16 (2015) 536-540.
14. K.M. Bonney, J.M. Taylor, M.D. Daniels, C.L. Epting, D.M. Engman. Heat-killed *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. *PLoS One*. 21 (6) (2011) e14571.
15. P. Bellavite, A. Signorini, M. Marzotto, E. Moratti, C. Bonafini, D. Oliosio. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. *Homeopathy*. 104 (2) (2015) 139-160.

Artigo 2: “Up-regulation of apoptosis accompanies clinical improvement and higher survival in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with highly diluted *Lycopodium clavatum*”

Artigo enviado para o periódico:
Experimental and Molecular Pathology

Up-regulation of apoptosis accompanies clinical improvement and higher survival in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with highly diluted *Lycopodium clavatum*

Gislaine Janaina Falkowski-Temporini^{a*}, Carina Ribeiro Lopes^a, Paula Fernanda Massini^a, Camila Fernanda Brustolin^a, Fabiana Nabarro Ferraz^a, Patricia Flora Sandri^b, Luzmarina Hernandez^c, Denise Lessa Aleixo^a, Terezinha Fátima Barion^d, Luiz Gilson Esper^d, Silvana Marques de Araújo^e.

^aPost-Graduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Brazil.

^bPost-Graduate Program in Biosciences and Physiopathology, Universidade Estadual de Maringá, Brazil.

^c Department of Morphological Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Brazil

^dHomeopath Volunteer, Maringá, Brazil.

^eDepartment of Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Brazil.

ABSTRACT

Recent evidence includes apoptosis as a defense against *Trypanosoma cruzi* infection, which promotes an immune response in the host induced by T cells, type 1, 2 and 17. Currently, there is no medicine completely preventing the progression of this disease. We investigated the immunological and apoptotic effects, morbidity and survival of mice infected with *T. cruzi* and treated with dynamized homeopathic compounds 13c: *Kalium causticum* (G_{Caus}), *Conium maculatum*, (G_{Con}), *Lycopodium clavatum* (G_{Ly}) and 7% alcohol solution (control, vehicle compounds, G_{CI}). The results demonstrate that all compounds were able to induce apoptosis in hepatocytes. *Lycopodium clavatum* presented better performance, with a higher amount of hepatocytes and splenocytes undergoing apoptosis with the higher number of apoptotic bodies in the liver, predominance of Th1 response with increased TNF- α and decreased IL-6, with higher survival, lower morbidity, with higher water consumption, body temperature, tendency to higher feed intake and weight gain. *Conium maculatum* had worse results with increased Th2 response with increased IL-4, worsening of the infection with early mortality of the animals. Together, these data suggest that highly diluted medicines modulate the immune response and apoptosis, affecting the morbidity of animals infected with a highly virulent strain of *T. cruzi*, being able to minimize the course of infection, providing more alternative approaches in the treatment of Chagas disease.

Keywords

Apoptosis, cytokine, homeopathy, *Lycopodium clavatum*, *Trypanosoma cruzi*.

Abbreviations

Th1, T helper cell type 1; Th2, T helper cell type 2; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IFN- γ , IL-6, Interleukin 6; IL-4, Interleukin 4.

1. INTRODUCTION

Approximately 7-8 million people in the Americas are estimated to be carriers of Chagas disease, with approximately 12,500 deaths per year in the last two decades [1]. Recently, the largest multi-center clinical study ever conducted regarding Chagas disease, BENEFIT, demonstrated that the currently available drug is not able to protect the progression of infection, stimulating new researches [2]. The search for a compound that stimulates the immune system has been the research subject for new therapies for this infection [3].

Trypanosoma cruzi infection releases numerous chemical mediators [4] with the participation of T-cells that, by expressing TNF- α , become highly susceptible to undergo apoptosis in order to control the morbidity of infection [5]. Expression of IL-4 signals increased susceptibility of the host against *T. cruzi* infection [6], and increased Th17 intensifies the infection [7]. Therefore, some biomarkers such as chemokines and cytokines are associated with progression of infection and lower survival [8,9,10], while the stimulus of defense cells, megakaryocytes and Kupffer cells, are related to higher survival of the host [3].

The host cell integrity allows the survival of the pathogen [11]. Activation of the programmed cell death seems to limit the progression of infection [12]. The involvement of the innate immune response and activation of caspase-8 as a mechanism of cellular defense against the spread of the parasite in infected organ were recently demonstrated [13,14], using the counterbalance of this pathway with less aggressive power when compared to other mechanisms of cell death, where there is release of several inflammatory mediators [15,16].

The use of dynamized, highly diluted compound, i.e., above the Avogadro constant (6.02×10^{23}), has been shown to stimulate the immune system in mice infected with *T. cruzi*, maintaining homeostasis, positively altering the course of infection [3,17].

Modulation of Th1, Th2 and Th17 responses and apoptotic profile has been the subject for therapeutic approaches [10,18]. However, some mechanisms still remain unanswered [19] and a broad understanding of the immune response is required for proposing strategic interventions, minimizing injuries in infected hosts [20].

The resistance to infection involves immunoregulatory mechanisms that can be induced to maximize response against the parasite, for example apoptosis. However, immunomodulation of host in activation of apoptotic signaling pathways remains a challenge in the search for the proposition of effective protection against *T. cruzi* infection [14,20]. Thus, in this study we evaluated the levels of cytokines Th1, Th2, Th17 and the biological response profile of apoptosis in survival of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with different highly diluted compounds, above the Avogadro constant.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental design

The experiment was performed twice as a blind, controlled, and randomized trial. Healthy, eight weeks-old, Swiss male mice, from the Central Vivarium at the Universidade Estadual de Maringá, were used. The experimental procedures were approved by the ethics committee, conducted in accordance with animal testing research and humane endpoint guidelines (protocol 54/2011- CEAE/UEM). The research adhered to the principles enunciated in the 8th Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, 2011. The animals were kept in the sectorial experimentation laboratory for one week before the beginning of the experiment, for adaptation. Temperature and humidity conditions were controlled, with artificial lighting photoperiod of 12 h (light/dark), with water and food *ad libitum*. The groups were randomly divided, so that the average weight of each group was not statistically different from each other. The animals were infected intraperitoneally with 1,400 blood trypomastigotes of *T. cruzi* - Y strain [22]. Groups according to treatment with dynamized homeopathic compounds 13c (dilution 1:10²⁶): G_{Caus} - Group treated with *Kalium Causticum* 13c (n=10), G_{Con} - Group treated with *Conium maculatum* 13c (n=11), G_{Ly} - Group treated with *Lycopodium clavatum* 13c (n=10), G_{CI} - Group treated with the vehicle for medicine preparation (alcohol solution 7%) (n=11).

2.2. Dynamized compounds

Compounds selection

The compounds were selected by repertorization, in healthy animals [23,24], by observing the idiosyncratic characteristics of the group, considering general behavior, socialization and physiology. The observation of the animals was performed by three homeopaths for 30 minutes in a silent environment, from 19:00 to 19:30, considering the nocturnal activity for rodents. The characteristics were added to the Lynx Expert System Software (Albuquerque, USA), which recorded three compounds: (1) *Kalium Causticum*, (2) *Conium maculatum*, (3) *Lycopodium clavatum*. The compounds were selected considering the Law of Similitude in accordance with conventional homeopathic clinical practice described by Hahnemann [25]. The most notable collective characteristics in the animals were coexistence, fear, conscientiousness, shyness, high frequency in water intake in small quantity, diminished vision, hearing and keen sense of smell. The compounds *Kalium causticum*, *Conium maculatum* and *Lycopodium clavatum* encompassed these characteristics to reestablish the balance of the biological system against considerable disturbances in the bioimmunophysiological system [25], caused, in this case, by *T. cruzi* infection. In Homeopathic Materia Medica [24], these compounds may be related to clinical conditions similar to pathological events observed in *T. cruzi* infection. *Kalium causticum* may be correlated to myasthenia; *Conium maculatum*, with anorexia. In addition, *Lycopodium clavatum* may be correlated with bowel disease [24] showing an effect in the treatment of rats infected with *Trypanosoma cruzi*, protecting intestinal neurons and modifying the immune response profile in treated animals [26]. The compounds were prepared in dynamization 13c (dilution 1:10²⁶), by understanding the experimental murine infection by *T. cruzi* as an acute pathology and considering Swiss mice as small animals [27].

Preparation of compounds

The compounds *Kalium causticum*, *Conium maculatum* and *Lycopodium clavatum* were prepared from the mother tincture diluted in grain alcohol at 70% (Agro-Industrial Tarumã Ltda, São Pedro do Turvo, Brazil) until 12c dynamization [27]. The dynamization used for the compounds was prepared (13c) in 7% alcohol, using

mechanical dynamizer (AUTIC® Mod. Denise). 7% Alcohol, the vehicle for compounds, was used as control.

Biological risk

Biological risk was determined by inoculating five healthy mice/group, male, 8 weeks old, with 0.1 mL of each compounds (*Kalium causticum*, *Conium maculatum* and *Lycopodium clavatum*) intraperitoneally, to assess the possible biological response to the medicine. For 30 days, mice were assessed for weight, temperature, fur appearance, appearance of feces and mortality [28,29]. No biological effects from the compounds studied were found in these healthy mice.

Treatment regimen

The treatment was administered orally, diluted in water (1mL/100mL), offered *ad libitum* in amber bottle, overnight, two days before infection and for three days after infection, every 48 hours, in order to stimulate the biological system and ensure the action of the compound on the immune system before and after the presence of the parasite [30]. The GCI received only 7% hydroalcoholic solution, also diluted in water (1 mL/100 mL), in the same treatment regimen.

2.3. Parameters evaluated

Survival

Survival was evaluated up to 90 days after infection and the average lifespan for each group was calculated, considering the humane endpoint (minimal pain and suffering prior-to-death and well-being, in survival of the animals) for groups GCI (n=8) GCaus (n=7), GCon (n=8), GLy (n=7).

Clinical parameters

The animals were clinically assessed for five days before the infection, on the day of infection and on the 23 consecutive days after infection at a fixed time 09h00min [31]. **Quantitative analysis: Weight** - expressed in grams, it was individually evaluated on BEL engineering® - Class Mark II 500g digital balance; **Temperature** - expressed in degrees centigrade (°C), it was individually measured in the anterior region of the left thigh (less fur) using Icel, infrared digital thermometer, model TD-920.0387; **Water and feed consumption** - expressed in milliliters (mL) and grams (g), respectively.

These parameters were collectively evaluated, considering the initial value for each group subtracted from the measured value after a day of consumption. The value obtained was divided by the number of animals in order to estimate the individual values; **Amount of excreta** - expressed in grams (g), it was collectively evaluated and obtained by weighing the cage beds before use, subtracted from the weight obtained after one day of use. Feces and urine were considered together. All the sawdust to be used as bed in the experiment was dried in a kiln first. **Qualitative analysis:** it was performed using numerical category scaling, defined as: 0 for no, and 1 for yes, and we analyzed whether the animal was asleep at 8:00h, presence of diarrhea (by observing the anal region), scrotal swelling, presence of abdominal edema, fur appearance (bristly), agitation in the cage, naturally and with handling. Behavioral alterations of physiological signals were also evaluated through atypical, unpredictable alterations, without the addition of stimuli, as well as social inhibition and presence of convulsion.

Cytokines and Ratios Th1/Th2, Th1/Th17

The cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ and TNF α were measured (pg/ml) in serum (aseptic cardiac puncture) on the 8th day of infection (peak of parasites), using 3 animals per group. The measurement performed using the commercial kit BDTM Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 (CBA) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), with analysis by flow cytometer (BD FCS CantoII) following the manufacturer's instructions. Quantitation of each cytokine was obtained by using specific software (FCAP Array – Becton & Dickinson).

The ratios of cytokines Th1/Th2 (IL-2/IL-4, IL-2/IL-10, IL-6/IL-4, IL-6/IL-10, TNF α /IL-4, TNF- α /IL-10, INF- γ /IL-4, INF- γ /IL-10) and Th1/Th17 (IL-2/IL-17, IL-6/IL-17, TNF- α /IL-17, INF- γ /IL-17) were calculated by dividing the values obtained for cytokines Th1 by the values of cytokines Th2 or Th17 of each animal, calculating the mean after.

Apoptosis - In situ detection of DNA fragmentation

On the 8th day of infection, three animals from each group were euthanized and the spleen and larger lobe of the liver were collected and fixed in 10% formol for 24 hours. Subsequently, the organs were dehydrated, diaphanized and immersed in paraffin. Each organ was subjected to 4 semi-serial sections with 5 μ m thickness, with

20 μ m of separation between them (microtome SLEE MAINZ model CUT 5062 - Mainz, Germany), and fixed in slides pre-prepared with poly-L-lysine. Detection of apoptosis was performed by the TUNEL method [32] using a commercial kit for detecting apoptosis (ApopTag® Peroxidase-Chemicon). The number of apoptotic bodies (cells containing apoptotic material phagocytosed in the liver), and splenocytes and hepatocytes undergoing apoptosis were compared. Counterstaining with Harris hematoxylin was performed. For quantitative analysis of the sections, 20 and 10 random microscopic fields/section were counted, totaling 240 and 120 fields per group, from the liver and spleen, respectively, with 40X objective in Olympus CBA microscope (Tokyo, Japan).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by comparing the different parameters between the treated groups and control group, using Student "Z" test for qualitative variables (parametric data) and the Mann-Whitney test for quantitative variables (nonparametric data) using Software Statistica 8.0. Survival analysis was performed using Logrank test and Kaplan-Meier analysis - software R.3.0.2. The significance level used for the tests was 5%.

3. RESULTS

3.1. Survival

GLy presented the longest survival time (50.1 ± 37.3) compared with GCI (26.8 ± 25.6) ($p=0.02$), GCAus (17.4 ± 2.1) ($p=0.00$) and GCon (15.4 ± 1.9) ($p=0.00$). GCon group ($15,4 \pm 1,9$) presented early mortality compared with GCI (26.8 ± 25.6) ($p=0.03$). There was no significant difference between GCI (26.8 ± 25.6) and GCAus (17.4 ± 2.1) ($p=0.63$). By the Kaplan-Meier estimator, the probability of the treated animal in GLy group surviving up to 22 days is 42.9% (CI 95% = 18% to 100%). In the GCon group, in turn, the probability of surviving up to 17 days is 12.5% (CI 95% = 2% to 78.2%); in GCAus group, the probability of surviving up to 18 days is 33.3% (CI 95% = 10.8% to 100%) and the probability of surviving 21 days is 12.5% (CI 95% = 2% to 78.2%) in GCI (Table 1 and Figure 1).

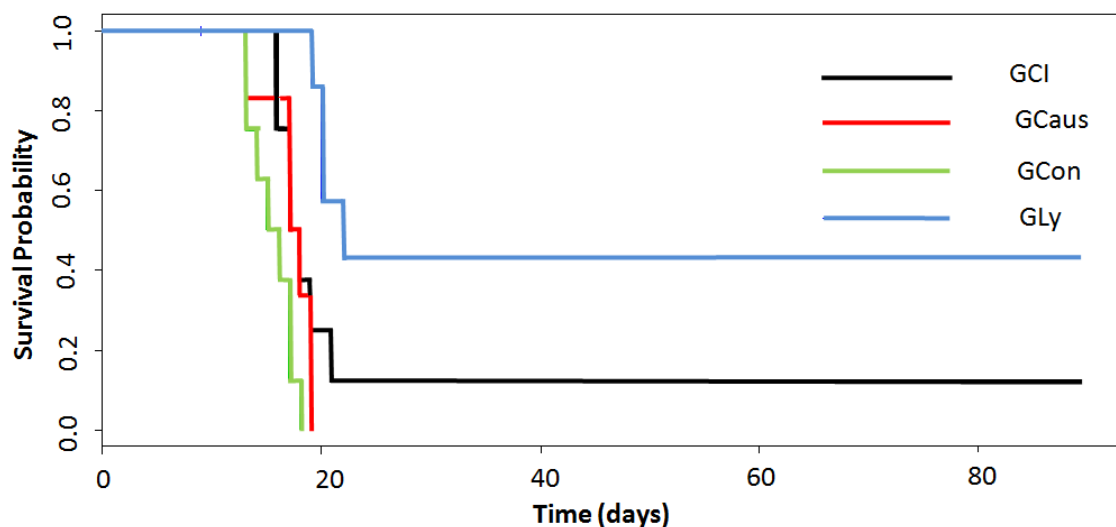


Fig. 1. Kaplan-Meier curve of mice infected with 1,400 blood trypomastigotes of Y strain of *T. cruzi*, treated with 7% alcoholic solution of highly diluted compounds (GCI), *Kalium causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy).

3.2. Clinical parameters

In the overall average of the clinical parameters, all the compounds presented a significant increase in temperature compared with GCI ($p < 0.05$) (Table 1). However, in average divided by periods of infection, only the GLy group presented a significant increase in temperature from the 6th-23rd day of infection, while GCaus presented a decrease in this parameter ($p < 0.05$) (Figure 2). GCon presented decreased feed intake from the 6th-9th day of infection compared with GCI ($p < 0.05$), and GCaus presented decrease in body weight compared with GCI from the 10th to the 13th day of infection ($p < 0.05$) (Figure 2). GLy presented higher water consumption compared with GCI from the 2nd-5th day of infection and from the 10th-13th day ($p < 0.05$) (Figure 2). In this comparison, it was observed that the animals treated with Ly showed no decrease in water or food consumption, presenting better performance than the other groups, which had significant decrease in these parameters.

The amount of excreta and presence of diarrhea had no significant difference between the groups. In the analysis of qualitative clinical parameters, GLy and GCaus presented greater drowsiness, greater genital edema and greater agitation, naturally and during handling. The bristliest fur was observed in GCon and GLy (Table 2). Social inhibition was not observed during the experiment. On the 4th day of infection, 14% of the animals (1/7) in GCaus had clonic convulsion, with observation of muscle spasms in the lower limbs.

Tab. 1. Quantitative clinical parameters and overall survival (probability) evaluated in Swiss male mice, 8 weeks-old, inoculated with 1400 trypomastigotes of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, in groups GCI, GCAus, GCon and GLy.

Groups	Temperature (°C)	Body weight (g/day)	Feed Consumption (g/day)	Water Consumption (mL)	Overall survival, probability (95% CI)
GCI	32.61±2.2	42.7±4	6.8±2.7	6.8±2.8	12.5% (2%-78%)
GCAus	33.19±2.5*	41.2±4.5	6.5±2.3	7.6±2.4	33.3% (10%-100%)
GCon	33.74±1.2*	43.4±3.8*	7.3±2.7	7.5±2.2	12.5% (2%-78%)
GLy	33.04±3.2*	41.8±4.2	7.2±2.7	7.6±2.9	42.9% (18%-100%)

Data presented as mean ± standard deviation.

* Significant differences compared with GCI ($p < 0.05$); GCAus: group treated with *Kalium Causticum* 13c; GCon: group treated with *Conium maculatum* 13c; GLy: group treated with *Lycopodium clavatum* 13c; GCI: group treated with 7% alcoholic (vehicle medicine).

CI = confidence index of 95%.

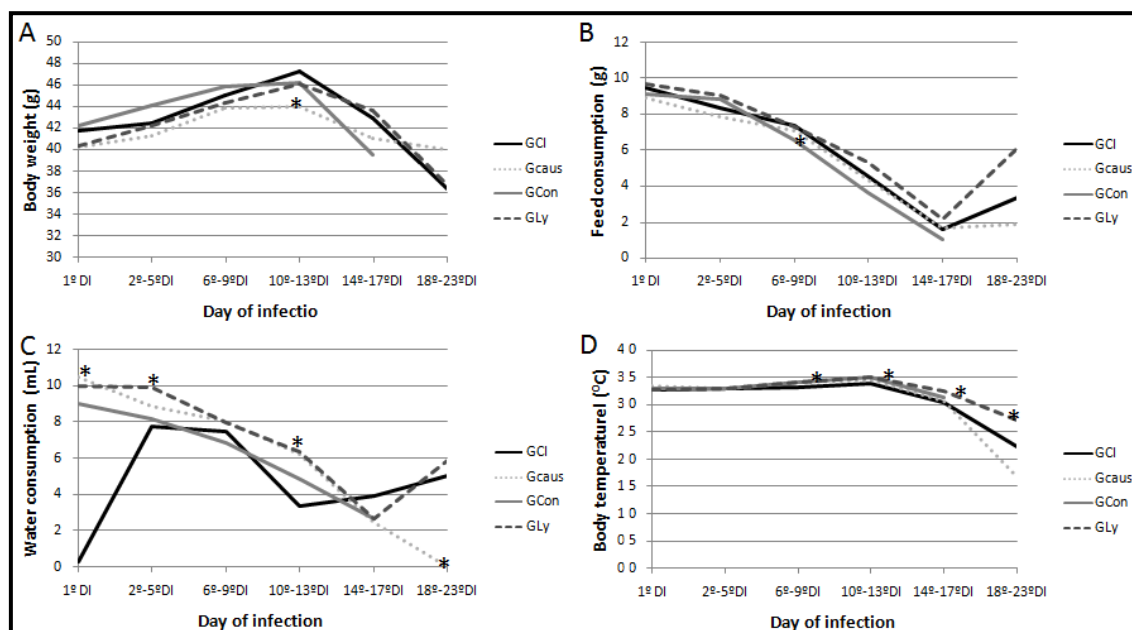


Fig. 2. A: Average body weight (g) from the 1st to the 23rd days of infection; B: Average feed intake (g) from the 1st to the 23rd day of infection; C: Average water consumption (mL) from the 1st to the 23rd day of infection; D: Average body temperature (°C) from the 1st to the 23rd day of infection of Swiss male mice, 1,400 blood trypomastigotes of Y strain of *T. cruzi*, treated with 7% alcoholic solution (GCI) of highly diluted compounds, *Kalium causticum* 13c (GCAus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). * $p < 0.05$ compared with GCI.

Tab. 2. Qualitative clinical parameters evaluated in Swiss male mice, 8 weeks-old, inoculated with 1400 trypomastigotes of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, for the groups GCI, GCaus, GCon and GLy.

Groups	Sleepiness		Genital Edema		Abdominal Edema		bristly Fur		Natural Agitation		Agitation with Handling	
	n/N (%)	P	n/N (%)	P	n/N (%)	P	n/N (%)	p	n/N (%)	P	n/N (%)	P
GCI	166/226 (73,5)	-	74/226 (32,7)	-	55/226 (24,3)	-	78/226 (34,5)	-	6/226 (2,7)	-	67/226 (29,6)	-
GCaus	150/166 (90,4)	0,0000*	85/166 (51,2)	0,0000*	52/166 (31,3)	0,0230*	99/166 (59,6)	0,9999	12/166 (7,2)	0,0000*	71/166 (42,8)	0,0399*
GCon	136/205 (66,3)	0,9999	53/205 (25,9)	0,9999	34/205 (16,6)	0,9999	37/205 (18,0)	0,0174*	8/205 (3,9)	0,9999	61/205 (29,8)	0,9999
GLy	184/224 (82,1)	0,0000*	74/224 (36,1)	0,0000*	75/224 (36,6)	0,0000*	79/224 (38,5)	0,0266*	11/224 (5,4)	0,0000*	79/224 (38,5)	0,0266*

GCI = control of infection group, treated with 7% hydroalcoholic solution of the highly diluted compounds; GCaus = treated with *Kalium Causticum* 13c, GCon = treated with *Conium maculatum* 13c; GLy = treated with *Lycopodium clavatum* 13c.

n/N: n= number of observations; N=overall number of elements in the group throughout infection.

*p significant by the Z test compared with GCI

- Reference

3.3. Cytokines and Ratio Th1/Th2, Th1/Th17

Animals treated with *L. clavatum* presented predominance of Th1 response by increased TNF- α . This group also showed a significant increase in IL-10 and decrease in IL-6, compared with the control group (p<0.05). GCon had predominance of Th2 response by the increase of IL-4 and GCAus presented decreased Th1 response by the decrease in IL-2 and IFN- γ , both compared with the control group GCI (p<0.05) (Figure 3).

Figure 4 presents details of the Ratio Th1/Th2, Th1/Th17 for the proposed groups. The animals treated with *L. clavatum* presented a Th1 response predominantly due to an increase in TNF- α (TNF- α /IL-4 and TNF- α /IL-17), while GCAus and GCon presented a decrease in Th1/Th2 ratio and GCAus in Th1/Th17 ratio.

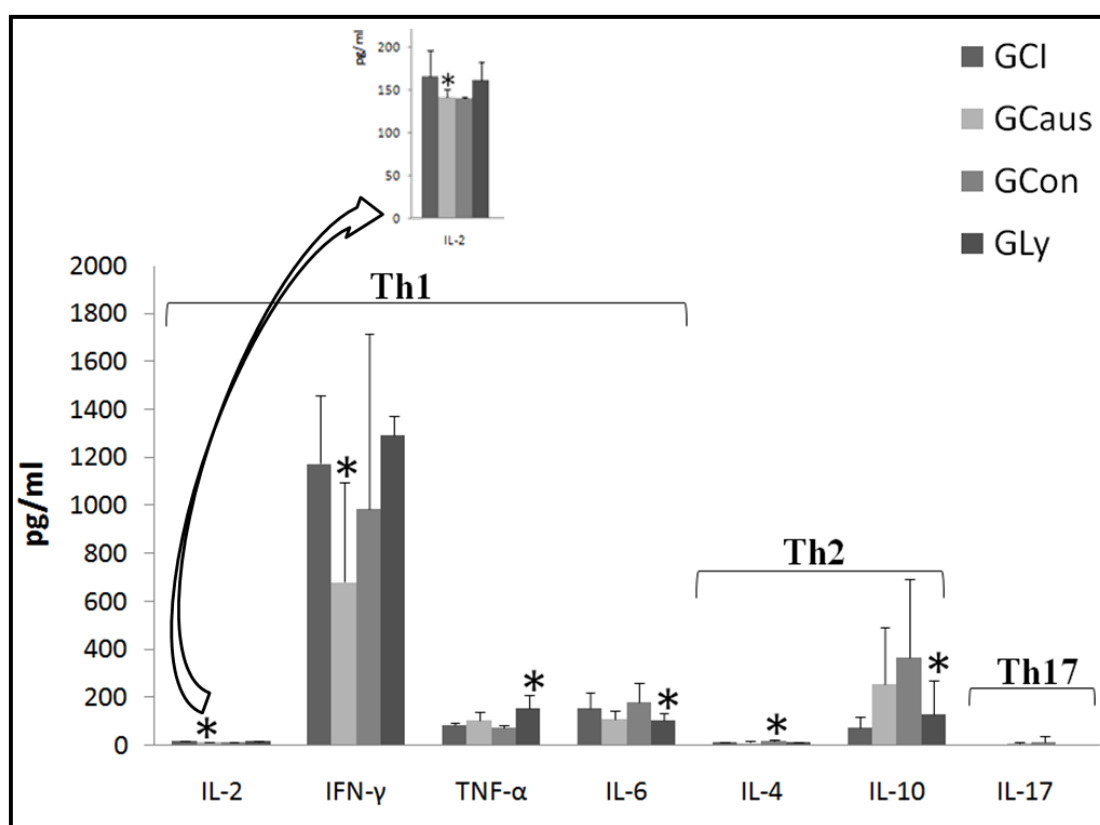


Fig. 3. Serum concentration (pg/ml) of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10 and IL-17 on the 8th day after infection in Swiss male mice, 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle of highly diluted compounds (GCI), *Kalium Causticum* 13c (GCAus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). n=3 animals per group; * p<0.05 compared with GCI between groups for the same cytokine.

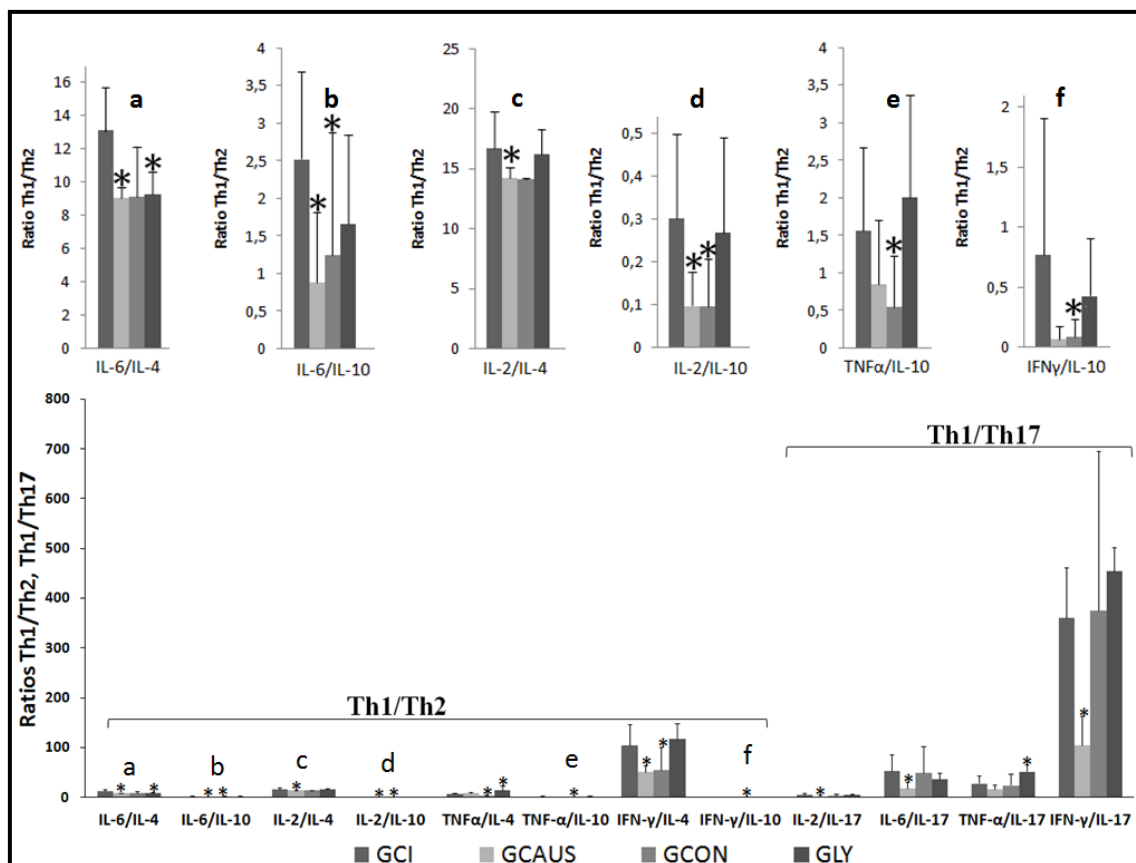


Fig. 4. Ratios of IL-6/IL-4, IL-6/IL-10, IL-2/IL-4, IL-2/IL-10, TNF α /IL-4, TNF α /IL-10, IFN γ /IL-4, IFN γ /IL-10, IL-2/IL-17, IL-6/IL-17, TNF α /IL-17, IFN γ /IL-17 (balance Th1/Th2 and Th1/Th17) on the 8th day after infection in Swiss male mice, 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle of highly diluted compounds (GCI), *Kalium Causticum* 13c (GCAUS), *Conium maculatum* 13c (GCON) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLY). n=3 animals per group; *p<0.05 compared with GCI between groups for the same relationship between cytokines. Letters a, b, c, d, e, f = individualized cytokines with better definition.

3.4. Apoptosis - In situ detection of DNA fragmentation

Detection of cells undergoing apoptosis on the eighth day of infection with *T. cruzi* in mice treated with different highly diluted compounds is described in Figure 5. GLY and GCon groups had a higher number of splenocytes and hepatocytes undergoing apoptosis compared with GCI (p<0.05). However, GCon presented a decrease in apoptotic bodies in liver compared with GCI (p<0.05), while GLY had a significant increase in apoptotic bodies in the liver compared with GCI (p<0.05). GCAUS only presented a higher number of hepatocytes in apoptosis when compared with GCI (p<0.05) (Figures 5, 6 and 7).

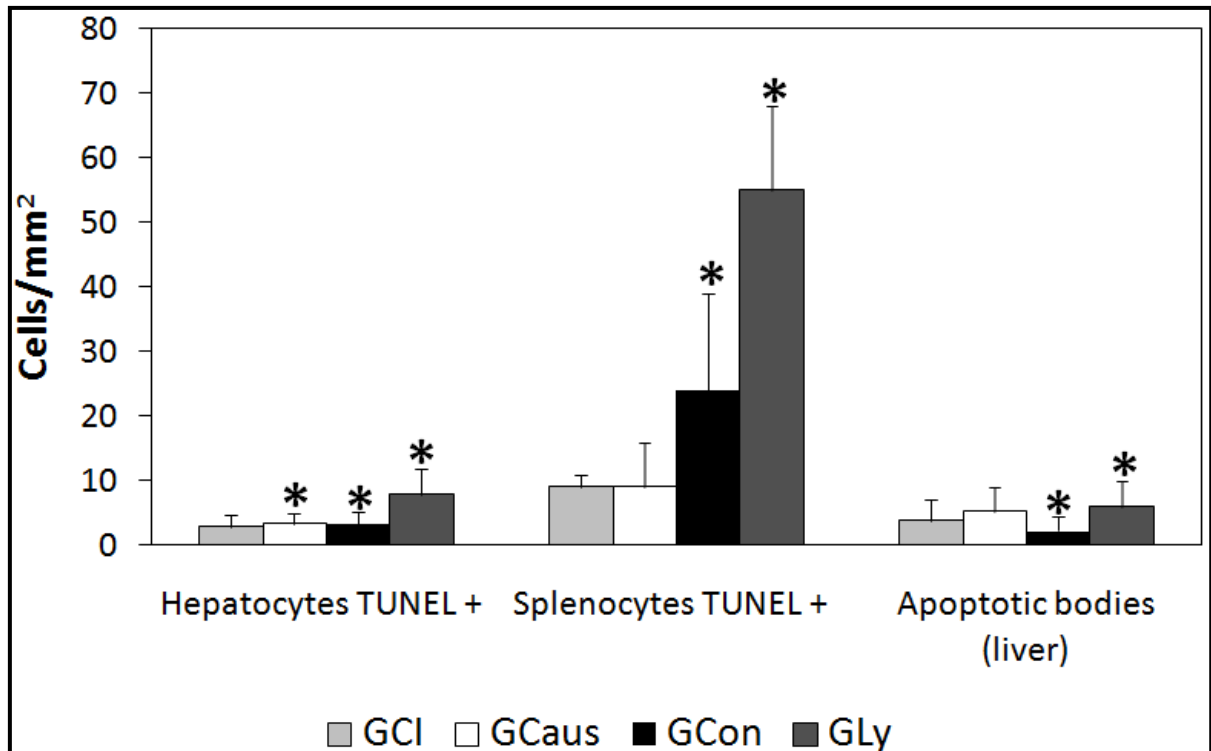


Fig. 5. Mean of the number of hepatocytes TUNEL+, splenocytes TUNEL + and apoptotic phagocytosed bodies (Liver) in histological sections of Swiss male mice, 8 weeks-old, inoculated with 1400 trypomastigotes of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* on the 8th day after infection (40X magnification). Immunohistochemistry method: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP Nick end labeling (TUNEL) and APOPTAG (Millipore). n=3 animals per group; *p<0.05 compared with the GCI for each parameter.

Hepatocytes TUNEL +: liver cells undergoing apoptosis.

Splenocytes TUNEL +: Spleen cells undergoing apoptosis.

Apoptotic bodies: cells containing apoptotic material in the liver.

GCI = control of infection group, treated with 7% hydroalcoholic solution of the highly diluted compounds; GCaus = treated with *Kalium Causticum* 13c, GCon = treated with *Conium maculatum* 13c; GLy = treated with *Lycopodium clavatum* 13c.

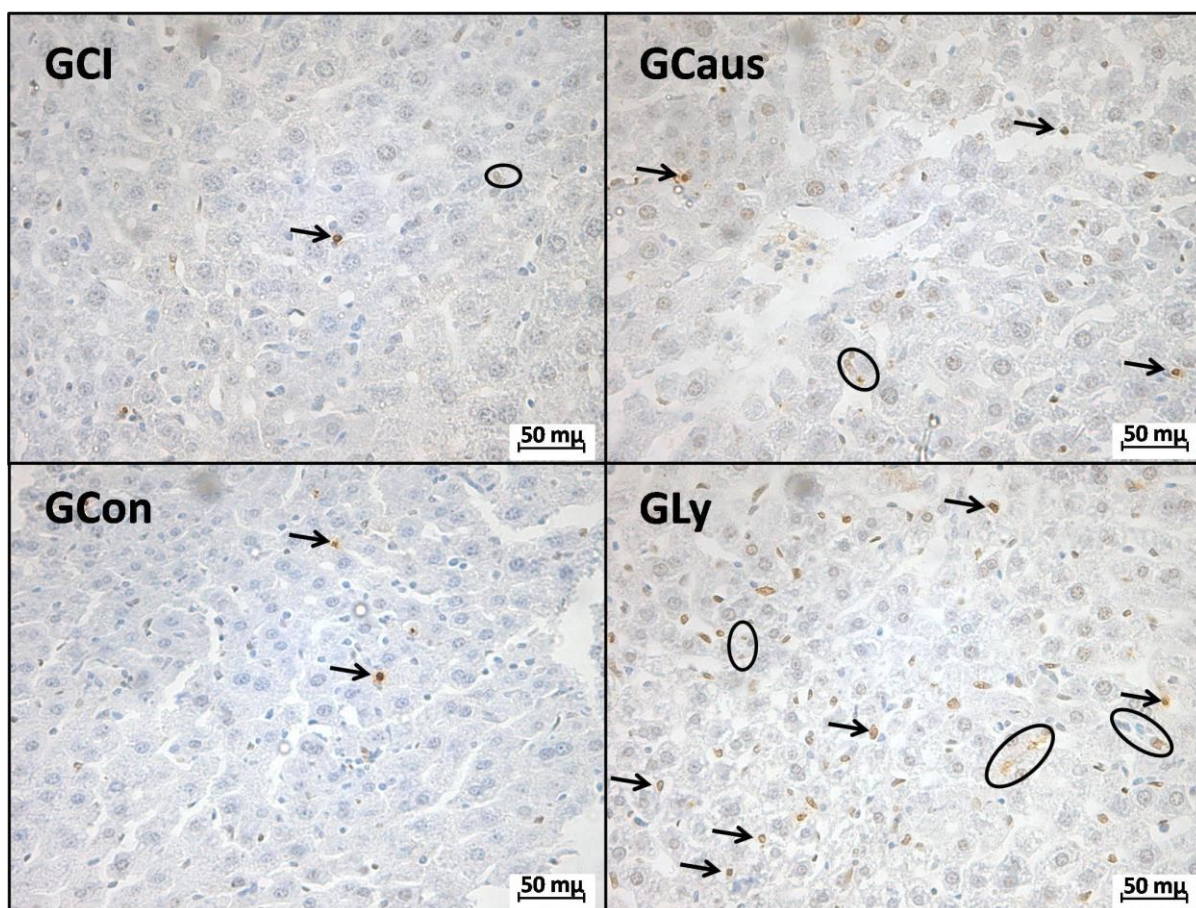


Fig. 6. Section of liver of Swiss male mice, 8th day of infection with 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle of highly diluted compounds (GCI), *Kalium causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). n=3 animals per group; Technique used: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP Nick end labelling (TUNEL) - APOPTAG (Millipore). 40x objective. Arrow (→): hepatocytes undergoing apoptosis; Oval shape (o): apoptotic bodies - phagocytic cells with phagocytic vacuole with apoptotic material.

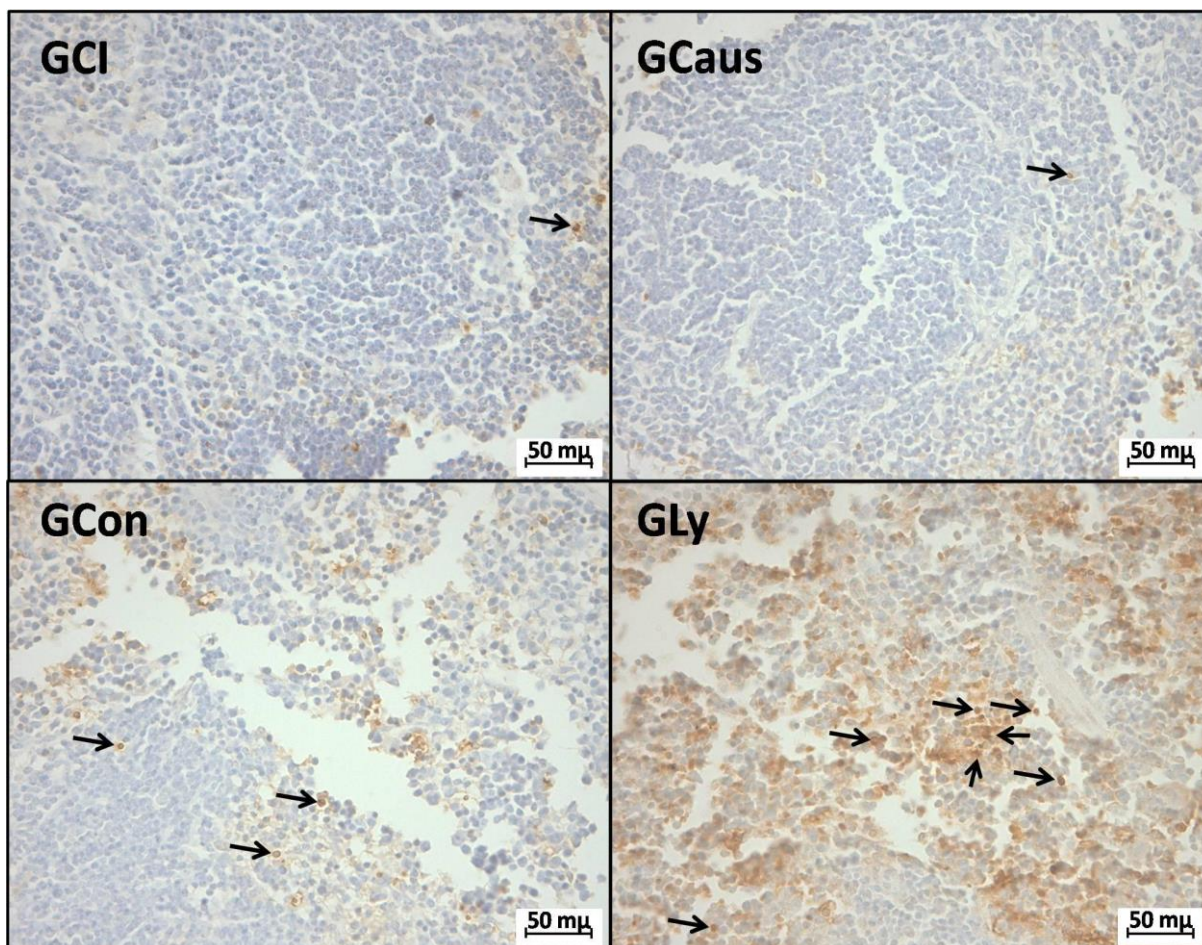


Fig. 7. Section of spleen of Swiss male mice, 8th day of infection with 1400 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* treated with 7% hydroalcoholic vehicle of highly diluted compounds (GCI), *Kalium causticum* 13c (GCaus), *Conium maculatum* 13c (GCon) and *Lycopodium clavatum* 13c (GLy). n=3 animals per group; Technique used: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP Nick end labeling (TUNEL) - APOPTAG (Millipore). 40x objective. Arrow (→): splenocytes undergoing apoptosis.

4. DISCUSSION

The murine model of infection with the Y strain of *T. cruzi* is a reference and is widely described in literature [33]. The use of this model may be useful for developing new treatments and understanding the mechanisms by which new tested compounds act [34,35]. In this study, for the first time, it was possible to verify the regulation of apoptosis and production of cytokines related to clinical improvement and survival in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with different highly diluted compounds. Our data complement studies regarding the compound *Lycopodium clavatum*, showing its positive effect on bio-immune-physiological responses with increased survival in animals susceptible to infection by highly pathogenic strain of *T. cruzi* [17, 36].

The clinical evaluation [31] of the animals infected with *T. cruzi* was an important factor to characterize and compare the morbidity in different experimental groups. However,

the assessment of clinical parameters divided into the period between the beginning of infection until the end of the patent period (23rd day of infection) was more efficient in evidencing the occurrence of clinical improvement. In GLy this improvement was significant throughout the infection, observed by the increase in temperature. A recent study, by adopting clinical evaluations during the course of infection, also observed the effect of highly diluted *Lycopodium clavatum* in mice experimentally infected with the parasite *Toxoplasma gondii* [37]. These findings help us to understand the importance of analyzing different periods of infection and not just the average of a given parameter as a whole, because the overall average of one parameter may mask the results obtained.

Although infection of Swiss mice by Y strain of *T. cruzi* is a good experimental model [38], the virulence of this strain for this lineage of mice is very high. This characteristic, in addition to the fact that Swiss mice do not constitute isogenic lineage and to the fact of having the number of experimental animals currently limited to the minimum for ethical reasons, prejudices the statistical demonstration of clinical benefits of the treatment on the experimental model used, which was definitively proved by the increased survival observed in GLy group.

In this study, aiming to statistically prove the beneficial effects of the highly diluted compounds, the evaluations of individual parameters (water and feed consumption, temperature and body weight), were performed at different periods of infection. The highest water consumption was presented by GLy (2nd-5th and 10th-13th day of infection); the lowest body weight (10th-13th day of infection) and lowest water consumption (18th-23rd day of infection) in GCaus; and lower feed intake in GCon (6^o- 9th day of infection), show the different clinical effects of highly diluted compounds in the biological system, since GLy represents the establishing of a greater physiological balance, promoting a more comfortable situation in physical and mental performance [39,40], resulting in increased motor coordination and faster cognitive reflexes [41]. The latter were also proven by the observation of increased motor activity in this group of animals, demonstrated by increased agitation which was detected, naturally and during handling, consistent with improved clinical condition.

The increased temperature in GLy from the 6th-23rd day of infection, compared with GCI, indicates benefit to the host, potentiating the immune response by increasing the mobility of leukocytes [42,43], which will generate macrophages when necessary [44]. The stimulation with highly diluted compound *L. clavatum* 13c proved to be a situation in which these defense cells and the ones involved in resistance to infection are induced. In a recent

publication, it was demonstrated that the increase of macrophages (megakaryocytes and Kupffer cells), promoted greater survival in mice infected with *T. cruzi* [3]. Thus, these data indicate that the medicine diluted beyond the Avogadro constant, indicated within the homeopathic precepts, contributed to the activation of the immune response in mice, also expressed by increased body temperature.

The immune modulation between inflammatory and anti-inflammatory cytokines has a crucial role in controlling the response against the parasite and tissue damages [13], while a high level of TNF- α increased disproportionately can cause tissue damage [18]. IL-10, on the other hand, acts as a factor of growth and differentiation of B cells, modulating the production of cytokines secreted by Th1 cells, i.e., promoting the cross-regulation of Th cells, modulating the intensity of response [44]. The diluted and dynamized compounds have the ability to modulate the immune system in mice infected with *T. cruzi*, controlling the Th1 response, not exacerbating the concentration of TNF- α , reducing the inflammatory state of the infection by this protozoan [6], causing an improvement in morbidity [3,17,44], as observed in our results through clinical improvement and increased survival. Thus, *Lycopodium clavatum* provided homeostasis information to the organism susceptible to infection, through the predominance of Th1 response, counterbalancing the Th2 response, since it was able to change information regarding the response against infection (i.e., “disease pattern”), improving the morbidity of the animals infected with a highly pathogenic strain. The balance between the cytokines with predominance of Th1 response in GLy can be clearly observed when we look at figure 3, and we found increased Th1 response (by the increase in TNF- α and decrease in Th17), and when comparing the ratio of cytokines in figure 4. We noticed that the Th1/Th17 ratio increased by increasing Th1, whereas the Th2 response was released to promote the immune balance due to the immunoregulatory action of IL-10 [3,44].

Up-regulation of Th1 influences the survival and Th2 is related to inflammatory processes [44]. However, the action of cytokines on *Trypanosoma cruzi* infection is not completely elucidated [21,45]. In this work, we demonstrate predominance of Th1 response counterbalancing the Th2 response, while we observed increased apoptosis, clinical improvement with higher survival rate in animals treated with *Lycopodium clavatum*. These results are consistent with recent studies [6, 46].

IL-6, for being able to present both anti-inflammatory and proinflammatory activity [47], possibly signaled activation of the classical pathway in this model, acting as Th2 response (anti-inflammatory), demonstrating less tissue damage in the same experimental model [17]. This happens because in conditions in which less inflammation occurs, a lower

amount of this interleukin is observed, i.e., its reduction, as observed in the GLy group, causes fewer cytotoxic effects [48,49].

In GCon, increase of Th2 response, by increased IL-4 and decrease of ratio Th1/Th2 (IL-6/IL-10, IL-2/IL-10, TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-10, INF- α /IL4, IFN- γ /IL10), demonstrates modulation that contributes to the pathogenesis of infection [50]. When comparing the ratio TNF- α /IL4 for GCon and GLy, opposite results are observed, which is consistent with the early mortality in GCon and increased survival in GLy. Furthermore, the positive balance of Th1/Th2 response and higher concentration of TNF- α , proved to be a favorable condition to the increased survival of animals treated with *Lycopodium clavatum*, which may also be associated with less inflammation and lower cytotoxicity [17, 36].

It is suggested that the increase in IL-17 (Th17) might be related to the worsening of Chagas disease [51] and Th1 expression might be related to resistance to infection [52]. Although there are still contradictions regarding the role of cytokines as modulators of *T. cruzi* infection [21], emphasizing the role of dynamic Th1/Th17 is important to understand the mechanism of progression or improvement of the infection by this protozoan [53,54]. Our results demonstrate greater benefit in GLy, expressed by the increased ratio Th1/Th17 (TNF- α /IL-17) due to increase in TNF- α . On the other hand, the decrease in ratio Th1/Th17 observed in GCaus (IL-2/IL-17, IL-6/IL-17, IFN- γ /IL-17) by decreased IL-2 and INF- γ (Th1), and no significant reduction in IL-6, was not related to increased survival compared with the control group. These data indicate that there was activation of Th1 response for GLy, while no inhibition of this immune response occurred in GCaus.

Immunosuppressive drugs have the ability to reduce the concentration of circulating IL-2 [55]. It can be understood that *Kalium causticum* promoted immunosuppression, since in GCaus there was downregulation of IL-2. This result may be related to the unfavorable clinical course and unaltered survival observed in this group compared with GCI, contrasting with the positive results observed in GLy.

Although the mechanisms of action of highly diluted compounds are not known, evidence suggests that they are related to homeostasis [56,57] by increased apoptosis and reduced inflammation in animals infected with *T. cruzi* [58]. When this induction of apoptosis does not occur, the body may use more aggressive ways to cause cell death, such as autophagy and necrosis, which damage other tissues, mainly by increased inflammation and secretion of a number of mediators [15,16].

The increase of apoptotic cells indicates a more beneficial and balanced way to deal with the infection by causing less cell damage [16]. Thus, in response to infection, only GLy

had significant, persistent increase in hepatocytes and splenocytes undergoing apoptosis, in addition to hepatocytes with apoptotic bodies inside. In future research it could be analyzed whether it also occurs in cells of animals not infected with *T. cruzi in vivo* as well *in vitro* experiments using culture of cells infected and not infected by the protozoan.

Highly diluted compounds are capable of regulating the immune system, preserving organs [59] and destroying cells with alterations [60]. Treatment with GLy activated converging pathways towards immune responses, mediated by expression and inhibition of cytokines with predominance of Th1 response and increased apoptosis, providing greater resistance to the animals, demonstrated by clinical improvement and increased survival in this group.

In summary, compounds diluted above the Avogadro constant and dynamized regulated the cytokines differently, increasing apoptosis and interfering with the morbidity with a difference in the survival of mice infected with *T. cruzi*. *Lycopodium clavatum* presented a better course of action with predominance of Th1 response by TNF- α increase counterbalancing the Th2 response and increased apoptosis, clinical improvement and higher survival, while *Kalium causticum* and *Conium maculatum* had decreased Th1 response. *Conium maculatum* promoted early mortality with increase of Th2 response by increased IL-4. Among the compounds studied, *L. clavatum* modified the functioning of the host's organism, promoting benefits, raising the possibility of using highly diluted compounds for the treatment of Chagas disease.

REFERENCES

- [1] Dias JCP, Ramos Jr. NA, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, Torres RM, et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015, Epidemiol. Serv. Saúde 25 (2016) 7-86.
- [2] Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi, Jr. A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy, N. Engl. J. Med. 373 (2015) 1295-1306.
- [3] Falkowski-Temporini GJ, Lopes CR, Massini PF, Brustolin CF, Sandri PF, Ferreira EC, Aleixo DL, Pala NR, de Araújo SM. Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*, Cytokine 88 (2016) 57-61.

- [4] Machado FS, Souto JT, Rossi MA, Esper L, Tanowitz HB, Aliberti J, et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi* - infected cardiac myocytes, *Microbes Infect.* 10(14-15) (2008) 1558-1566.
- [5] Chaves AT, Estanislau JASG, Fiuza JA, Carvalho AT, Ferreira KS, Fares RC, Guimarães PH, et al. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses, *BMC Infect. Dis.* 16 (2016) 191.
- [6] Ferraz FN, da Veiga FK, Aleixo DL, Ciupa L, de Abreu Filho BA, da Silva SS et al. Biotherapies of rabbit serum modulate the immune response and decrease parasite load in mice infected with *Trypanosoma cruzi*, *J. Appl. Biomed.* 14(3) (2016) 187-197.
- [7] dos Santos JSC, Menezes CA, Villani FN, Magalhães LM, Scharfstein J, Gollob KJ et al. Captopril increases the intensity of monocyte infection by *Trypanosoma cruzi* and induces human T helper type 17 cells, *Clin. Exp. Immunol.* 162(3) (2010) 528-536.
- [8] Rigazio CS, Hernández M, Corral RS. Cardiopathogenic mediators generated by GATA4 signaling upon co-activation with end othelin-1 and *Trypanosoma cruzi* infection, *Microb. Pathog.* 73 (2014) 47-52.
- [9] Sherbuk JE, Okamoto EE, Marks MA, Fortuny E, Clark EH, Galdos-Cardenas G, et al. Biomarkers and mortality in severe Chagas cardiomyopathy, *Glob Heart* 10(3) (2015)173-180.
- [10] Böhme J, Roßnagel C, Jacobs T, Behrends J, Hölscher C, Erdmann H. Epstein-Barr virus-induced gene 3 suppresses T helper type 1, type 17 and type 2 immune responses after *Trypanosoma cruzi* infection and inhibits parasite replication by interfering with alternative macrophage activation, *Immunology* 147(3) (2016)338-348.
- [11] de Souza EM, Araujo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM, et al. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in vitro and in vivo models, *Cell Tissue Res.* 314(2) (2003) 223-235.
- [12] Hasnain SE, Begum R, Ramaiah KV, Sahdev S, Shajil EM, Taneja TK, et al. Host-pathogen interactions during apoptosis, *J. Biosci.* 28(3) (2003) 349-358.
- [13] Liempi A, Castillo C, Carrillo I, Muñoz L, Droguett D, Galanti N, et al. A local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta: The epithelial turnover of the trophoblast, *Microb. Pathog.* 99 (2016) 123-129.
- [14] Carrillo I, Droguett D, Castillo C, Liempi A, Muñoz L, Maya JD, et al. Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection, *Exp. Parasitol.* 168 (2016) 9-15.

- [15] Zuma AA, Mendes IC, Reignault LC, Elias MC, de Souza W, Machado CR, et al. How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, Mol. Biochem. Parasitol. 193(2) (2014) 93-100.
- [16] Kumar D, Tewari-Singh N, Agarwal C, Jain AK, Inturi S, Kant R, et al. Nitrogen mustard exposure of murine skin induces DNA damage, oxidative stress and activation of MAPK/Akt-AP1 pathway leading to induction of inflammatory and proteolytic mediators, Toxicol. Lett. 235(3) (2015) 161-171.
- [17] Lopes CR, Falkowski GJS, Brustolin CF, Massini PF, Ferreira EC, Moreira NM, et al. Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*, Homeopathy 105(2) (2015) 186-193.
- [18] Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease, World J. Exp. Med. 3(1) (2013) 1-10.
- [19] Bonney KM, Engman DM. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead, Am J Pathol. 185(6) (2015) 1537-1547.
- [20] Rodrigues AA, Notário AF, Teixeira TL, e Silva RT, Quintal AP, Alves RN, et al. A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection, Acta Trop. 157 (2016) 42-53.
- [21] Nascentes GA, Hernández CG, Rabelo RA, Coelho RF, Morais FR, Marques T, et al. The Driving of Immune Response by Th1 Adjuvants in Immunization of Mice with *Trypanosoma cruzi* marinkellei Elicits a Controversial Infection Control, Vector Borne Zoonotic Dis. 16(5) (2016) 317-325.
- [22] Pereira da Silva LH, Nussenweig V. Sobre uma Cepa de *Trypanosoma cruzi* Altamente Virulenta para o Camundongo Branco, Folia Clin. Biol. 20(3) (1953) 191-208.
- [23] Zandvoort R. The Complete Repertory. Institute for Research in Homeopathic Information and Symptomatology. In: Leidschendam AJ. The Netherlands; 1994-1996.
- [24] Allen TF. The Encyclopedia of pure materiamedica. Repr., Jain B. Publishers, New Delhi, 1982.
- [25] Hahnemann CFS. Organon der Heilkunst. In: 6th ed., Heidelberg: Haug, 1989.
- [26] Araújo SM, Brustolin, CF; Massini, PF, Moreira, NM, Fontes, CER; Aleixo, DL. Exploring the modelo f murine infection by *Trypanosoma cruzi* to investigate treatment with highly diluted drugs: the influence of *Lycopodium clavatum* or *Phosphorus* in Wistar rats, Homeopathy (105) (2016) 17-18.
- [27] Bellavite P, Signorini A, Marzotto M, Moratti E, Bonafini C, Oliosio D. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects, Homeopathy 104 (2015) 139-160.

- [28] Brasil. Farmacopéia Homeopática Brasileira. In: 3th ed., Comissão da Farmacopéia Brasileira, 2011.
- [29] Braga-Silva C, Suhett CSR, Drozino RN, Moreira NM, Sant'Ana DMG, Araújo SM. Biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* reduces parasite load, improves experimental infection, protects myenteric neurons and modulates the immune response in mice with toxoplasmosis, *Eur J Integr Med* 8 (2016) 865-874.
- [30] Aleixo DL, Ferraz FN, Ferreira EC, de Lana ML, Gomes ML, de Abreu Filho BA, et al., High diluted medication reduce parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. *BMC Res. Notes.* 5 (2012) 352.
- [31] Falkowski GJS, Aleixo DL, Sandri PF, Araujo SM. Parameters for evaluation of clinical Trial in mice infected by *Trypanosoma cruzi*, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64(6) (2012) 1539-1546.
- [32] Gavrieli Y, Sherman Y, Bem-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.* 119(3) (1992) 493-501.
- [33] Coura JR. Tripanosomose, doença de chagas, *Cienc. Cult.* 55 (2003)1-7.
- [34] DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative. About Chagas disease: What is Chagas disease?, <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>.
- [35] Calabrese EJ. Hormesis: principles and applications, *Homeopathy*104 (2) (2015) 69-82.
- [36] Samadder A, Das S, Das J, Paul A, Boujedaini N, Khuda- Bukhsh AR. The potentized homeopathic drug, *Lycopodium clavatum* (5C and 15C) has anti-cancer effect on hela cells in vitro, *J. Acupunct. Meridian. Stud.*6 (2013) 180-187.
- [37] Pereira AV, Lera KRJL, Miranda MM, Drozino RN, Falkowski-Temporini GJ, Góis MB, et al. Safety and efficacy of *Lycopodium clavatum* 200dH in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Eur. J. Integr. Med.*8(4) 2016 540-545.
- [38] Araújo-Jorge TC, Modelos experimentais para o estudo in vivo da doença de Chagas: Camundongo, In: Araújo-Jorge TC, Castro SL, eds. *Doença de Chagas: Manual de experimentação animal.* Fiocruz Inc., 2000; 133-139.
- [39] Ritz P, Berrut G. The Importance of Good Hydration for Day-to-Day Health, *Nutr. Rev.*63 (2005) 6-13.
- [40] Armstrong LE, Ganio MS, Casa DJ, Lee EC, McDermott BP, Klau JF, et al. Mild dehydration affects mood in healthy young women, *J. Nutr.* 142(2) (2012) 382-388.
- [41] Ganio MS, Armstrong LE, Casa DJ, McDermott BP, Lee EC, Yamamoto LM, et al. Mild dehydration impairs cognitive performance and mood of men, *Br. J. Nutr.*106(10) (2011) 1535-1543.

- [42] Bryant RE, DesPrez RM, VanWay MH, Rogers DE. Studies on human leukocyte motility I. Effects of alterations in pH, electrolyte concentration, and phagocytosis on leukocyte migration, adhesiveness, and aggregation, *J. Exp. Med.* 124(3) (1966) 483-499.
- [43] Aleixo DL, Benvenuti MJ, Lera KRJL, Ciupa L, Ferraz FN, de Araújo SM. The Association of Ponderal Benznidazole with its Ultra-high Dilute Formula Reduces the Toxic Effects and Allows Increasing of Dose in Dose-dependent Protocol in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. High Dil. Res.* 14(3) (2015) 10-19.
- [44] Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Immunology. In: 7th ed., Elsevier: Mosby, 2007, p. 26-159.
- [45] Kumar S, Tarleton RL. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J. Immunol.* 166 (2001) 4596-4603.
- [46] Ferraz FN, Veiga FK, Aleixo DL, Silva SS, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, et al. Modulation of IFN- γ , IL-4 and IL-17 Cytokines is Related to Parasitemia Control in Mice Infected by *Trypanosoma cruzi* and Treated with Biotherapy, *J. Biol.Sci.*, 15 (2015) 251-259.
- [47] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, *Biochim. Biophys. Acta.* 1813(5) (2011) 878-888.
- [48] Zygnier W, Zygnier OG, Baška P, Długosz E. Low T3 syndrome in canine babesiosis associated with increased serum IL-6 concentration and azotaemia. *Vet. Parasitol.* 211(1-2) (2015) 23-27.
- [49] Dittrich A, Hessenkemper W, Schaper F. Systems biology of IL-6, IL-12 family cytokines. *Cytokines Growth Factor Rev.* 26(5) (2015) 595-602.
- [50] Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”, *J. Leukoc. Biol.* 92(4) (2012) 753-764.
- [51] Rodriguez DAL, Echeverría LE, González CI, Martin J. Investigation of the role of IL-17A gene variants in Chagas disease, *Genes and Immun.* 16(8) (2015) 536-540.
- [52] Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 158(4) (2001) 1433-1440.
- [53] Bonney KM, Taylor JM, Daniels MD, Epting CL, Engman DM. Heat-killed *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. *PLoS One* 21(6) (2011) e14571.

- [54] Cobb D, Smeltz RB. Regulation of proinflammatory Th17 responses during *Trypanosoma cruzi* infection by IL-12 family cytokines, *J. Immunol.* 188(8) (2012) 3766-3773.
- [55] Nazary M, van der Zee HH, Prens EP, Folkerts G, Boer J. Pathogenesis and pharmacotherapy of Hidradenitis suppurativa, *Eur. J. Pharmacol.* 672(1-3) (2011) 1-8.
- [56] Sikdar S, Mukherjee A, Ghosh S, Khuda-Bukhsh AR. Condurango glycoside-rich components stimulate DNA damage-induced cell cycle arrest and ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis through inhibition of cell-proliferation in lung cancer, *in vitro* and *in vivo*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37 (2014) 300-314.
- [57] Preethi K, Ellanghiyil S, Kuttan G, Kuttan R. Induction of apoptosis of tumor cells by some potentiated homeopathic drugs: implications on mechanism of action, *Integr. Cancer Ther.* 11 (2012) 172-182.
- [58] Sandri P, Aleixo DL, Sanchez Falkowski GJ, Nascimento Júnior AD, Gomes ML, Hernandez L, et al. *Trypanosoma cruzi*: Biotherapy made from trypomastigote modulates the inflammatory response. *Homeopathy*, 104(1) (2015) 48-56.
- [59] Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. In: Truyens C and Yves C (Coord.). *Immunology: Host - Parasite Interaction*, Elsevier, London, UK, 2010, p. 601-641.
- [60] Tang L, Shen H, Li X, Li Z, Liu Z, Xu J, et al. MiR-125a-5p decreases after long non-coding RNA HOTAIR knockdown to promote cancer cell apoptosis by releasing caspase 2, *Cell Death Dis.* 7 (2016) e2137.

Artigo 3: “Associação de medicamentos homeopáticos promove diminuição da parasitemia e melhora clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*.”

Artigo a ser enviado para o periódico:
International Journal of High Dilution Research

Associação de medicamentos homeopáticos promove diminuição da parasitemia e melhora clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Resumo

Medicamentos homeopáticos constitucionais são utilizados para desencadear reações no organismo, diminuindo a suscetibilidade mórbida, enquanto que os medicamentos organoterápicos têm como princípio a identidade biológica, restabelecendo a função do órgão através do homólogo sadio. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação do medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* com organoterápicos de baço e coração de camundongos sadios, sobre aspectos parasitológicos e clínicos da infecção murina por *Trypanosoma cruzi*. Em ensaio cego, controlado e randomizado, 42 camundongos suíços, machos, 8 semanas foram infectados IP com 1400 tripomastigotas cepa Y de *T. cruzi* e divididos em grupos: GLB – tratado com *L. clavatum* e organoterápico de baço 13c (n=10), GLC – tratado com *L. clavatum* e organoterápico de coração 13c (n=10), GLBC – tratado com *L. clavatum*, organoterápicos de baço e coração 13c (n=11) e GCI tratado com (solução hidroalcoólica 7%) veículo de preparação dos medicamentos (n=11). Os medicamentos foram preparados segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira. O tratamento com o *L. clavatum* foi realizado 2 dias antes da infecção, e 2, 4 e 6 dias após a inoculação. O *L. clavatum* foi associado ao organoterápico 2 dias após a inoculação. Os medicamentos e seu veículo foram oferecidos diluídos em água (1mL/100mL) *ad libitum*, em bebedouro âmbar durante 16 horas. Os grupos experimentais foram estatisticamente comparados através de parâmetros parasitológicos, clínicos e sobrevida. A parasitemia total foi significativamente menor em GLB e GLBC em relação ao GCI ($p < 0,05$). O GLBC apresentou pico de parasitos significativamente menor que todos os grupos avaliados e o maior PPP (período pré-patente) em relação ao GCI ($p < 0,05$). O GLBC e GLB tiveram maior temperatura e peso corporal em relação ao GCI ao longo da infecção ($p < 0,05$). No entanto, o aumento do consumo de ração foi significativamente maior somente no GLBC em relação ao GCI no fim do período patente ($p < 0,05$), demonstrando estado mais saudável em relação aos demais grupos. Os resultados sugerem que as associações do medicamento constitucional ao organoterápico de baço mais coração, melhoram a morbidade, com melhora clínica e redução parasitária em camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi* que é altamente patogênica. Os resultados encorajam o uso de medicamentos homeopáticos no tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, homeopatia, organoterápico, parasitemia, menor morbidade.

1. Introdução

A doença de Chagas representa um grave problema de saúde pública na América Latina, com estimativa de 10.000 óbitos/anos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), representando um gasto de US\$ 7 bilhões/ano (1). Os medicamentos disponíveis apresentam diversos efeitos adversos e baixa adesão pelos pacientes, havendo a necessidade de se desenvolver medicamentos mais eficientes e com menos efeitos colaterais. No Brasil, pesquisas envolvendo a homeopatia são incentivadas considerando a aprovação da Portaria do Ministério da Saúde n.971/2006, regulamentando a abordagem da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema único de Saúde (SUS).

A homeopatia tem sido pesquisada como forma integrativa e complementar de tratamento de diversas doenças, via estímulos de resposta biológica. Medicamentos homeopáticos constitucionais são utilizados para desencadear reações no organismo, diminuindo a suscetibilidade mórbida, enquanto que os medicamentos organoterápicos (preparados a partir de órgãos de animal sadio) têm como princípio a identidade biológica, restabelecendo a função do órgão doente através do homólogo sadio (2,3).

A literatura é carente de informação científica que aborde os efeitos destes medicamentos. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação do medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* com organoterápicos de baço e coração de camundongos sadios, sobre aspectos parasitológicos e clínicos da infecção murina por *Trypanosoma cruzi*.

2. Materiais e métodos

2.1. Ética

O laboratório onde foi realizada a pesquisa é credenciado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CEUA/UEM) e adere aos princípios enunciados na 8ª edição do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, 2011. O Estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEE-UEM), protocolo 54/2011.

2.2. Delineamento experimental

O estudo foi realizado em ensaio cego, controlado e randomizado por sorteio. Foram utilizado 42 camundongos suíços, machos de 8 semanas de idade provenientes do Biotério Central/UEM, mantidos em biotério setorial de experimentação (laboratório de parasitologia)

por uma semana antes do início da pesquisa para ambientalização, sob temperatura, umidade e iluminação controladas com água e ração *ad libitum*.

2.3 Grupos experimentais

Os grupos foram divididos de forma randomizada, de modo que o peso médio para cada grupo não tivesse diferença estatística significativa entre si. Os animais foram infectados por via intraperitoneal com 1.400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. Foram constituídos os grupos: GLB – tratado com *L. clavatum* e organoterápico de baço 13c (n=10), GLC – tratado com *L. clavatum* e organoterápico de coração 13c (n=10), GLBC – tratado com *L. clavatum*, organoterápicos de baço e coração 13c (n=11) e GCI Grupo tratado com veículo de preparação do medicamento (solução hidroalcoólica 7%) (n=11).

2.4. Seleção e preparo do medicamento constitucional

O medicamento foi selecionado a partir da repertorização de animais não infectados, de acordo com Zandvoort (4) e Matéria Médica Homeopática (5), observando as características idiossincráticas do grupo, considerando comportamento, socialização e fisiologia. A observação dos animais foi realizada por três homeopatas, durante 30 minutos em ambiente silencioso, das 19:00 às 19:30, considerando o período noturno de atividade para roedores. As características foram inseridas no Software Lince Expert System (Albuquerque, EUA), chegando ao consenso de três medicamentos (*Kalium causticum*, *Conium maculatum* e *Lycopodium clavatum*), sendo que o *Lycopodium clavatum* cobriu o maior número de características da repertorização, assim foi associado ao organoterápico (6,7). Este medicamento foi escolhido considerando a Lei de Similitude de acordo com a prática clínica convencional descrita por Hahnemann (8).

O *Lycopodium clavatum* (Deutsche Homöopathie-Union, Alemanha) foi preparado a partir da tintura mãe diluído com álcool de cereais (Agro-Industrial Tarumã Ltda, São Pedro do Turvo, Brasil) a 70% até a dinamização 12c (9). A dinamização de uso dos medicamentos (13c) foi preparada em álcool 7 %, utilizando dinamizador mecânico (Dinamizador AUTIC®).

2.5. Seleção e preparo dos medicamentos organoterápicos

As características reticulotrópicas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram consideradas para o tropismo no baço, fígado e coração (10) e selecionou-se o medicamento

preparado a partir de fragmentos frescos de coração e baço sadios de camundongos suíços de 8 semanas.

Os organoterápicos foram preparados a partir do macerado de seus respectivos órgãos e diluídos com álcool de cereais (Agro-Industrial Tarumã Ltda, São Pedro do Turvo, Brasil) a 70% até a dinamização 12c (9). A dinamização 13c de uso dos medicamentos foi preparada em álcool 7% (9).

2.6. Controle de infecção

Como controle foi utilizado o álcool 7%, veículo de preparação dos medicamentos, de acordo com a Farmacopéia Homeopática Brasileira (9).

2.7. Esquema de tratamento

Todos os grupos receberam o tratamento com o *L. clavatum* 2 dias antes da infecção e 2, 4 e 6 dias após a inoculação. Segundo prática clínica, o *L. clavatum* foi associado ao organoterápico 2 dias após a inoculação. Os medicamentos e seu veículo foram sucussionados e oferecidos diluídos em água (1mL/100mL) *ad libitum*, em bebedouro âmbar, over night, durante 16 horas (11).

Os medicamentos foram preparados na dinamização 13c (diluição 1:10²⁶) entendendo a infecção experimental murina por *T. cruzi* como uma patologia aguda e considerando os camundongos suíços como animais de pequeno porte (12).

2.8. Parâmetros avaliados

Parâmetros Parasitológicos

A parasitemia foi avaliada segundo técnica de Brener (13), com contagem diária de parasitos a partir do primeiro dia de infecção, até resultado negativo por três exames consecutivos ou até a morte do animal. A curva de parasitemia foi traçada utilizando a parasitemia média para cada grupo. A partir da curva de parasitemia foram obtidos período pré-patente (PPP - tempo entre a inoculação e o primeiro dia de positividade no exame de sangue a fresco), período patente (PP – tempo médio, em que o parasito foi detectado no sangue), pico máximo de parasitemia (PMax - maior parasitemia média observada) e parasitemia total (PT - média da soma da parasitemia de cada camundongo ao longo do experimento).

Parâmetros clínicos

Os animais foram avaliados durante cinco dias antes da infecção, no dia da infecção e 27 dias consecutivos após a infecção em horário fixo (14). Os seguintes parâmetros foram avaliados: **Peso** - expresso em grama (g), avaliado individualmente em balança digital BEL engineering® - Class Mark II 500g; **Temperatura** - expressa em grau centígrado (°C), medida individualmente na região anterior da coxa traseira esquerda (menor quantidade de pêlos) utilizando termômetro infravermelho digital Icel (modelo TD-920.0387); **Consumo de água e ração** - expressos em mililitro (mL) e grama (g), respectivamente. Avaliados coletivamente, considerando o valor inicial oferecido ao grupo subtraído do valor medido após um dia de consumo. O valor obtido foi dividido pelo número de animais para estimar valores individuais; **Quantidade de excretas** - expresso em grama, foi obtido pela pesagem da cama das gaiolas antes do uso subtraída do valor da pesagem após um dia de uso. Foram consideradas fezes e urina conjuntamente; **Análise qualitativa**: foi realizada utilizando categorias numéricas definidas como: zero para não e 1 (um) para sim, sendo analisado a agitação do animal durante a análise.

Análise de sobrevivência

Foi avaliada até 85 dias após a infecção e calculado o tempo médio de vida para cada grupo, considerando GLB (n=7), GLC (n=7), GLBC (n=8), GCI (n=8).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela comparação dos diferentes parâmetros entre os grupos tratados e controle, utilizando teste “t” de Student (dados paramétricos) e o teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos), utilizando o Software Statistic 8.0. A análise de sobrevivência foi realizada com o teste Logrank - programa R.2.10.0. O nível de significância adotado nos testes foi de 5%.

3. Resultados

Parâmetros Parasitológicos

A parasitemia total foi significativamente menor em GLBC e GLB comparada a GCI ($p < 0,05$). (Figura 1, Tabela 1). Os três grupos que receberam medicamentos altamente diluídos apresentaram menor pico de parasitos no 8º dia de infecção quando comparados ao GCI ($p < 0,05$). GLBC apresentou o maior período pré-patente em relação a todos os grupos ($p < 0,05$). GLB apresentou maior período patente em relação ao GCI ($p < 0,05$). No entanto,

embora não significativa, o grupo GLB e GLBC demonstraram estimativa de tempo de sobrevivência de 11,8 dias e 10,6 dias, com 14% e 12% dos animais vivos respectivamente (Figura 2).

Tabela 1. Parâmetros parasitológicos em camundongos Swiss, machos, oito semanas, infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y, tratados com associação de medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* 13c (L), organoterápicos de baço (B), organoterápico de coração (C) e com solução hidroalcoólica a 7% (GCI).

Grupos	PPP (dias)	PP (dias)	PMax (x10 ⁶)	P _{total} (x10 ⁶)	Estimativa de sobrevivência (dias)
GCI	4,1±0,3	10,8±4,6	7,6±2,5	12±4	25
GLC	4,1±0,3	11,3±5,2	6,0±1,8*	12±4,8	25
GLB	4,1±0,3	13±5*	5,4±2,2*	10,3±4,0*	85
GLBC	4,7±0,9*	10,2±4,4	4,2±1,9*	7,5±2,7*	85

*Diferenças significativas em relação ao GCI (p<0,05); Dados apresentados com média mais ou menos o desvio padrão. PPP (período pré-patente), PP (período patente), PMax (pico máximo de parasitos no 8º dia de infecção), Ptotal (parasitemia total).

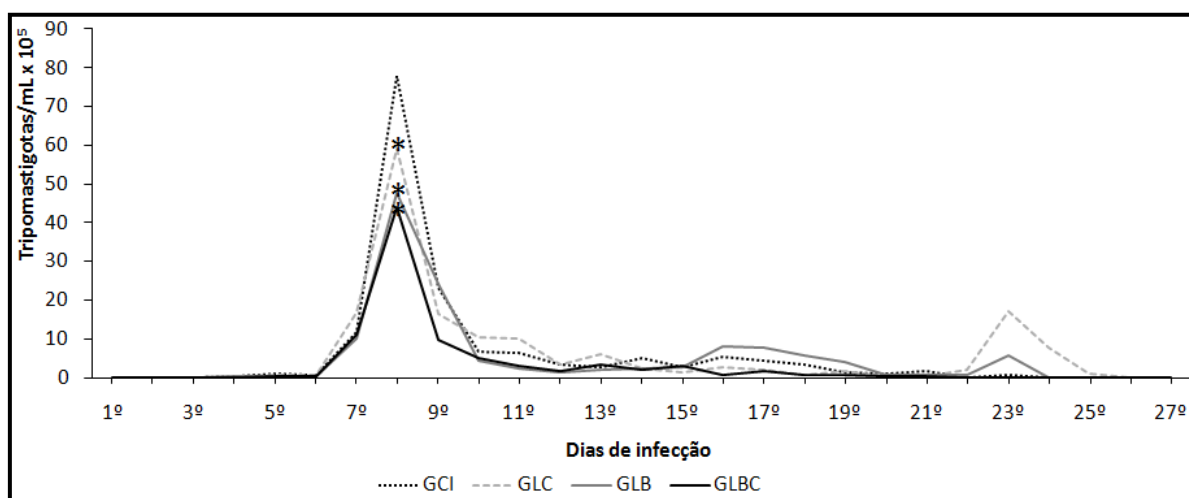


Figura 1 – Curva de parasitemia média de camundongos “Swiss” machos, 8 semanas de vida, submetidos ao inoculo com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com solução hidroalcoólica a 7% GL (GCI); *Lycopodium clavatum* e organoterápico

de coração (GLC); *Lycopodium clavatum* e organoterápico de baço (GLB); *Lycopodium clavatum*, organoterápico de baço e coração (GLBC). * $p < 0,05$.

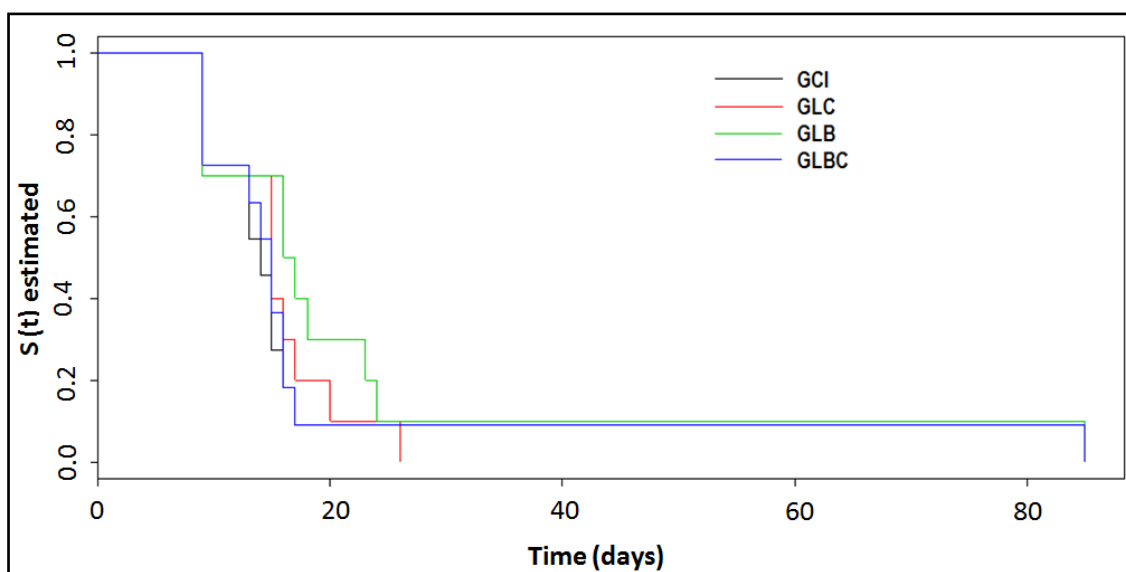


Figura 2 – Análise de sobrevivência de camundongos submetidos ao inoculo com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, tratados com solução hidroalcoólica a 7° GL (GCI); *Lycopodium clavatum* e organoterápico de coração (GLC); *Lycopodium clavatum* e organoterápico de baço (GLB); *Lycopodium clavatum*, organoterápico de baço e coração (GLBC).

Parâmetros Clínicos

A tabela 2 resume os dados dos parâmetros clínicos obtidos. O grupo GLBC apresentou melhora na condição clínica, expressa pelo aumento da temperatura, maior quantidade de ração consumida e ganho de peso corporal em relação a GCI ($p < 0,05$).

Os grupos GLB e GLBC apresentaram temperatura corpórea mais elevada do que GCI, desde o início da infecção até o 19° dia após a inoculação ($p < 0,05$), enquanto que GLC apresentou aumento de temperatura em relação ao GCI do início da infecção até o 13° dia após a inoculação ($p < 0,05$).

O ganho de peso foi observado nos grupos GLBC e GLB em comparação ao GCI no final do período patente, correspondente ao 20-25 dias de infecção ($p < 0,05$). Em contrapartida, o GLC apresentou redução deste parâmetro neste mesmo período em relação ao GCI ($p < 0,05$).

Durante o período do início da infecção até o 8° dia de infecção, correspondente ao maior pico de parasitos circulantes, houve aumento do consumo de água em todos os grupos tratados com os medicamentos altamente diluídos em relação ao GCI ($p < 0,05$).

O maior consumo de ração foi observado no grupo GLBC em relação ao GCI no final do período patente (20-25º dias de infecção) e a maior quantidade de excretas foi observada nos grupos GLB e GLBC do 9º ao 13º dias de infecção em relação ao GCI ($p < 0,05$).

No parâmetro qualitativo, a maior agitação dos animais apenas pode ser observada no grupo GLBC em relação ao GCI ($p < 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros clínicos em camundongos Swiss, machos, oito semanas, infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y, tratados com associação de medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* 13c (L), organoterápicos de baço (B), organoterápico de coração (C) e com solução hidroalcoólica a 7% (GCI).

Grupos	Dia de Infecção	Temperatura corporal (°C)	Peso (g)	Água (mL)	Ração (g)	Excretas (g)
GCI	0-8	32,7±1,2	43,5±3,8	10±1,3	8,2±1,2	8,9±3,5
	9-13	31,6±0,9	41,7±3,7	4,9±1,5	2,2±1	3,3±0,5
	14-19	28,4±2,1	37,2±4	4,9±4,3	2,7±1,9	5,7±3
	20-25	29,6±1,8	34,5±1,7	15±0	3,9±2,1	11,7±2,8
GLC	0-8	33,4±1,5*	42,7±3,2	10,7±1,4*	8,8±1,2*	9,5±4
	9-13	32,5±0,7*	44±3,5	5,2±1,8	2,9±1,4	3,8±0,4
	14-19	28,4±1,5	38,4±4	2,9±2	2,1±0,9	3,8±2,5
	20-25	28,5±1,8	31,1±2,8*	10±4,4	4,3±2,1	9,7±3,7
GLB	0-8	33,6±1,2*	43,6±3,2	10,6±1*	8,6±1,3	9,7±3,7
	9-13	33,2±0,9*	45,8±4,4*	5,9±2,4	3,6±1,6*	4,6±0,2*
	14-19	29,8±1,8*	41,1±4,2*	2,8±1,7	2,1±1,2	3,6±0,8
	20-25	30,3±1,7	38,5±2,1*	7,2±0,8	4,2±0,7	4,7±0,4
GLBC	0-8	33,8±1*	42,6±3,5	10,4±1,2*	7,8±0,7*	8,7±3,3
	9-13	32,7±1,2*	42,8±3,5	6±2,7	3,2±1,6*	3,8±1,3*
	14-19	30,2±1,3*	38±1,2	5±4,4	2,4±2,3	5,1±2,7
	20-25	28,4±2,8	37,4±1,2*	11,2±2,3	7,5±2,6*	10,5±3,9

*Diferenças significativas em relação ao GCI ($p < 0,05$) em mesmo período avaliado.

4. Discussão:

Ao reduzirem a parasitemia, os medicamentos altamente diluídos interferiram no curso da infecção, proporcionando estímulo inicial de controle, induzindo o organismo a promover alterações fisiológicas de contra-regulação através de mecanismos homeostáticos (15).

O benefício do bioterápico de baço e coração associados ao medicamento constitucional (grupo GLBC) pôde ser verificado através do maior PPP observado ($p < 0,05$), da menor parasitemia com menor pico de parasitos em relação a todos os grupos avaliados (Tabela 1). A tendência a aumentar o PPP e não aumentar o PP foi demonstrado em trabalhos anteriores, significando benefício para animais tratados, indicando o controle da infecção (11,16) em modelo animal extremamente sensível à cepa de *T. cruzi* utilizada (6).

A melhor condição clínica apresentada por GLBC, expressa pelo aumento da temperatura, maior consumo de ração e ganho de peso corporal em relação ao GCI ($p < 0,05$) representa maior homeostase (17). Embora GLB tenha apresentado maior ganho de peso em relação ao GCI, a intervenção não foi suficiente para promover estado final mais saudável, como ocorreu em GLBC que apresentou aumento significativo do consumo de ração em relação ao GCI ($p < 0,05$) no fim do período pré-patente.

A ingestão de alimento aumentada demonstra a melhor evolução clínica dos animais (18). A maior agitação apresentada em GLBC mostra a recuperação do estado letárgico produzido pela infecção, apesar de não ter sido demonstrada diferença significativa na sobrevivência entre os grupos. Isto se dá por se tratar de infecção com uma cepa que provoca mortalidade de todos os animais infectados nas condições experimentais deste trabalho (10).

A melhora clínica/redução parasitária em GLBC se devem à soma de efeitos dos medicamentos utilizados. Pesquisas mostram que medicamentos altamente diluídos, ativam ou inibem ações celulares específicas, refletindo na condição da saúde do animal (19,20,21), enquanto que o organoterápico age restabelecendo a função do órgão através do homólogo sadio, servindo de modelo de informação para direção de reação do organismo.

O organoterápico independente do órgão utilizado, sem a associação não foi eficiente para manter o equilíbrio biofisiológico, estimulando fortemente o organismo e levando a uma resposta máxima do sistema biológico como observado em estudos anteriores (22). Isto pode ter ocorrido porque camundongos são naturalmente muito sensíveis à infecção por *T. cruzi*. Como alternativa de maximizar os resultados, a utilização de um modelo experimental mais resistente (*Rattus norvegicus*, por exemplo) que manteria maior equilíbrio hospedeiro-parasito durante a infecção, permitiria evidenciar os efeitos benéficos do tratamento (23). Ainda poderia ser preparado organoterápico a partir de órgãos de espécie mais resistente ao *T. cruzi*.

O organoterápico ao passar a informação de resposta de organismo sadio ao hospedeiro infectado possivelmente modulou informações imunofisiológicas que foram fornecidas de forma específica, neste modelo experimental utilizado, reproduzindo a resposta de estado saudável ao hospedeiro através da homeostase, observado através de melhor

morbidade e menor parasitemia (25). No entanto a espécie utilizada para a preparação dos organoterápicos é também muito sensível (10,24). Com a utilização de modelo mais resistente seria possível observar mais claramente o efeito equilibrado e benéfico do medicamento, refletido também na maior sobrevivência de animais infectados por *T. cruzi* (25).

Os resultados sugerem que as associações do medicamento constitucional ao organoterápico de baço mais coração, normais, diminuem a morbidade da infecção, com melhora clínica pela redução parasitária em camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*, que é altamente patogênica e provoca mortalidade de todos os animais infectados, quando não tratados (10).

Referências:

1. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(4): 342-348.
2. Teixeira MZ. Protocolo de experimentação patogênica homeopática em humanos. São Paulo: Marcus Zulian Teixeira, 2013.
3. Castilhos LR, Souza JC, Pinto LF, Albuquerque FT, Filgueiras EP. Avaliação da Terapêutica Homeopática nas Ovariopatias Císticas de Bovinos Leiteiros. *Homeopatia Brasileira* 2003; 9 (1): 5-15.
4. Zandvoort R. The Complete Repertory. Institute for Research in Homeopathic Information and Symptomatology. In: Leidschendam AJ. The Netherlands; 1994-1996.
5. Allen TF. The Encyclopedia of pure materia medica. Repr., Jain B. Publishers, New Delhi, 1982.
6. Lopes CR, Falkowski GJS, Brustolin CF, Massini PF, Ferreira EC, Moreira NM, et al. Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Homeopathy* 2016 105(2): 186-193.
7. Falkowski-Temporini GJ, Lopes CR, Massini PF, Brustolin CF, Sandri PF, Ferreira EC, Aleixo DL, Pala NR, de Araújo SM. Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*, *Cytokine* 2016 88:57-61.
8. Hahnemann CFS. Organon der Heilkunst. In: 6th ed., Heidelberg: Haug, 1989.
9. Brasil. Farmacopéia Homeopática Brasileira. ANVISA. 3rd edn. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília DF; 2011.
10. Silva LHP & Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clínica Biol. São Paulo* 1953; 20: 191-201.

11. Aleixo DL, Ferraz FN, Ferreira EC, Lana M, Gomes ML, Filho BAA, Araújo SM. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. *BMC Research Notes* 2012; 5(352): 1-8.
12. Bellavite P, Signorini A, Marzotto M, Moratti E, Bonafini C, Oliosio D. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. *Homeopathy* 2015 104: 139-160.
13. BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop* 1962; 4: 389-396.
14. Falkowski, GJS, Sandri PF, Tiyo R, Aleixo DL, Araújo SM. Parameters for evaluation of clinical Trial in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2012; 64: 1539-1546.
15. Bellavite P, Andrioli G, Lussignoli S, Signorini A, Ortolani R, Conforti A. A scientific reappraisal of the 'principle of similarity'. *Medical Hypotheses* 1997; 49: 203-212.
16. Ferraz FN, da Veiga FK, Aleixo DL, Ciupa L, de Abreu Filho BA, da Silva SS et al. Biotherapies of rabbit serum modulate the immune response and decrease parasite load in mice infected with *Trypanosoma cruzi*, *J. Appl. Biomed* 2016; 14(3): 187-197.
17. Aleixo DL, Benvenuto MJ, Lera KRJL, Ciupa L, Ferraz FN, de Araújo SM. The Association of Ponderal Benznidazole with its Ultra-high Diluted Formula Reduces the Toxic Effects and Allows Increasing of Dose in Dose-dependent Protocol in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. High Dil. Res.* 2015; 14(3): 10-19.
18. Gaskill BN, Gordon CJ, Pajor EA, Lucas JR, Davis JK, Garner JP. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiol Behav.* 2013; 110-111: 87-95.
19. Bell IR, Koithan M. A model for homeopathic remedy effects: low dose nanoparticles, allostatic cross-adaptation, and time dependent sensitization in a complex adaptive system. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 191.
21. Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res.* 2003; 90 Suppl 2:S55-62.
21. Samadder A, Das S, Das J, Paul A, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. The potentized homeopathic drug, *Lycopodium clavatum* (5C and 15C) has anti-cancer effect on hela cells in vitro. *J Acupunct Meridian Stud* 2013; 6: 180-187.
22. Oberbaum M, Frass M, Cornelius Gropp. Unequal brothers: are homeopathy and hormesis linked? *Homeopathy* 2015; 104(2): 97-100.
23. Ferraz, FN; Veiga, FK; Aleixo, DL; Spack, M; Araújo SM. Different treatment schemes and dynamizations of *Trypanosoma cruzi* biotherapies: what information do they transfer to the organism in infected mice? *Homeopathy* 2016; 305-310.

24. Ferraz FN, da Veiga FK, Aleixo DL, Silva SS, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, et al. Modulation of IFN-gama, IL-4 and IL-17 Cytokines is Related to Parasitemia Control in Mice Infected by *Trypanosoma cruzi* and Treated with Biotherapy. *J Biol Sci* 2015; 15: 251-259.
25. Ferraz FN, Veiga FK, Aleixo DL, Spack M, Araújo SM. Different treatment schemes and dynamizations of *Trypanosoma cruzi* biotherapies: what information do they transfer to the organism in infected mice? *Homeopathy* 2016; 105(4) 305-310.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram realizados podemos concluir que os parâmetros imunológicos, histológicos, imunohistoquímicos, parasitológicos e clínicos realizados em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* submetidos a diferentes tratamentos medicamentos altamente diluídos mostrou que:

- 1) Medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* 13c aumenta o número de megacariócitos e células de Kupffer;
- 2) Medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* 13c aumenta sobrevida;
- 3) Medicamento constitucional *Conium maculatum* 13c provoca mortalidade precoce;
- 4) Medicamentos constitucionais *Kalium causticum* 13c, *Conium maculatum* 13c e *Lycopodium clavatum* 13c aumentam o número hepatócitos e esplenócitos em apoptose, enquanto que apenas o *Lycopodium clavatum* 13c acompanha aumento do número de corpos apoptóticos no fígado;
- 5) Medicamentos *Kalium causticum* 13c e *Conium maculatum* 13c aumentam resposta Th2 e *Lycopodium clavatum* 13c gera predomínio de resposta Th1;
- 6) Medicamento constitucional *Lycopodium clavatum* 13c melhora a clínica com aumento de temperatura do 6º ao 23º dias de infecção, aumento do consumo de água entre o 2º-5º e 10º-13º dias de infecção e aumento da mobilidade locomotora ao longo da infecção;
- 7) Associação dos medicamentos organoterápicos de baço, coração e *Lycopodium clavatum* 13c aumentam o período pré-patente e redução da parasitemia total com menor pico de parasitos no 8º dia de infecção;
- 8) Associação dos Medicamentos organoterápicos de baço, coração e *Lycopodium clavatum* 13c melhora a condição clínica dos animais, expressa por maior temperatura, maior consumo de ração consumida e ganho de peso em relação aos animais não tratados e infectados;
- 9) As análises realizadas neste trabalho mostraram que medicamentos altamente diluídos são capazes de modular resposta imunofisiológica, promovendo melhora da patologia provocada na infecção pela cepa Y de *Trypanosoma curzi*, podendo este tipo de medicamento tornar-se uma alternativa para o tratamento etiológico da doença de Chagas.

PERSPECTIVAS

Realizar análise citológica descritiva;

Analisar ultra-estruturas celulares através da microscopia de transmissão;

Aplicar a espectrofotometria em diferentes dinamizações dos medicamentos;

Utilizar linhagens de camundongos mais resistentes e cepas menos patogênicas;

Realizar a análise comportamental dos animais através do Software Ethonvision

Basic System;

Analisar a cinética de citocinas e de cortes histológicos do baço, coração e fígado.

APÊNDICE



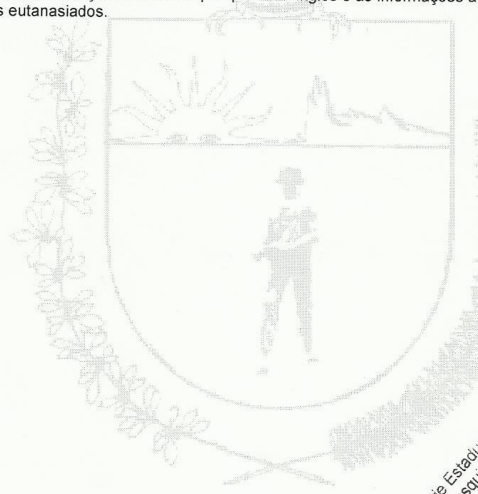
Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Condução Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 4/10/2011

Parecer nº 080/2011

Pesquisador: Silvana Marques de Araújo	Setor: DBS	
Título:	Protocolo nº 054/2011	
Efeitos de diferentes medicamentos ultradiluídos e organoterápicos na infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi		
Entrada: 28/9/2011	Início: 1/11/2011	Término: 1/3/2015
Situação do Projeto: Aprovado		
Relatório Final:		
ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação do relatório final.		
Considerações e Parecer:		
<p>Quanto ao mérito da pesquisa em relação às normas previstas na Lei no 11.794/08, Decreto 6.899/09, Resolução no 01/2010 – CONCEA (DOU no 131, de 12/07/10, p. 10), Lei Estadual no 14.037/03 e Resolução UEM no 032/2006-CEP, verifica-se que a metodologia proposta é compatível com a legislação aplicável.</p> <p>Sendo assim, propõe-se que o presente projeto seja APROVADO, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, salientando que no Relatório Final, a ser apreciado oportunamente por este CEAE, deverá constar, além das informações de praxe, a menção do título da pesquisa em inglês e as informações a respeito do destino das carcaças dos animais eutanasiados.</p> <p>É o parecer. S.M.J..</p>		
		
<p>Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo, Presidente do CEAE</p> <p><i>PPG</i> Universidade Estadual de Maringá Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comitê de Ética e Biossegurança <i>Silvana Marques de Araújo</i></p>		
<p>Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:</p> <p>I - aprovado;</p> <p>II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;</p> <p>III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;</p> <p>IV - não aprovado</p>		

www.ppg.uem.br - e-mail: ceeaa@uem.br