



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

CAMILA FERNANDA BRUSTOLIN

*Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Maringá

2014

CAMILA FERNANDA BRUSTOLIN

*Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Marques de Araújo.

Maringá

2014

Brustolin, Camila Fernanda

B912l *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi* / Camila Fernanda Brustolin. -- Maringá : [s.n.], 2014. 63 f. ilustr.

Orientador : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Marques de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2014.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. Neurônios mientéricos. 4. Citocinas. 5. Medicamento Homeopático. 6. *Lycopodium clavatum*. 7. *Phosphorus*. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. II. *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

CDD 616.01

## FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA FERNANDA BRUSTOLIN

*Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvana Marques de Araújo  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Márcia Machado de Oliveira  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Aurea Regina Telles Pupulin  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Lessa Aleixo  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Neide Martins Moreira  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste

Aprovada em: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

Local de defesa: T20, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA(S)

Dedico meu trabalho primeiramente a  
“**Deus**”, aos meus pais Valcir e Romilda,  
minha irmã Michele e meu noivo Renato.

## AGRADECIMENTO(S)

À Deus pela vida e oportunidades de realizar este trabalho.

Aos meus pais, Romilda de Almeida Brustolin e Valcir Antonio Brustolin por acreditarem em meu esforço e me apoiarem em qualquer situação, além de me amarem incondicionalmente.

A minha irmã Michele Caroline Brustolin por estar ao meu lado, me apoiando durante todo meu processo de formação.

Ao meu noivo Renato, pelo companheirismo, amor e compreensão. Por perder seus sábados e domingo no laboratório ao meu lado em dias de experimento.

À Professora Dra. Silvana Marques de Araújo pela orientação, dedicação e mais do que isso, por ser essa pessoa maravilhosa e de coração imenso por quem tenho grande admiração, carinho e respeito.

As minhas queridas amiga Neide e Carina, por dispensar seu tempo sempre me ouvindo tanto em questões pessoais como profissionais, por nunca me negar ensino, por sua paciência e dedicação em meus trabalhos.

À Professora Dra. Denise Lessa Aleixo pelo apoio incondicional no período mais difícil dessa fase (início), quando eu ainda me sentia perdida.

As meninas Larissa, Angela, Patricia, Fabiana por tornar todos os momentos de trabalho agradáveis.

A todos os professores e técnicos do setor de Parasitologia pelo auxílio e carinho dispensados.

Aos membros da banca de qualificação, por contribuírem com importantes e enriquecedoras sugestões.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## EPÍGRAFE

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que  
ninguém viu, mas pensar o que  
ninguém ainda pensou sobre aquilo  
que todo mundo vê.” (Arthur  
Schopenhauer)*

Dissertação elaborada e formatada  
conforme as normas da ABNT.



## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	09
JUSTIFICATIVA.....	17
OBJETIVOS.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO II.....	25
Artigo: <i>Lycopodium clavatum</i> e <i>Phosphorus</i> modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo <i>T. cruz</i> .....	27
CAPÍTULO III.....	62
CONCLUSÕES.....	62
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63

## CAPÍTULO I

### *Doença de Chagas*

A doença de Chagas descrita por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909) e também conhecida como Tripanossomiase americana, é uma antropozoonose que possui como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (REY, 2001).

A doença é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, onde é transmitida aos seres humanos principalmente através das fezes de triatomíneos, insetos conhecidos popularmente como "barbeiros". No entanto, nas últimas décadas, devido à mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo a doença tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América, Canadá, em muitos países da Europa Ocidental e alguns do Pacífico. Estima-se que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina. No Brasil, segundo dados da Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) em 2011, a doença de Chagas representou a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias, e estima-se a existência de três milhões de infectados, sendo acima de 45 anos a faixa etária mais acometida. Devido às complicações causadas na saúde do ser humano, esta endemia representa um impacto psicológico, social e econômico importante. (WHO, 2013; DIAS, 2001; VINHAES; DIAS, 2000).

### *Aspectos clínicos da Infecção*

A doença de Chagas manifesta-se por duas fases distintas, uma aguda e outra crônica. A fase aguda é de curta duração, caracterizada por elevado parasitismo tecidual e inflamação localizada em diferentes órgãos, com maior gravidade no coração. (LESCURE et al., 2010). Em alguns casos, após 8 a 10 dias da penetração do parasito, os indivíduos infectados apresentam manifestações clínicas como sinais de porta de entrada (sinal de Romana e Chagoma de inoculação) adenopatia generalizada, edema e doença febril inespecífica como hepatoesplenomegalia. Entretanto, em 90% dos pacientes a fase aguda é assintomática e os indivíduos que sobrevivem a essa fase evoluem para uma fase crônica. Grande parte dos indivíduos cronicamente infectados (50-70%) permanece por longos períodos sem apresentar manifestações clínicas. Esta condição é denominada de forma indeterminada da doença (PRATA, 2001; RASSI; JR.

RASSI; MARIN-NETO, 2010). Na fase crônica os pacientes podem progredir para as formas sintomáticas que são caracterizadas pelo comprometimento funcional do coração, esôfago e cólon ou alteração em ambos os órgãos, resultando em três principais formas clínicas: cardíaca, digestivas e cardiodigestivas (MARIN-NETO et al, 2007; PRATA, 2001; LANA & TAFURI, 2011).

#### *Complicação digestiva da doença de Chagas*

A primeira hipótese da forma digestiva da doença de Chagas surgiu em 1916, quando Carlos Chagas observou que durante a infecção crônica, alguns adultos exibiam uma acentuada disfagia para determinados tipos de alimentos cuja ingestão necessitava ser acompanhada de água. Os pacientes relatavam que o trânsito do alimento era interrompido no esôfago, causando imensa dor. Mesmo a ingestão de líquidos tornava-se difícil, sendo às vezes impossível, tornando-se necessária a ingestão em doses fracionadas. Na época, sem explicação patogênica tal fenômeno foi denominado de “Mal do Engasgo” (CHAGAS, 1916).

A forma digestiva da doença (megaesôfago, megacólon ou ambos) desenvolve-se em cerca de 10 a 15% dos doentes chagásicos com infecção crônica, e é vista quase que exclusivamente no sul da Bacia Amazônica (principalmente no Brasil, Argentina, Chile e Bolívia), e raramente encontrada no norte da América do Sul, América Central e México (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Pacientes portadores dessas formas digestivas apresentam sintomas decorrentes de comprometimento de órgãos deste sistema, principalmente do esôfago (megaesôfago) e do cólon (megacólon) (ANDRADE; ANDRADE, 1966; ANDRADE; ANDRADE, 1969; KOBERLE, 1968). Mais comumente são observados sintomas como constipação, meteorismo, discinesia e menos frequente cólicas abdominais (RASSI; JR. RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O megacólon chagásico pode manifestar-se como uma doença isolada, mas na maioria das vezes aparece associado ao megaesôfago ou a cardiopatia chagásica. É mais comumente encontrado em adultos de 30 a 60 anos e mais incidente no sexo masculino (DIAS, 2001).

Acredita-se que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do mega chagásico seja um processo degenerativo, principalmente de gânglios nervosos do sistema nervoso entérico (SNE), que aparentemente tem seu início na fase aguda, persistindo até a fase crônica (ANDRADE; ANDRADE, 1966; ANDRADE; ANDRADE, 1969; KOBERLE, 1968). Esta denervação do plexo mientérico é

caracterizada por alterações de motilidade, secreção e absorção no trato digestivo, impedindo o esvaziamento do material semi-sólido (RASSI; JR. RASSI; MARIN-NETO, 2010). Esse acúmulo de fezes no cólon provoca dilatação da luz e compressão da mucosa. Essa compressão leva a isquemia, e secundariamente, a degeneração, necrose e ulceração da mucosa iniciando-se nesta região um processo inflamatório secundário e independente da inflamação induzida pela própria doença de Chagas. Esse processo inflamatório atinge o plexo mientérico já previamente lesado pelo *T. cruzi*, agravando ainda mais a destruição do SNE (TAFURI, 1971).

#### *Infecção por T. cruzi e citocinas*

A infecção pelo *T. cruzi*, assim como em outras infecções por microrganismos patogênicos intracelulares, sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasito (SCHARFSTEIN; MORROT, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

A resposta imune inata age como componente chave da resistência do hospedeiro contra protozoários, controlando sua replicação durante a infecção. (BRODSKYN; BARRAL-NETO, 2000). Estudos experimentais em roedores infectados têm sido um instrumento na determinação do papel de várias citocinas e tipos celulares como mediadores da infecção contra o *T. cruzi* (DULTRA *et al.*, 2009).

Tipicamente em resposta a infecção por *T. cruzi*, macrófagos secretam Interleucina-12 (IL-12), ativando células natural killer (NK) e estimulando a proliferação de linfócitos Th1. A ativação dessas células resulta na produção de Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) que atua diretamente sobre macrófagos, capacitando-os para atividade microbida mediada principalmente por óxido nítrico (NO) (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Juntamente com IL-12 e IFN- $\gamma$  a citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), também produzida durante a infecção por *T. cruzi* participa desta interação (OSWALD *et al.*, 1992).

Sabe-se que NO pode ser considerado como medidor chave nos processos inflamatórios, sendo reconhecido como a principal molécula efetora capaz de controlar a replicação intracelular de *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992; SILVA; MACHADO; MARTIN, 2003). Contudo, níveis elevados deste derivado de oxigênio (NO) podem estar associados a danos teciduais, através da exacerbação da inflamação com morte celular, inclusive da população neuronal mientérica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), assim como danos cardíacos. (SITTIPUNT *et al.*, 2001).

Diversos estudos conduzidos tanto em modelos animais como em humanos, relatam a importância da citocina IFN- $\gamma$  na resistência a infecção por *T. cruzi* (ANTÚNEZ; CARDONI, 2001). Torrico et al., 1991, observaram que animais resistentes quando tratados com anticorpos anti-IFN- $\gamma$ , tornavam-se susceptíveis a infecção. O papel protetor do IFN- $\gamma$  está diretamente relacionado à síntese de NO (LIEKE et al., 2006; COSTA et al., 2006) assim como a sua ação sobre a ativação de macrófagos para produção de outras citocinas protetoras como TNF- $\alpha$  (MANTOVANI et al., 2004).

Contudo, a resistência e proteção contra o *T. cruzi* não é crédito exclusivo de uma única citocina. HUNTER; SLIFFER e ARAÚJO, (1996) observaram que a administração de IL-12 em camundongos infectados com *T. cruzi* resultou em redução na parasitemia e prolongou a sobrevivência destes animais. Além disso, a neutralização de IL-12 endógena resultou em aumento do parasitismo, bem como diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$ , demonstrando que o efeito protetor da IL-12 é dependente de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Sendo assim podemos observar que estas citocinas não atuam isoladamente.

A participação do TNF- $\alpha$  na resposta inata é complexa, e tem sido relacionada tanto na resistência quanto na gênese de lesões teciduais (BLACK et al., 1989; SANTOS LIMA *et al.*, 1997; ACHARYA; SINGH, 2001; ALIBERTI et al., 2001; MAGALHÃES-SANTOS; ANDRADE, 2005). Isoladamente o TNF- $\alpha$  tem um papel importante no preparo da resposta imune adquirida (FEARON; LOCKSLEY, 1996), além de estar envolvida na ativação de leucócitos inflamatórios, estimulação de fagócitos mononucleares para produção de citocinas, coestimulação dos linfócitos T e potenciação da lise mediada por linfócitos T citotóxicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Além disso, o TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 modulam a expressão de moléculas de adesão, que participam no recrutamento de linfócitos para os sítios de inflamação (ALIBERTI *et al.*, 1996).

A citocina IL-6 também desempenha papel interessante relacionado a resistência e comprometimento causados pelas lesões cardíacas na doença de Chaga. GAO; PEREIRA, 2002 observaram que elevadas concentrações desta citocina diminuíam o pico de parasitemia favorecendo animais infectados, contudo havia uma migração maior de parasitos para o tecido cardíaco.

A mortalidade de animais infectados com *T. cruzi* experimentalmente é consequência da ação do parasito, assim como da resposta imune do hospedeiro. A multiplicação descontrolada do parasito pode levar a morte de animais susceptíveis,

porém esse efeito é evitado por citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ . No entanto, em hospedeiros resistentes, a mortalidade é prevenida por uma associação dos efeitos antiparasitários de citocinas Th1 com efeitos antagônicos de citocinas anti-inflamatórias Th2 como IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4 exercidos sobre as primeiras. Isto ocorre devido ao fato de as citocinas pró-inflamatórias serem necessárias para controlar o parasitismo, mas quando produzidas em excesso, exercem efeitos tóxicos, letais aos animais (SANTOS-LIMA et al., 1997).

As citocinas Th2 são de extrema importância na regulação da resposta imune, controlando a produção de TNF- $\alpha$  e NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI et al., 1992) o que por outro lado poderia favorecer o crescimento do parasito e sua disseminação tecidual.

ABRAHAMMSOHN; COFFMAN, 1995 observaram em seus experimentos que camundongos geneticamente deficientes de IL-10 são capazes de controlar melhor a infecção pelo *T. cruzi*. Contudo a necessidade de produzir IL-10 pode estar relacionada com a proteção do hospedeiro frente a sua própria resposta imune.

#### *Tratamento da infecção por T. cruzi*

Após várias décadas da descrição do primeiro protocolo terapêutico para o tratamento clínico com efeito tripanosomicida estão disponíveis no mercado apenas duas drogas, o nitrofurano (Nifurtimox®) e o nitroimidazol (Benzonidazol®). (HABERKORN; GONNERT, 1972; RAAFLAUB; ZIEGLES, 1979; GUEDES et al., 2006; DE CASTRO, 1993). Atualmente no Brasil apenas o Benzonidazol® (BZ) é comercializado. Esse medicamento apresenta eficácia parcial na fase aguda e eficácia limitada na fase crônica da infecção (BRENER, 2000). O BZ ainda apresenta diversas limitações, como a necessidade de administração por longos períodos e efeitos colaterais importantes, sendo, reações cutâneas, muitas vezes acompanhada de febre, distúrbios gastrointestinais (náuseas), além de parestesias ou sintomas de polineurite periférica, o que impede a continuação do tratamento por muitos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

Considerando a importância da doença de Chagas como um problema de saúde pública associado a limitações na eficácia e efeitos colaterais consideráveis do único medicamento disponível no Brasil, diversos pesquisadores estão em busca de medidas alternativas para o tratamento da infecção por *T. cruzi*, com o objetivo de encontrar medidas que venham a contribuir no enfrentamento da doença melhorando a qualidade

de vida dos indivíduos infectados (SOARES et al., 2012; SCHEBELESKI-SOARES et al., 2009; OCCHI et al., 2012., MOREIRA et al.,2013; ALEIXO et al., 2008; PUPULIN et al., 2010; FERRAZ et al., 2011; GABRIEL et al., 2011; SANDRI et al., 2011).

### *Homeopatia*

A homeopatia é uma modalidade terapêutica que tem como idealizador o médico alemão Samuel Hahnemann (1755-1843) cujo princípio central baseia-se na “Lei de Similitude” em que as doenças são tratadas com substâncias que produzem em indivíduos sãos, sintomas semelhantes aos provocados pela própria doença. Essas substâncias são submetidas a diluições seriadas e agitações ritmadas processo denominado (dinamização). Os medicamentos que seguem os princípios de semelhança e reproduzem o conjunto de características físicas e mentais do indivíduo são chamados de medicamentos constitucionais (CAMPBELL, 2011). A abordagem terapêutica adequada desta terapia deve fortalecer a ação defensiva do indivíduo promovendoregulação do sistema imunológico e conseqüente aumento na eficácia do processo de cura do organismo(CASALI et al., 2006).

No Brasil, o interesse da população por “práticas não convencionais de manutenção da saúde” fez com que o Ministério da Saúde aprovasse a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares” no Sistema Único de Saúde com o intuito de inseri-las de forma coadjuvante aos tratamentos clássicos no sistema publico. A homeopatia é uma destas práticas (HOMEOPATIA ONLINE, 2006; TEIXEIRA, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A utilização de medicamentos ultradiluídos tem sido muito discutida, e seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido (BONAMIN, 2006; BONAMIN; LAGACHE; BASTIDE, 2008). Porém, estudos experimentais mostram que este tipo de terapia é eficaz através dos efeitos biológicos observados em animais tratados e criteriosamente avaliados (ALEIXO et al., 2012; FERRAZ et al., 2011; SANDRI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2007; QUEIROZ et al., 2006).

Devido à ação limitada e aos efeitos adversos observados no tratamento dos pacientes chagásicos com a utilização do benznidazol, a busca por novos medicamentos mais efetivos e menos tóxicos tem impulsionado estudos com homeopatia. O desenvolvimento de pesquisas com a utilização de medicamentos ultradiluídos em modelos experimentais bem definidos e mais resistentes que os camundongos, com

maior sobrevida dos animais, podem oferecer melhores condições de estudo e auxiliar no esclarecimento de dúvidas quanto ao mecanismo de ação destas substâncias o que constitui uma alternativa eficiente e segura não só para o tratamento da doença de Chagas mas de diversas enfermidades.

#### *Phosphorus e Lycopodium clavatum*

Os medicamentos que seguem os princípios de semelhança e reproduzem o conjunto de características físicas e mentais do indivíduo são chamados de medicamentos constitucionais (CASALI *et al.*, 2006) .

A escolha do medicamento homeopático a ser utilizado é realizada através da consulta ao Repertório Homeopático - Índice de medicamentos referentes a cada sintoma apresentado na experimentação patogênica. Os sinais clínicos são colhidos e codificados em rubricas correspondentes a pontuações. Assim, os medicamentos com diferentes pontuações são listados e os de maiores pontuações, cuja patogenesia é mais semelhante ao quadro clínico apresentado será o de escolha (ALMEIDA, 2007).

Além da Repertorização aplicada, os medicamentos *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* foram propostos a partir de resultados observados em estudos anteriores (ALMEIDA *et al.*, 2008; FALKOWISKI *et al.*, 2012). De acordo com Oliveira *et al.* (2004), o medicamento *Lycopodium clavatum* é um dos mais prescritos para pacientes por atingir o maior número de sintomas nos experimentos clínicos em homens atingindo diferentes sistemas, como exemplo o sistema digestório e cardiorespiratório. Em estudos anteriores nosso grupo mostrou que o tratamento com *Lycopodium clavatum* apresentou benefícios em camundongos infectados pelo *T. cruzi* promovendo menores índices de parasitemia, melhor desenvolvimento clínico, como manutenção de peso, consumo normal de água e ração, característica do pelo (FALKOWISKI *et al.*, 2012) e maior sobrevida para os animais (FALKOWISKI *et al.*, 2012 ; LOPES *et al.*, 2013). Lopes *et al.*, (2013) também demonstraram redução significativa de ninhos de amastigotas e número de amastigotas por ninho no coração, musculo estriado esquelético e músculo liso de camundongos infectados com 1400 formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O tratamento pré-infecção de camundongos infectados pelo *T. cruzi* com *Phosphorus* modulou a resposta imune do hospedeiro aumentando significativamente a quantidade de linfócitos e atuou na patogenicidade da doença, reduzindo o período de parasitemia patente e o índice de mortalidade, principalmente durante a fase aguda da infecção (ALMEIDA ET AL., 2008). Esses dados encontrados



na literatura demonstram a importância desses compostos e justificam estudos com essas substâncias.

#### *Rattus norvegicus* como modelo experimental

A utilização de animais na experimentação é de extrema importância em pesquisas científicas e contribui para o desenvolvimento da ciência e tecnologia (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Claude Bernard (1865) através de seus estudos, introduziu o uso de animais como modelo experimental, provocando situações físicas e químicas que resultavam em alterações nos animais semelhantes às das doenças em humanos, reforçando a aplicabilidade da experimentação animal para entendimento de doenças humanas.

A qualidade de um modelo animal está diretamente relacionada à sua capacidade de reprodução de parâmetros que possibilitem uma extrapolação dos resultados para a espécie humana devendo ser, portanto, funcionalmente o mais semelhante possível ao homem (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

A doença de Chagas pode ser avaliada, experimentalmente em diferentes modelos, como ratos, camundongos, roedores silvestres, cães, coelhos, primatas e cobaias, reproduzindo nesses animais, alguns aspectos patológicos da doença humana. Devido à facilidade de obtenção, manutenção e manuseio o modelo murino tem sido utilizado por diversos pesquisadores. Entre eles, o camundongo suíço, não isogênico, destaca-se inquestionavelmente como o mais usado, por ser mais conhecido cientificamente e contar com quantidade de dados relevantes na literatura (DESQUESNES & LANA, 2010; CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Porém esses animais são mais susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* o que dificulta a avaliação de diversos parâmetros da doença, principalmente durante a fase crônica, tornando-se necessário a utilização de um modelo experimental mais resistente (OLIVEIRA et al., 2009).

A utilização de *Rattus norvegicus* espécie Wistar, na infecção experimental pelo *T. cruzi*, mostra-se mais interessante por ser mais resistente, apresentando maior sobrevivência o que permite melhores condições de estudo e avaliação de diversos parâmetros, sobretudo na fase crônica da doença. Além disso, seu maior porte oferece maior quantidade de material biológico para análises complementares, assim como avaliação clínica facilitada.

## **JUSTIFICATIVA**

A utilização de medicamentos ultradiluídos vem crescendo em todo o mundo. Considerando a importância da doença de Chagas como um problema de saúde pública associado a limitações na eficácia e efeitos adversos consideráveis do único medicamento disponível no Brasil, diversos pesquisadores estão em busca de medidas alternativas para o tratamento da doença, com o objetivo de encontrar medidas que venham a contribuir na melhoria de qualidade de vida dos indivíduos infectados por *T. cruzi* (SOARES et al., 2012; SCHEBELESKI-SOARES et al., 2009; OCCHI et al., 2012., MOREIRA et al.,2013; ALEIXO et al., 2008; PUPULIN et al., 2010; FERRAZ et al., 2011; GABRIEL et al., 2011; SANDRI et al., 2011).

O modelo de infecção experimental pelo *T. cruzi* é bem conhecido podendo constituir uma excelente ferramenta para o estudo de intervenções medicamentosas (BONAMIN, 2006). A utilização de ratos (*Rattus norvegicus*) como modelo experimental é ferramenta interessante por ser mais resistente, apresentar maior sobrevivência desenvolvendo a fase crônica da infecção, apresentar maior porte propiciando maior quantidade de material biológico podendo contribuir para o entendimento dos efeitos/mecanismos de ação destes medicamentos (SANTELLO,2005), além de constituir uma possibilidade de encontro de novas alternativas de tratamento na infecção por *T. cruzi*.

## **OBJETIVOS**

### **GERAL**

Avaliar efeito dos medicamentos ultradiluídos *Lycopodium clavatum* e *Phosphorum* sobre aspectos, parasitológicos, neurológicos e imunológicos na infecção experimental pelo *T. cruzi* em ratos Wistar.

### **ESPECÍFICOS**

Padronizar no Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá um modelo experimental para a evolução de *T. cruzi*, mais resistente e com maior sobrevivência dos animais, podendo oferecer melhores condições de estudo do processo patogênico.

Avaliar parâmetros parasitológicos (Período patente, pico de parasitos, dia do pico e parasitemia total) em *Rattus norvegicus* infectados por *T. cruzi* tratados ou não com medicamento ultradiluído;

Avaliar processo inflamatório no coração, fígado, baço, intestino e músculo estriado esquelético de *Rattus norvegicus* infectado por *T. cruzi* tratados ou não com medicamento ultradiluído.

Avaliar a cinética de produção de citocinas (Fator de Crescimento de Granulócitos e Monócitos (GM-CSF), Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ), Interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), Interleucina-1 Beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina-12 (IL-12) (p40/p70) e Fator de Necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )) em soro de *Rattus norvegicus* infectado por *T. cruzi* tratados ou não com medicamento ultradiluído;

Avaliar quantitativamente e morfológicamente alterações neuronais mientéricas no cólon de *Rattus norvegicus* infectado por *T. cruzi* tratados ou não com medicamento ultradiluído;

Correlacionar cinética de produção de citocinas a alterações neuronais mientéricas observadas no cólon de *Rattus norvegicus* infectado por *T. cruzi* tratados ou não com medicamento ultradiluído.

## REFERENCIAS

ABBAS, K. A.; LITCHMAN, A. H. & PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

ABRAHAMSOHN, I.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**. v. 155, p. 3955, 1995.

ACHARYA, A., SINGH, S. M. Effect of TNF-alpha on the induction of apoptosis in murine macrophages: role of interleukin-1 beta converting enzyme. **Int J Immunopathol Pharmacol**. 14: 5-10, 2001.

ALEIXO, D. L.; FERRAZ, F. N.; DE MELO, C. S.; GOMES, M. L.; TOLEDO, M. J.; KANESHIMA, E. N.; AMADO, C. A. B.; ARAÚJO, S. M. Changes of RAPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole. **Homeopathy**. v. 97, p. 59-64, 2008.

ALEIXO, D. L.; FERRAZ, F. N.; FERREIRA, E. C.; LANA, M.; GOMES, M. L.; ABREU FILHO, B. A.; ARAÚJO, S. M. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. **BMC Research Notes**. v. 5, p. 352, 2012.

ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immunol**. 64: 1961-1967, 1996.

ALIBERTI, J. C. S.; MARINO, A. P.; SOUTO, J. T.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in Interferon-g and Tumor Necrosis factor-R1-Deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal of Pathology**. 158: 1433-1440, 2001.

ALMEIDA, L. R. **Efeitos de medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em Camundongos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi*(STEEL, 1885)BALBIANI, 1988e *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909**. Seropédica, RJ: 2007. Tese Doutorado em Ciências Veterinárias- Instituto de Veterinária/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ALMEIDA, R. L; CAMPOS, M. C. O; HERRERA, L. V. B; BONAMIN, L. V; FONSECA, A. H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopath**. 97: 65-69, 2008.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. Chagas' disease and neuron changes in Auerbach's plexus. (Experimental study in mice). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 8: 19-224, 1966.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; Immunochemical study of experimental Chagas' disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 11: 44-47, 1969.

ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. Early IFN-g production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**. v. 79, p. 189-196, 2001.

BERNARD, C. An introduction to the study of experimental medicine. In: images from the history of medicine division. **National library of Medicine**. 1865.

BLACK, C. M.; ISRAELSKI, D. M.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S. Effect of recombinant tumor necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. **Immunology**. 68: 570-574, 1989.

BONAMIN, L. V. Teorias Interpretativas sobre ultradiluições: Ilustrações Experimentais. **Cultura Homeopática**, p. 6-17, 2006.

BONAMIN, L. V.; LAGACHE A; BASTIDE M. Research on Ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: The Follow Up. In: BONAMIN L V. Signals and

Images: Contributions and contradictions about high dilution research. Ed. Springer, São Paulo, p. 3-28, 2008.

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

BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas - In BRENER, Z.; ZILTON, A. A.; BARRAL-NETO, M. (EDS) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 379-388, 2000.

BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. cap. 10, p. 170-176, 2000.

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

CASALI, V. W. D.; CASTRO, D. M.; ANDRADE, F. M. C.; LISBOA, S. P. **Homeopatia bases e princípios**. Viçosa: UFT, p.139-49, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida para o homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.1, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanosomíase americana. **Memórias do Instituto OswaldoCruz**. 8, 5-37, 1916.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: O camundongo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.28, p.11-23, 2007.

COSTA, V. M. A.; TORRES, K. C. L.; MENDONÇA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs Stimulate Nitric Oxide Production and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**. v. 177, p. 3193- 3200, 2006.

DE CASTRO, S. L. The challenge of Chaga's disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**. v.53, n. 2, p. 83-98, 1993.

DESQUESNES M; LANA M: Veterinary Aspects and Experimental Studies. In American Trypanosomiasis Chagas Disease: one hundred year of research. Edited by Telleria J, Tibayrenc M. London: Elsevier Inc, 2010.

DIAS, J. C. Chagas disease, environment, participation, and the state. **Cad. Saúde Pública**. 17 Suppl. 165-169, 2001.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A. S.; VILLANI, F. N. A.; COSTA, G. C.; SILVEIRA, A. B. M.; REIS, D. D.; GOLLOB, K. J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, suppl. I, p. 208-218, 2009.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: criterios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras.** 19(1): 59-65, 2004.

FALKOWSKI, G.J.S.; LOPES, C.R.; BRUSTOLIN, C.F.; MASSINI, P.F.; FERREIRA, E. C.; DA VEIGA, F. K.; ALEIXO, D.L.; PALA, N. R.; BARION, T.; ESPER, L. G.; DE ARAÚJO, S. M. *Causticum hahnemanni*, *Conium maculatum* and *Lycopodium clavatum* highly diluted medications decreases parasitemia in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Int J High Dilution Res.** 11(40), 198-199, 2012.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science.** v. 272, p. 50-54, 1996.

FERRAZ, F. N.; SIMONI, G. K.; DO NASCIMENTO, A.; DE MELO, C. S.; ALEIXO, D. L.; GOMES, M. L.; SPACK, M.; ARAUJO, S. M. Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy.** v.100, p. 237-243, 2011.

GABRIEL, M.; SANDRI, P. F.; MOREIRA, N. M.; JUNIOR, A. D. N.; SPACK, M.; ARAÚJO, S. M. *Trypanosoma cruzi* 17d biotherapy: effect versus age. **Revista de Homeopatia.** v. 74, n. 3, p. 120, 2011.

GAO, W; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Parasitology.** v. 32: 2, 167-170, 2002.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$  treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . **European Journal of Immunology.** 22: 2501-2506, 1992.

GUEDES, P. M. M.; FIETTO, J. L. R.; LANA, M.; BAHIA, M. T. Advances in Chagas disease chemotherapy. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry.** v.5, n.2, p.11-19, 2006.

HABERKORN, A.; GONNERT, R.; Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. **Arzneimittelforschung.** v.22, n.9, p.1570-1582, 1972.

HAHNEMANN, S. Doenças crônicas. São Paulo: **GEHSP “Benoit Mure”**, p. 202, 1835.

HOMEOPATIA ONLINE. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a homeopatia.[citado 5 jun 2006]. Disponível em: [http://www.homeopatiaonline.com/ver\\_texto.asp?id=68](http://www.homeopatiaonline.com/ver_texto.asp?id=68).

HUNTER, C. A.; SLIFFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12 mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infection Immunity.** v. 64, n. 7, p. 2381-2386, 1996.

KOBERLE, F. Chagas' disease and chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol.** 6: 63-116, 1968.

LANA, M. & TAFURE, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas In: NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M. & VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana.** 12<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Atheneu. cap.11, pp 89-114, 2011.

LESCURE, F. X.; LE LOUP, G.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect Dis.** 10: 556-570, 2010.

LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S. E. B.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi* infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology.** v. 145, p. 357-364, 2006.

LOPES, C. R.; FALKOWSKI, G. J. S.; BRUSTOLIN, C. F.; MASSINI, P. F.; MOREIRA, N. M.; BRAGA, C. F.; FERREIRA, E. C.; ALEIXO, D. L.; ARAÚJO, S. M. Effect of different homeopathic medicines on histopathology of mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Int J High Dilution Res.** 12(44):141-142, 2013.

MAGALHÃES-SANTOS, I. F.; ANDRADE, S. G. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 100(5): 555-561, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, S.; SOZZANI, P.; ALLAVENA, A.; VECCHI, M.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, Trends. **Immunol.** 25: 677-686, 2004.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation.** 115: 1109-1123, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian consensus on Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, p.7-29, 2005.

MOREIRA, N. M.; SANTOS, F. N.; TOLEDO, M. J. O. T.; MORAES S. M. F.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, S. M. Moderate physical exercise reduces parasitaemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Experimental Pathology.** v. 94, p. 426-435, 2013.

OCCHI, R. C.; SOARES, C. S.; FRANZÓI-DE-MORAES, S. M.; BATISTA, M. R.; KWABARA, H. N.; SOUSA, A. M. R. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte,** v. 18, p. 51-57, 2012.

OLIVEIRA, A.B.; ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D. A utilização de medicamentos homeopáticos na região metropolitana de Curitiba. **Visão Acadêmica,** v. 5, n. 2, p. 151-158, 2004.

OLIVEIRA, G. M.; MASUDA, M. O.; ROCHA, N. N.; SCHOR, N.; HOOPER, C. S.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; HENRIQUES, P. A. Absence of Fas-L aggravates renal injury in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.104, p.1063-1071, 2009.

OSWALD, I. P.; WYNN, T. A.; SHER, A.; JAMES, S. L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma –induced activation. **Proc Natl Acad Sci USA**. 89: 8676-8680, 1992.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas diseases. **Lancet Infect Dis**. 1. 92-100, 2001.

PUPULIN, A. R. T.; ARAÚJO, S. M.; TOLEDO, M. J. O.; GOMES, M. L.; TAKEJIMA, E.; CUMAN, R. K. N.; AMADO, C. A. B. Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**. v. 126, p. 435–440, 2010.

QUEIROZ, A. O.; XAVIER, S. C. C.; FARIA, K. G.; BERNARDO, R. R.; LEITÃO T. C. A. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: Um Estudo in vivo. **Cult Homeopat**, v. 17, p. 9-13, 2006.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLES, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**. v.29, n.10, p. 1611-1614, 1979.

RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. **Lancet Infect Dis**. 375:1388–402, 2010.

REY, L. Parasitologia: Parasitos e doença parasitárias do homem nas Américas e na África; Parasitology: parasites and men parasitology diseases in América na Africa, 2001.

SANDRI, P. F.; FALKOWSKI, G. J. S.; HERNANDES, L.; DALÁLIO, M. M. O.; ALEIXO, D. L.; GOMES, M. L.; JÚNIOR, A. D. N.; MOLITERNO, R. A.; ARAÚJO, S. M. Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17d increases apoptosis in experimentally infected mice. **International Journal of High Dilution Research**.v. 10, n.36, p. 119 124, 2011.

SANTELLO, F. H: **Efeito da Administração de Melatonina Oral na Evolução da Doença de Chagas Experimental em Ratos Wistar Infectados com a Cepa Y de Trypanosoma Cruzi**. Dissertação de mestrado em Biociências Aplicadas a Farmácia. Universidade de São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2005.

SANTOS-LIMA, E. C.; GARCIA, V.; VICENTELLI, M. H.; VASSALLI, P.; MINOPRIO, P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect Immun**. 65: 457-465, 1997.



SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 94, suppl. I, p. 51-63, 1999.

SCHEBELESKI-SOARES, C.; OCCHI, R. C.; DE MORAES, F.; MARTA, S. D.; DE OLIVEIRA, M.; ALMEIDA, F. N. Pre-infection aerobic treadmill training improves resistance against. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**. v. 34, p. 659-665, 2009.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTIN, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**. 8: S314-S325, 2003.

SITTIPUNT, C.; STEINBERG, K. P.; RUZINSKI, J. T. MYLES, C.; ZHU, S.; GOODMAN, R. B.; HUDSON, L. D.; MATALON, S.; MARTIN, T. R. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care medicine**. 163: 503-510, 2001.

SOARES, R. C. O.; SOARES, C. S.; MORAES, S. M. F.; BATISTA, M. R.; KWABARA, H. N.; SOUSA, A. M. R.; MOREIRA, N. M.; GOMES, M. L.; ARAÚJO, S. M. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: Influência do exercício físico versus linhagens e sexos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. vol. 18, n. 1, p. 51-57, 2012.

TAFURI, W. L. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. **Virchows Arch A Pathol Pathol Anat**. 354: 136-149, 1971.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**. 18: 262-265, 2002.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. **Rev Med**. v. 85, n. 2. p. 30-43, 2006.

TORRICO, F. HEREMANS, H.; RIVERA, T.; VAN MARCK, E.; BILIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Immunol**. v. 146, p. 3626-3632, 1991.

VINHAES M. C.; DIAS, J. C. [Chagas diseases in Brazil]. **Cad Saude Publica**. 16 suppl. 2 7-12, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 25-02-2013.

## CAPÍTULO II

*Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios gástricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

*Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuiem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Maringá,  
Maringá, PR

Endereço de correspondência: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS) Bloco I-90 - Av. Colombo 5790, Zona 7, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Email addresses: [brustolin\\_camilaf@hotmail.com](mailto:brustolin_camilaf@hotmail.com)

*Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a influência do tratamento com soluções ultradiluídas de *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus* nos aspectos parasitológicos, inflamatórios, imunológicos, número e morfologia de neurônios mientéricos em ratos Wistar infectados por *T. cruzi*. **Material e métodos :** O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio. O estudo envolveu 75 ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) machos, com 45 dias de idade, inoculados intraperitonealmente com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* e divididos em três grupos: CI (controle infectado, tratado com solução hidroalcolica 7%); Ly (tratados com *Lycopodium clavatum* 13CH - diluição 1:10<sup>26</sup>); Phos (tratados com *Phosphorus* 13 CH - diluição 1:10<sup>26</sup>). Todos os tratamentos foram oferecidos *ad libitum* dois dias antes da infecção e no segundo, quinto e sétimo dia após a infecção (dpi), disponibilizados por 16 horas consecutivas. Parâmetros avaliados: período pré-patente, pico de parasitemia, parasitemia total, quantificação e morfometria de neurônios mientéricos, infiltrado inflamatório (HE) e citocinas (IL1-alfa e beta, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IFN-gama, TNF-alfa, GM-CSF – Multiplex Invitrogen). **Resultados:** Não foi observado diferença significativa para qualquer parâmetro parasitológico analisado. A quantificação neuronal aos 322 dpi nos grupos Ly e Phos mostraram proteção ( $p < 0,01$ ) de 76,2% e 75,4% respectivamente para neurônios do cólon distal em relação ao CI. A análise morfométrica mostrou que aos 125 dpi nos dois segmentos, proximal e distal, Ly e Phos promoveram hipertrofia do corpo neuronal em relação ao grupo CI ( $p < 0,0001$ ). Aos 322 dpi no cólon proximal o grupo Ly apresentou hipertrofia neuronal em relação aos grupos CI (17,1%) e Phos (40,3%), ( $p < 0,0001$ ). No cólon distal, o grupo Phos apresentou neurônios significativamente menores ( $p < 0,0001$ ) que os grupos CI (21,2%) e Ly (20,0%). Quando analisada a evolução da infecção (125dpi x 322dpi), observou-se no cólon proximal, que os grupos CI e Ly apresentaram hipertrofia neuronal ( $p < 0,0001$ ) de 86,8% e 18,9%, respectivamente. Aumento relacionado à hipertrofia da área citoplasmática, seguido de um aumento na área nuclear. O grupo Phos demonstrou hipotrofia neuronal (28,8%), sendo que a redução deveu-se principalmente a diminuição da área citoplasmática (45,9%), enquanto a área nuclear aumentou em 3%. No cólon distal houve hipertrofia neuronal ( $p < 0,0001$ ) em todos os grupos estudados. No coração, no 10° dpi animais tratados com Ly (45%) e Phos (52,5%) apresentaram menor inflamação quando comparados a CI ( $p < 0,01$ ). No Fígado nos diferentes dpi (5°, 10° e 24°) o número de focos inflamatórios foi menor nos animais tratados com Ly (42,8%) e Phos (37,3%) ( $p < 0,01$ ). No intestino no 10° de infecção animais tratados com Ly demonstraram uma redução na inflamação de 51,8% e 67,5% quando comparados a CI e Phos respectivamente. No 24° dpi os dois tratamentos Ly (29,7%) e Phos (40,5%) apresentaram menor inflamação que o CI ( $p < 0,01$ ). No músculo estriado esquelético, no 24° dpi, animais do Phos apresentaram o número de focos inflamatórios 43,6% maior que CI ( $p = 0,0192$ ). Para dosagem de

citocinas observou-se aumento nas concentrações das citocinas, GM-CSF no 5° dpi, IL4 e IFN- $\gamma$  no 10° dpi e IL1- $\beta$ , IL6 e IL12 no 24° dpi, assim como redução das de TNF- $\alpha$  após o tratamento, IL1- $\alpha$  e IL1- $\beta$  no 10° dpi e IL10 no 24° dpi para animais tratados com o medicamento homeopático *Lycopodium clavatum*. No grupo *Phosphorus* aumento nas concentrações de IL2, IL4, IL10, IL12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no 5° dpi, e uma redução de IL1- $\alpha$  e IL4 no 10° dpi e IL1- $\alpha$  e IL2, IL4 e IL12 no 24° dpi. Foi observada forte correlação parcial nos três grupos estudados (CI, Ly e Phos) entre as variáveis n° de neurônios colón distal 322° dpi e as citocina IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,009$ /  $r > 0,7$ ).

**Conclusões:** O tratamento homeopático com os medicamentos *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus* (na potência 13CH - diluição 1:10<sup>26</sup>) promoveu de forma diferente, efeitos benéficos sobre os diversos parâmetros avaliados na infecção por *T. cruzi* em ratos Wistar. Os grupos tratados estabelecem equilíbrio da relação parasito-hospedeiro de forma diversa, com menores danos celulares e teciduais para o hospedeiro infectado. O medicamento *Lycopodium clavatum* modifica o perfil de resposta imunológica dos animais, promovendo menor inflamação e protegendo o intestino, com preservação da população neuronal mientérica e promovendo hipertrofia de neurônios. O medicamento *Phosphorus*, diminui inflamação em tecido cardíaco e protege neurônios de forma menos acentuada. A avaliação de vários marcadores de resposta imunológica em diferentes momentos do processo facilita o entendimento do controle deste processo, seja pelas vias naturais de manutenção de homeostasia do organismo (controle infectado) seja pela intervenção com medicamentos. Medicamentos ultradiluídos proporcionam benefícios no tratamento da infecção experimental por *T. cruzi* reforçando a importância do aprofundamento destes estudos para proposição de novas abordagens terapêuticas para esta infecção e de doenças infecciosas de maneira geral.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas; Neurônios mientéricos; Citocinas; Medicamento Homeopático; *Lycopodium clavatum*; *Phosphorus*.

*Lycopodium clavatum* and *Phosphorus* modulate cytokine response, protect myenteric neurons and decrease inflammation in rats infected with *T. cruzi*.

## ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the influence of treatment with highly diluted *Lycopodium clavatum* or *Phosphorus* solutions on parasitological, inflammatory, immunological, number and morphology of myenteric neurons features in Wistar rats infected by *T. cruzi*. **Material and methods:** The experiment was conducted as a blind, controlled, randomized by lottery assay. The study involved 75 male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar lineage), 45 days old, intraperitoneally inoculated with  $5 \times 10^6 T. cruzi$  Y strain blood trypomastigotes and divided into three groups: IC (infected control group, treated with 7% hydroalcoholic solution), Ly (treated with *Lycopodium clavatum* 13CH -  $1:10^{26}$  dilution), Phos (treated with *Phosphorus* 13 CH -  $1:10^{26}$  dilution). All treatments were offered *ad libitum* on the second day before the infection, and on the second, fifth and seventh day after infection (dai), provided for 16 consecutive hours. Evaluated parameters: pre-patent period, parasitemia peak, total parasitemia, quantification and morphometry of myenteric neurons, inflammatory infiltrate (HE) and cytokines (IL-1 alpha and beta, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IFN-gamma, TNF-alpha, GM-CSF - Multiplex Invitrogen). **Results:** No significant difference was observed for any parasitological parameter evaluated. The neuronal quantification of Ly and Phos groups on 322nd dai showed, respectively, 76.2% and 75.4% protection ( $p < 0.01$ ) to distal colon neurons compared to IC group. The morphometric analysis showed that on 125th dai in both proximal and distal segments, Ly and Phos promoted neuronal body hypertrophy compared to IC group ( $p < 0.0001$ ). On 322nd dai Ly group presented neuronal hypertrophy in proximal colon in relation to IC (17.1%) and Phos (40.3%) groups ( $p < 0.0001$ ). In the distal colon, Phos group presented significantly smaller neurons ( $p < 0.0001$ ) than IC (21.2%) and Ly (20.0%) groups. When analyzing the infection evolution (125dai x 322dai) it was observed in the proximal colon, that IC and Ly groups showed 86.8% and 18.9% neuronal hypertrophy ( $p < 0.0001$ ), respectively. Increase related to cytoplasmic area hypertrophy, followed by a nuclear area increase. The Phos group showed neuronal hypotrophy (28.8%), and the reduction was mainly due to cytoplasmic area decrease (45.9%), while the nuclear area increased by 3%. In distal colon neuronal hypertrophy ( $p < 0.0001$ ) was observed in all groups analyzed. In the heart, on 10th dai animals treated with Ly (45%) and Phos (52.5%) showed less inflammation when compared to IC ( $p < 0.01$ ). In the liver, on several dai (5th, 10th and 24th), the number of inflammatory foci was lower in animals treated with Ly (42.8%) and Phos (37.3%) ( $p < 0.01$ ). In the intestine on 10th day of infection, animals treated with Ly demonstrated a reduction in inflammation of 51.8% and 67.5%, when compared to IC and Phos groups, respectively. On 24th dai both Ly (29.7%) and Phos (40.5%) treatments presented less inflammation than IC ( $p < 0.01$ ). In striated skeletal muscle, on 24th dai, Phos animals showed the number of inflammatory foci 43.6% higher than IC ( $p = 0.0192$ ). About cytokine dosage, it was observed an increase on concentration of GM-CSF on 5th dai, IL4 and IFN- $\gamma$  on 10th dai and IL1- $\beta$ , IL6 and

IL12 on 24th dai, as well as decrease of TNF- $\alpha$  after treatment, IL1- $\alpha$  and IL1- $\beta$  on 10th dai and IL10 on 24th dai for animals treated with *Lycopodium clavatum* homeopathic medicine. In *Phosphorus* group, increased concentrations of IL2, IL4, IL10, IL12, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  on 5th dai, and a reduction of IL1- $\alpha$  and IL4 on 10th dai and IL1- $\alpha$  and IL2, IL4 and IL12 on 24th dai. Strong partial correlation was observed on the three evaluated groups (IC, Ly and Phos) between number of distal colon neurons 322 dai and IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.009$ /  $r > 0.7$ ) cytokine. **Conclusions:** The homeopathic treatment with *Lycopodium clavatum* or *Phosphorus* medicines (13CH potency - 1:10<sup>26</sup> dilution) promoted, in a different way, beneficial effects on several parameters evaluated in *T. cruzi* infection in Wistar rats. The treated groups establish balance of host-parasite relation differently, with lower cell and tissue damage to the infected host. *Lycopodium clavatum* medicine modifies the animals immune response form, promoting less inflammation and protecting the intestine, preserving the myenteric neuronal population and promoting hypertrophy of neurons. *Phosphorus* medicine reduces cardiac tissue inflammation and protects neurons less sharply. The evaluation of several immune response markers at the process different times eases the control of this process understanding, either by natural means of maintaining organism homeostasis (infected control) or by intervention with medicines. Highly diluted medicines provide benefits in the treatment of experimental infection by *T. cruzi*, strengthening the importance of deepening these studies to propose new therapeutic approaches for this infection and infectious diseases in general.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Myenteric neurons; Cytokines; Homeopathic medicine; *Lycopodium clavatum*; *Phosphorus*.

## INTRODUÇÃO

Descrita por Carlos Chagas em 1909, a doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, e ainda hoje representa um grave problema de saúde pública (SCHMUNIS & YADON, 2010). A estimativa é de que aproximadamente 10 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas estão sob o risco de adquirir a infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

No decorrer da doença observam-se duas fases clínicas. A aguda dura de 30 a 90 dias e é caracterizada pelo elevado parasitismo tecidual e parasitemia patente. Em humanos esta fase é frequentemente não aparente, e muitas vezes desenvolve-se com sintomas inespecíficos (PRATA 2001; JR RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Após o período agudo segue-se a fase crônica onde cerca de 70% dos indivíduos permanecem assintomáticos caracterizando a forma indeterminada ou inaparente da doença. Trinta por cento desenvolvem a fase crônica sintomática em um período de 10 a 30 anos após a infecção com manifestações clínicas cardíacas e/ou digestivas (PRATA 2001; JR RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Acredita-se que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento das manifestações de comprometimento do tubo digestório seja um processo degenerativo, principalmente de células neuronais do sistema nervoso entérico-SNE (ADAD *et al.* 2001; SILVEIRA *et al.* 2007), que tem seu início aparentemente na fase aguda, persistindo até a fase crônica (ANDRAD; ANDRADE, 1966; ANDRADE; ANDRADE, 1969; KOBERLE, 1968). Presume-se que esta desnervação seja a principal causa do mau funcionamento intestinal, bem como dos mecanismos de alteração de motilidade e secreção observados na fase crônica (MAIFRINO *et al.* 1999; MAIFRINO *et al.* 2005). Além disto, a patogênese da infecção pelo *T. cruzi* envolve um processo inflamatório generalizado onde as diferentes citocinas têm papel importante (LANA AND TAFURE, 2011; SHER *et al.*, 1992).

Desde a descoberta da doença seu tratamento ainda continua sendo um problema. No Brasil, apenas o benznidazol encontra-se disponível com aplicabilidade na fase aguda e eficácia limitada na fase crônica, condição onde a maioria dos pacientes se encontra atualmente (PORTAL DA SAÚDE, 2013). Além de ser a única droga disponível para o tratamento da doença, este medicamento apresenta diversas



limitações, como administração por períodos prolongados, alta toxicidade e efeitos adversos relevantes que resultam em baixa adesão ao tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; PEDRA *et al.*, 2011). Sendo assim, a busca por um medicamento mais eficaz ou medidas alternativas de intervenções que visem redução de efeitos indesejáveis e consequente adesão de pacientes ao tratamento constituem um grande desafio para diversos pesquisadores (SCHEBELESKI-SOARES *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013; ALEIXO *et al.*, 2008, PUPULIN *et al.*, 2010, FERRAZ *et al.*, 2011, ALEIXO *et al.*, 2012).

Dados recentes mostram que ao longo dos últimos anos estudos com substâncias naturais têm se intensificado em busca de novas drogas. Devido à diversidade de suas estruturas moleculares e elevada produção de metabólitos secundários esses compostos têm demonstrado ser uma rica fonte de terapias para uma grande variedade de doenças (LAZARIN *et al.*, 2013; VEIGA *et al.*, 2013; WINK, 2012). Neste sentido, substâncias ultradiluídas têm sido estudadas (BONAMIN; LAGACHE, 2006; BONAMIN, 2008), e demonstram benefícios no tratamento da infecção experimental pelo *T. cruzi* (FERRAZ *et al.*, 2011; SANDRI *et al.*, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2006), constituindo uma alternativa eficiente e segura para tratar ou contribuir na redução da toxicidade e efeitos colaterais de diversos medicamentos. (TEIXEIRA, 2006; ALEIXO *et al.*, 2012). A imunomodulação é uma das características discutidas destes medicamentos (PUPULIN *et al.*, 2010; ALEIXO *et al.*, 2012, HONDA *et al.*, 2010).

A utilização de animais na experimentação é de extrema importância em pesquisas científicas e contribui para o desenvolvimento da ciência e tecnologia (FAGUNDES; TAHA, 2004).

A qualidade de um modelo animal está diretamente relacionada à sua capacidade de reprodução de parâmetros que possibilitem uma extrapolação dos resultados para a espécie humana devendo ser, portanto, funcionalmente o mais semelhante possível ao homem (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Em diversos estudos o tratamento com *Lycopodium clavatum* apresentou benefícios para camundongos infectados pelo *T. cruzi* promovendo melhor desenvolvimento clínico (FALKOWISKI *et al.*, 2012), menores índices de parasitemia, menor parasitismo tecidual e maior sobrevivência para os animais (FALKOWISKI, *et al.*, 2012 ; LOPES *et al.*, 2013). O tratamento de camundongos com *Phosphorus* pré-infecção com *T. cruzi* modulou a resposta imune dos animais aumentando significativamente a quantidade de linfócitos reduzindo o período de parasitemia patente

e o índice de mortalidade, principalmente durante a fase aguda da infecção (ALMEIDA *et al.*, 2008). Porém esses animais são mais susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* o que dificulta a avaliação de diversos parâmetros da doença, principalmente durante a fase crônica, tornando-se necessário a utilização de um modelo experimental mais resistente (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A utilização de *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, na infecção experimental pelo *T. cruzi*, mostra-se mais interessante por ser mais resistente, apresentando maior sobrevivência o que permite melhores condições de estudo e avaliação de diversos parâmetros, sobretudo na fase crônica da doença. Além disso, seu maior porte oferece maior quantidade de material biológico para análises complementares, assim como avaliação clínica facilitada.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho avaliar a influência do tratamento com soluções ultradiluídas de *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus* nos aspectos parasitológicos, inflamatórios, imunológicos, número e morfologia de neurônios mientéricos em ratos Wistar infectados por *T. cruzi*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Ética*

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná - Parecer 110/2011. Todas as recomendações da lei nacional na experimentação animal (nº 6.638, 05 de Novembro, 1979) foram respeitadas.

### *Delineamento experimental*

O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio e repetido duas vezes.

### *Animais*

O estudo envolveu 75 ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) machos, com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram mantidos por 7 dias no biotério setorial para um processo de adaptação. Os animais foram acondicionados em caixas convencionais de polipropileno (dimensão de 30x20x13cm) com tampa de metal contendo divisórias para ração (Nuvilab Cr-1<sup>®</sup> da Nuvital<sup>®</sup>) e água (Modelo GC 111 - Beiramar<sup>®</sup>), oferecidos *ad*

*libitum*. Os animais foram divididos três a três, de modo que as médias dos pesos iniciais fossem estatisticamente iguais. As caixas foram mantidas em biotério climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas. No piso da gaiola (forração ou cama) foi utilizado zeólita clinoptilolita (Zeocel<sup>®</sup>, Celta Brasil) pela sua alta capacidade de absorção.

### *Infecção*

Os animais foram infectados intraperitonealmente com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y, por animal (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953). Este inóculo foi determinado em experimentos prévios, por causar morbidade/mortalidade na espécie *Rattus norvegicus* permitindo, no entanto evolução da infecção até a fase crônica (BRUSTOLIN *et al.*, 2013).

### *Grupos experimentais e tratamento*

Foram organizados os seguintes grupos: grupo CI (n=25) - controle infectado e tratado com solução hidroalcoólica 7% (água / etanol), grupo Ly (n=25) - infectado e tratado com *Lycopodium clavatum* diluição 1:1x10<sup>26</sup>, grupo Phos (n=25) - infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10<sup>26</sup>.

Todos os tratamentos (*Lycopodium clavatum* 13 cH e *Phosphorus* 13 cH) foram diluídos em água (1mL/100mL) e oferecidos *ad libitum* 48 horas antes da infecção e 48, 96 e 144 horas após a inoculação. Os medicamentos foram disponibilizados aos animais por 16 horas consecutivas em bebedouro âmbar. O grupo controle recebeu apenas a solução hidroalcoólica 7% também diluído 1 mL/100 mL de água (FALKOWSKI *et al.*, 2012).

### *Phosphorus e Lycopodium clavatum*

Os medicamentos foram preparados seguindo as orientações da Farmacopeia Homeopática Brasileira (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 1997). Foram produzidos a partir das tinturas mãe de *Lycopodium clavatum* (Doith Homeopathy Union, Alemanha) e *Phosphorus* (Homeopatia Bento Muri, São Paulo, Brasil. Para alcançar a diluição final (1:10<sup>26</sup>) foram feitas 13 diluições sucessivas de 1:100. A homogeneização para cada diluição foi procedida com 100 agitações mecânicas (Agitador mecânico Denise 10-50, AUTIC, Brasil). A potência 13cH – diluição 1:10<sup>26</sup>

foi utilizada por indicação de um médico veterinário homeopata, por se tratar de infecção aguda em animais de pequeno porte.

*Parâmetros analisados:*

*Avaliação da evolução da infecção:*

A parasitemia foi avaliada segundo a técnica de Brener (1962). A contagem de parasitos foi realizada em todos os animais de cada grupo, diariamente a partir do 4º dia de infecção até que estivesse zerada por três dias consecutivos. A curva foi traçada utilizando a parasitemia média para cada grupo. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- ✓ Período patente: tempo médio, em dias, que cada grupo apresentou parasitemia detectada no exame a fresco.
- ✓ Pico de parasitos: representado pelo maior número de parasitos observados em cada grupo a partir da curva de parasitemia média.
- ✓ Dia do pico: representado pelo maior número de parasitos em um único dia.
- ✓ Parasitemia total: média da soma da parasitemia de cada dia para os animais de cada grupo.

*Coleta de Intestino*

Aos 125º e 322º dias de infecção, três animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico (cloridrato de cetamina 50mg/kg e xilasina-10mg/kg, intraperitonealmente) para coleta do intestino. O cólon foi retirado e lavado com solução salina 0,85%, preenchido e imerso em solução fixadora de Giemsa por tempo indeterminados, para posterior dissecação e confecção de preparados totais constituídos de túnicas muscular e serosa, os quais foram corados utilizando a técnica de Giemsa (BARBOSA, 1978). A partir dos preparados, foram quantificados os neurônios mientéricos presentes em 120 campos microscópios ao longo da circunferência intestinal dos segmentos proximal e distal do cólon de cada rato. Foi utilizado microscópio fotônico (Olympus CBA), com objetiva de 40X. A desnervação (morte neuronal) foi avaliada pela comparação entre os grupos controle (CI) e grupos tratados (Ly e Phos), sendo expressa em média e desvio padrão ou em porcentagem.

*Análise morfométrica de neurônios mientéricos*

Mensurou-se utilizando o software Image-pro plus 4.5 a área do corpo celular e do núcleo de 300 neurônios do plexo mientérico distribuídos equitativamente pela circunferência intestinal do cólon de cada animal. As imagens foram capturadas em microscópio fotônico trinocular (MOTIC B5) acoplado a uma câmera de vídeo digital de alta definição (MOTICAM 2000). Foi determinada para cada neurônio (1) área do corpo celular, (2) área do núcleo e (3) a área do citoplasma que corresponde à diferença entre a área do corpo celular e a área do núcleo.

#### *Processo Inflamatório*

No 5º, 10º, 24º dia após infecção, foi realizada coleta de órgãos de três animais de cada grupo/tempo avaliado. Foram retirados amostras de coração, baço, fígado, músculo esquelético e intestino, lavados em solução fisiológica 0,9%, fixados em formol 10% tamponado e após 24 horas mantidos em álcool 70%, até que fossem submetidas aos processos de desidratação e diafanização para serem emblocadas em parafina.

Foram confeccionados cortes histológicos de 5µm de espessura corados por hematoxilina-Eosina. A confecção das lâminas foi realizada com intervalo de 20 µm, evitando a análise repetida de um mesmo processo inflamatório. Cortes de cada órgão foram examinados em microscópio óptico com aumento de 40x, contando-se o número de focos inflamatórios presentes em 10 campos para cada corte.

#### *Dosagem de Citocina*

A análise de citocinas foi realizada a partir do sangue coletado de três animais por grupo, após o tratamento e antes da infecção (TNI), nos dias 5º, 10º, 24º e 32º após a infecção. Aproximadamente 500 µL de sangue de três animais de cada grupo foram coletados, colocado em frasco sem anticoagulante para obtenção de soro e estocado a -40°C em alíquotas de 90 µL.

Foram dosadas as citocinas: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), Interferon Gama (IFN-γ), Interleucina-1 alfa (IL-1α), Interleucina-1 Beta (IL-1β), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina-12 (IL-12) (p40/p70) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α) em 50 µL de soro. Foi utilizado o kit Multiplex - Rat Cytokine Magnetic 10-Plex Panel (Invitrogen). A reação foi realizada de acordo com orientações do fabricante e a fluorescência lida em leitor Luminex (Luminex® 200™ xPONENT).

As concentrações das citocinas foram expressas em picogramas/ml. O resultado final foi expresso em média  $\pm$  desvio padrão das concentrações obtidas dos tres animais utilizados para cada grupo.

#### *Análise estatística*

A distribuição dos dados foi verificada com o teste D'Agostino Pearson e/ou Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão e comparados com o teste T. Dados com distribuição não especificada foram comparados com o teste *Mann Whitney*. O teste de Pearson e teste de correlação parcial foram usados para testar as correlações. Correlação com valor de "r" até 0,299 foi considerada fraca, variando de 0,300 – 0,499 foi considerada intermediária e variando de 0,500 – 0,999 foi considerada forte. Foi utilizado nível de significância de 5% e o programa BioEstat 5.0<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

### Evolução da Infecção

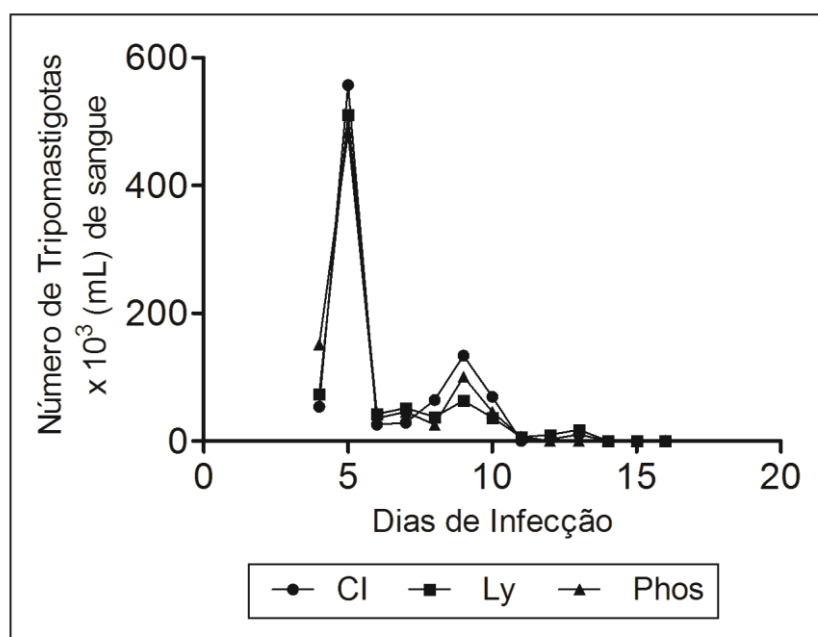


Figura 1. Curva média de parasitemia em ratos Wistar, machos, 45 dias de idade, infectados com  $5,0 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Comparação dois a dois entre os grupos tratados (Ly e Phos) e controle (CI). Teste T ( $p > 0,05$ ).

Embora inicialmente os níveis de parasitos sanguíneos tenham sido ligeiramente mais elevados nos animais tratados com Ly e Phos, com a evolução da infecção os medicamentos promoveram redução da parasitemia sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle (Figura 1).

**Tabela 1.** Médias e desvio padrão de parâmetros parasitológicos avaliados em ratos, Wistar, machos, 45 dias de idade. Controle Infectado (CI), Tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) e *Phosphorus* (Phos).

Grupo	PPP(dias)	PP (dias)	Pmax (x 10 <sup>5</sup> )	Ptotal (x 10 <sup>5</sup> )
			Tripomastigotas/mL	Tripomastigotas/mL
CI	3.2 ± 0.5	5.6 ± 2.5	5,6 ± 8,4	11,5 ± 14,7
Ly	3.6 ± 0.7	4.8 ± 2.6	5,1 ± 8,0	8,7 ± 10,0
Phos	3.2 ± 0.4	5.0 ± 2.3	4,8 ± 6,2	10,2 ± 8,8

PPP: Período pré-patente, PP: Período patente, PMax: Pico máximo de parasitemia  
 Ptotal: Parasitemia total. Dados apresentados como média ± desvio-padrão.  
 Comparação entre os grupos CI, Ly e Phos.

A curva de parasitemia apresentou um pico de  $5,6 \times 10^5$ ,  $5,1 \times 10^5$  e  $4,8 \times 10^5$  tripomastigotas/mL no 5º dpi para os animais dos grupos CI, Ly e Phos respectivamente, com menor variação individual no grupo Phos. Não houve diferença estatística entre o período pré-patente, período patente e parasitemia total para os grupos avaliados (Figura 1, Tabela 1).

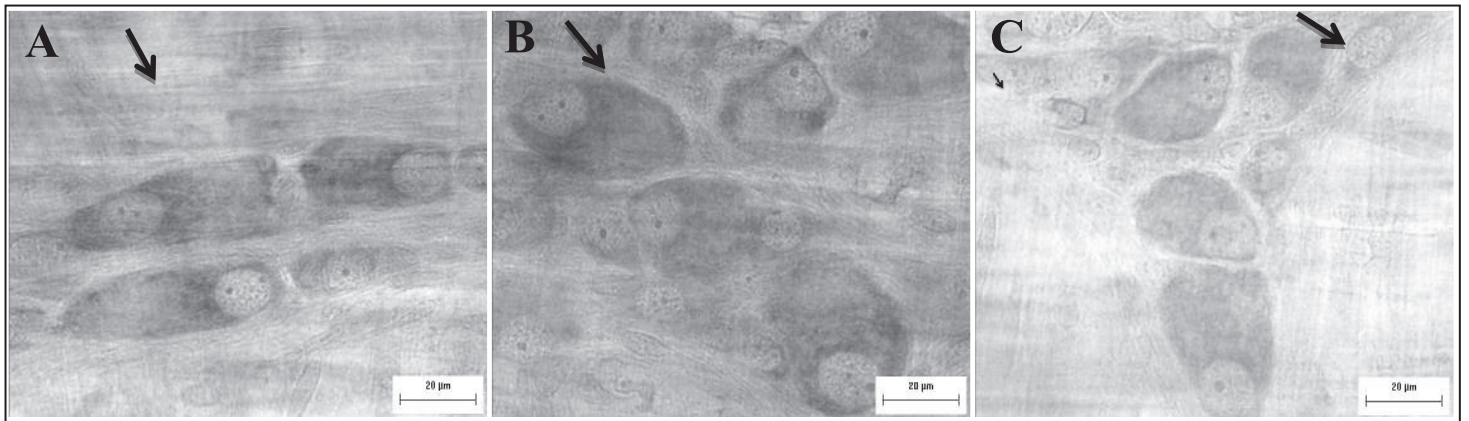
*Análise quantitativa de neurônios mientéricos*

**Tabela 2.** Médias ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (sd) da densidade de neurônios mientéricos do cólon de ratos Wistar, machos submetidos à infecção com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 125 e 322 dias após a infecção.

	Cólon Proximal		Cólon Distal	
	125 dias ( $\bar{x} \pm sd$ )	322 dias ( $\bar{x} \pm sd$ )	125 dias ( $\bar{x} \pm sd$ )	322 dias ( $\bar{x} \pm sd$ )
CI	96,6 ± 18,5	103,7 ± 27,9	116,7 ± 13,3 <sup>a</sup>	52,9 ± 8,1 <sup>Ab</sup>
Ly	141,9 ± 57	107,8 ± 16,1	114,4 ± 13	93,2 ± 9 <sup>B</sup>
Phos	100,7 ± 24,4	124,0 ± 6,1	88,7 ± 15,6	92,8 ± 18,7 <sup>B</sup>

Valores seguidos de diferentes letras maiúsculas em uma coluna = diferença significativa a 5% (comparação entre os diferentes grupos em cada dia de infecção isoladamente 125 ou 322); Diferentes letras minúsculas em uma linha = diferença significativa a 5% (comparação ao longo de infecção (125 x 322) para cada grupo e cada segmento avaliado). Dados que não estão destacados com letras, não apresentam diferença significativa em relação a quaisquer outros valores da tabela.





**Figura 2.** Foto representativa de neurônios do cólon distal de ratos Wistar infectados pela cepa Y de *T. cruzi* aos 322° dpi para os grupos: CI – Controle Infectado (A) – Menor quantidade de neurônios mientéricose hipertrofia neuronal, Ly – Tratado com *Lycopodium clavatum* (B) – Maior quantidade de neurônios mientéricos e hipertrofia neuronal, Phos - Tratado com *Phosphorus* (C) - Maior quantidade de neurônios mientéricos e atrofia neuronal.

Aos 125 dpi não foi observada diferença significativa no número de neurônios mientéricos entre grupos Ly, Phos e CI (Tabela 2). Contudo, aos 322 dpi Ly e Phos mostraram proteção de 76,2% e 75,4% respectivamente para neurônios do cólon distal quando comparado ao grupo CI ( $p < 0,01$ ), analisando-se os números da (Tabela 2).

Com a evolução da infecção (comparação entre o 125° e 322° dias) no cólon distal, observou-se que os animais do grupo CI apresentaram redução de 54,7% do número de neurônios ( $p < 0,01$ ). Já nos grupos tratados, nos dois segmentos, este parâmetro não mostrou redução do número destas células.

Morfometria de neurônios mientéricos

**Tabela 3.** Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (sd) da área do corpo celular, citoplasma e núcleo, de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos Wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 125 e 322 dias após a infecção.

Cólon Proximal						
Grupos	125 dias			322 dias		
	Corpo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Citoplasma ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Núcleo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Corpo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Citoplasma ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Núcleo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$
CI	184.4 $\pm$ 135.5 <sup>Aa</sup>	122.8 $\pm$ 102.1 <sup>Aa</sup>	61.5 $\pm$ 42.6 <sup>Aa</sup>	344.4 $\pm$ 163.0 <sup>Ab</sup>	241.0 $\pm$ 135.7 <sup>Ab</sup>	103.4 $\pm$ 43.0 <sup>Ab</sup>
Ly	339.2 $\pm$ 133.0 <sup>Ba</sup>	229.1 $\pm$ 113.0 <sup>Ba</sup>	110.1 $\pm$ 37.6 <sup>Ba</sup>	403.4 $\pm$ 206.5 <sup>Bb</sup>	291.7 $\pm$ 176.2 <sup>Bb</sup>	111.6 $\pm$ 42.7 <sup>Ba</sup>
Phos	404.1 $\pm$ 143.3 <sup>Ca</sup>	263.0 $\pm$ 135.5 <sup>Ca</sup>	141.1 $\pm$ 82.1 <sup>Ca</sup>	287.6 $\pm$ 171.1 <sup>Cb</sup>	142.2 $\pm$ 115.3 <sup>Cb</sup>	145.4 $\pm$ 121.2 <sup>Cb</sup>

Valores seguidos de diferentes letras maiúsculas na mesma coluna mostram diferença significativa a 5% (comparação entre os diferentes grupos, para cada parâmetro avaliado (corpo celular, citoplasma e núcleo), em cada dia de infecção isoladamente 125 e 322); \*\* Diferentes letras minúsculas em uma linha demonstram diferença significativa a 5% (comparação entre os dias ao longo de infecção (125 x 322) para cada grupo, e cada parâmetro avaliado).

**Tabela 4.** Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (sd) da área do corpo celular, citoplasma e núcleo, de neurônios mientéricos do cólon distal de ratos Wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 125 e 322 dias após a infecção.

Cólon Distal						
Grupos	125 dias			322 dias		
	Corpo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Citoplasma ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Núcleo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Corpo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Citoplasma ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$	Núcleo ( $\bar{x} \pm sd$ ) $\mu\text{m}$
CI	131.0 $\pm$ 108.8 <sup>Aa</sup>	88.8 $\pm$ 79.2 <sup>Aa</sup>	42.2 $\pm$ 35.2 <sup>Aa</sup>	361.9 $\pm$ 184.7 <sup>Ab</sup>	260.2 $\pm$ 157.6 <sup>Ab</sup>	101.6 $\pm$ 41.0 <sup>Ab</sup>
Ly	201.5 $\pm$ 103.9 <sup>Ba</sup>	139.1 $\pm$ 86.4 <sup>Ba</sup>	62.4 $\pm$ 31.2 <sup>Ba</sup>	358.3 $\pm$ 238.3 <sup>Bb</sup>	256.8 $\pm$ 205.5 <sup>Bb</sup>	101.6 $\pm$ 42.3 <sup>Ab</sup>
Phos	264.7 $\pm$ 128.1 <sup>Ca</sup>	183.7 $\pm$ 105.5 <sup>Ca</sup>	81.0 $\pm$ 35.2 <sup>Ca</sup>	298.5 $\pm$ 157.0 <sup>Cb</sup>	208.1 $\pm$ 132.2 <sup>Cb</sup>	90.4 $\pm$ 40.3 <sup>Bb</sup>

Valores seguidos de diferentes letras maiúsculas na mesma coluna mostram diferença significativa a 5% (comparação entre os diferentes grupos, para cada parâmetro avaliado (corpo celular, citoplasma e núcleo), em cada dia de infecção isoladamente 125 e 322); \*\* Diferentes letras minúsculas em uma linha demonstram diferença significativa a 5% (comparação entre os dias ao longo de infecção (125 x 322) para cada grupo, e cada parâmetro avaliado).

Nas tabelas 3 e 4, estão representados os valores relativos à área do corpo neuronal, citoplasma e núcleo, para os grupos CI, Ly e Phos nos diferentes segmentos e dias de infecção avaliados. Aos 125 dpi nos dois segmentos, proximal e distal, Ly e Phos promoveram hipertrofia do corpo neuronal de 83,9% e 119,1% em neurônios do cólon proximal respectivamente, assim como hipertrofia de 53,8% e 102,1% em neurônios do cólon distal em relação ao grupo controle. Este aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) ocorreu tanto na área citoplasmática quanto na área nuclear do cólon proximal e distal. Contudo, mesmo com os dois tratamentos apresentando neurônios significativamente maiores que o observado em animais do grupo CI, o grupo Phos demonstrou maior hipertrofia em relação ao Ly de 19,1% e 31,4% no cólon proximal e cólon distal respectivamente neste período avaliado.

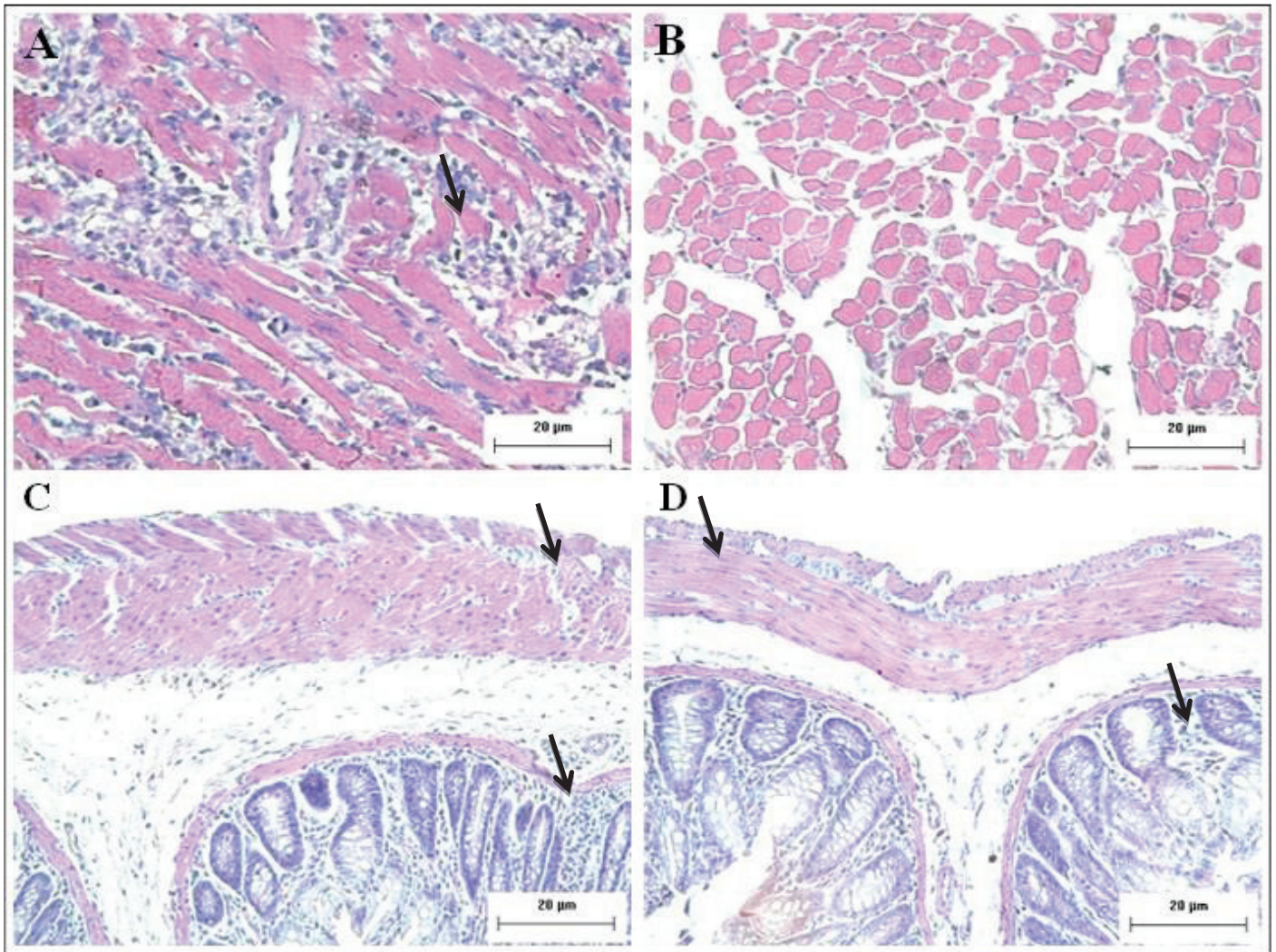
Aos 322 dpi no cólon proximal o grupo Ly apresentou hipertrofia neuronal em relação aos grupos CI (17,1%) e Phos (40,3%), esse resultado deveu-se a aumento da área citoplasmática e nuclear em relação ao CI. Ao comparar Ly x Phos é possível observar que a hipertrofia detectada no Ly ocorreu devido ao aumento da área citoplasmática (105,1%). A área nuclear em Ly estava reduzida em 23,2%, nesta condição. Ainda no cólon proximal o grupo Phos apresentou neurônios significativamente menores ( $p < 0,0001$ ) que o CI (19,7%). No cólon distal, o grupo Phos apresentou neurônios significativamente menores ( $p < 0,0001$ ) que os grupos CI (21,2%) e Ly (20,0%), sendo que a diferença deveu-se a diminuição da área citoplasmática e nuclear. Não houve diferença significativa entre Ly e CI para os parâmetros avaliados no cólon distal aos 322 dpi.

Quando analisada a evolução da infecção (125dpi x 322dpi) em cada grupo (CI, Ly e Phos) separadamente, observou-se no cólon proximal (tabela 3) que os grupos CI e Ly apresentaram hipertrofia neuronal ( $p < 0,0001$ ) de 86,8% e 18,9%, respectivamente. Este aumento está relacionado à hipertrofia da área citoplasmática e nuclear. Diferente dos grupos CI e Ly o grupo Phos demonstrou atrofia neuronal (28,8%) com a evolução da infecção (125dpi x 322dpi), sendo que a redução deveu-se principalmente a diminuição da área citoplasmática (45,9%), enquanto a área nuclear aumentou em 3%. No cólon distal houve hipertrofia neuronal ( $p < 0,0001$ ) em todos os grupos estudados (tabela 4), sendo de 176,3% para CI, 77,8% para Ly e 12,8% para Phos. Este aumento deveu-se principalmente a hipertrofia do citoplasma e nuclear.

**Tabela 5.** Médias ( $\bar{x}$ ) e desvios padrão (SD) do número de focos inflamatórios presentes em cortes de tecido de ratos Wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas trispomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 5, 10 e 24 dias após a infecção (dpi).

Grupos	5° dpi	10° dpi	24° dpi
<b>Coração</b>			
CI	0.7 ± 1.0	8.0 ± 2.2 <sup>a</sup>	2.2 ± 1.6
Ly	0.7 ± 0.7	4.4 ± 3.3 <sup>b</sup>	1.9 ± 1.1
Phos	1.3 ± 1.1	3.8 ± 1.3 <sup>c</sup>	1.6 ± 1.2
<b>Fígado</b>			
CI	6.9 ± 4.2 <sup>a</sup>	3.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	7.2 ± 4.2 <sup>a</sup>
Ly	3.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	3.2 ± 1.5 <sup>b</sup>
Phos	3.9 ± 1.7 <sup>b</sup>	2.4 ± 1.8 <sup>b</sup>	3.9 ± 1.7 <sup>b</sup>
<b>Intestino</b>			
CI	0.7 ± 1.0	2.7 ± 3.0 <sup>ac</sup>	3.7 ± 1.7 <sup>a</sup>
Ly	0.4 ± 0.5	1.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	2.6 ± 1.0 <sup>ab</sup>
Phos	0.7 ± 0.9	4.0 ± 3.8 <sup>bc</sup>	2.2 ± 0.9 <sup>b</sup>
<b>Músculo estriado esquelético</b>			
CI	0.3 ± 0.6	1.9 ± 1.6	5.5 ± 2.4 <sup>a</sup>
Ly	0.1 ± 0.3	0.9 ± 1.1	7.0 ± 1.9 <sup>ab</sup>
Phos	0.4 ± 0.7	1.7 ± 1.4	7.9 ± 2.7 <sup>b</sup>

Valores seguidos de diferentes letras na mesma coluna mostram diferença significativa a 5%. Comparação de cada dia de avaliação 5°, 10° e 24° dpi entre os grupos: CI, *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus*.

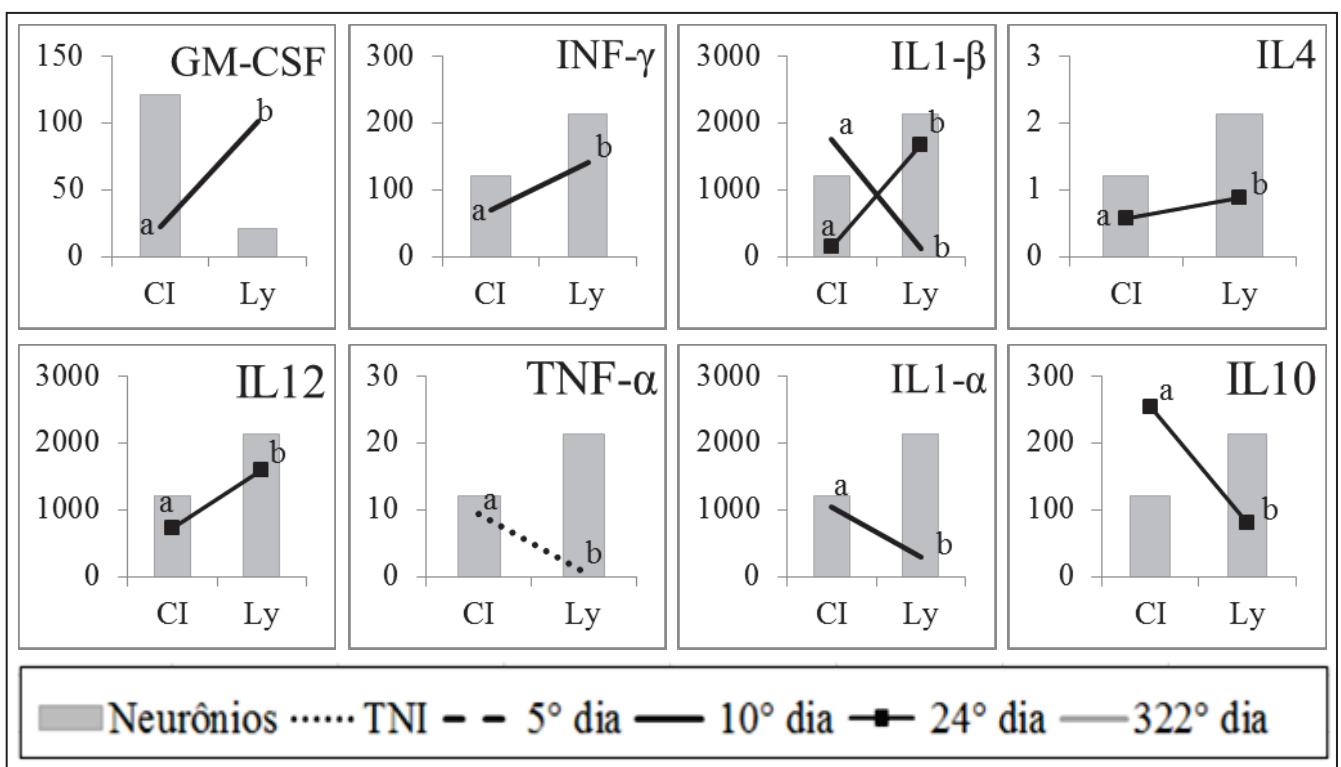


**Figura 3.** Focos inflamatórios em coração e intestino de ratos wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Grupos: Coração-CI (A) - processo inflamatório aumentado e coração-Phos (B) – sem a presença de focos inflamatórios, aumento de 40x. Intestino-CI (C) - processo inflamatório aumentado e intestino Ly-(D) – redução do número de células inflamatórias, aumento de 20x.

A Tabela 6 apresenta o número de focos inflamatórios observados nos diferentes órgãos no 5º, 10º e 24º dia de infecção para os grupos estudados. A figura 3 ilustra alguns destes resultados. No coração, apenas no 10º dpi foi observado diferença significativa ( $p < 0,01$ ) no número de focos inflamatórios, sendo que os animais tratados com Ly (45%) e Phos (52,5%) apresentaram menor inflamação quando comparados a CI. Ainda foi possível observar no grupo Phos menor inflamação (13,6%) que nos animais do grupo Ly. No fígado nos diferentes dpi (5º, 10º e 24º) o número de focos inflamatório foi menor nos animais tratados com Ly (42,8%) e Phos (37,3%) quando comparados ao CI ( $p < 0,01$ ). A partir do 10º de infecção observou-se no intestino, diferença significativa

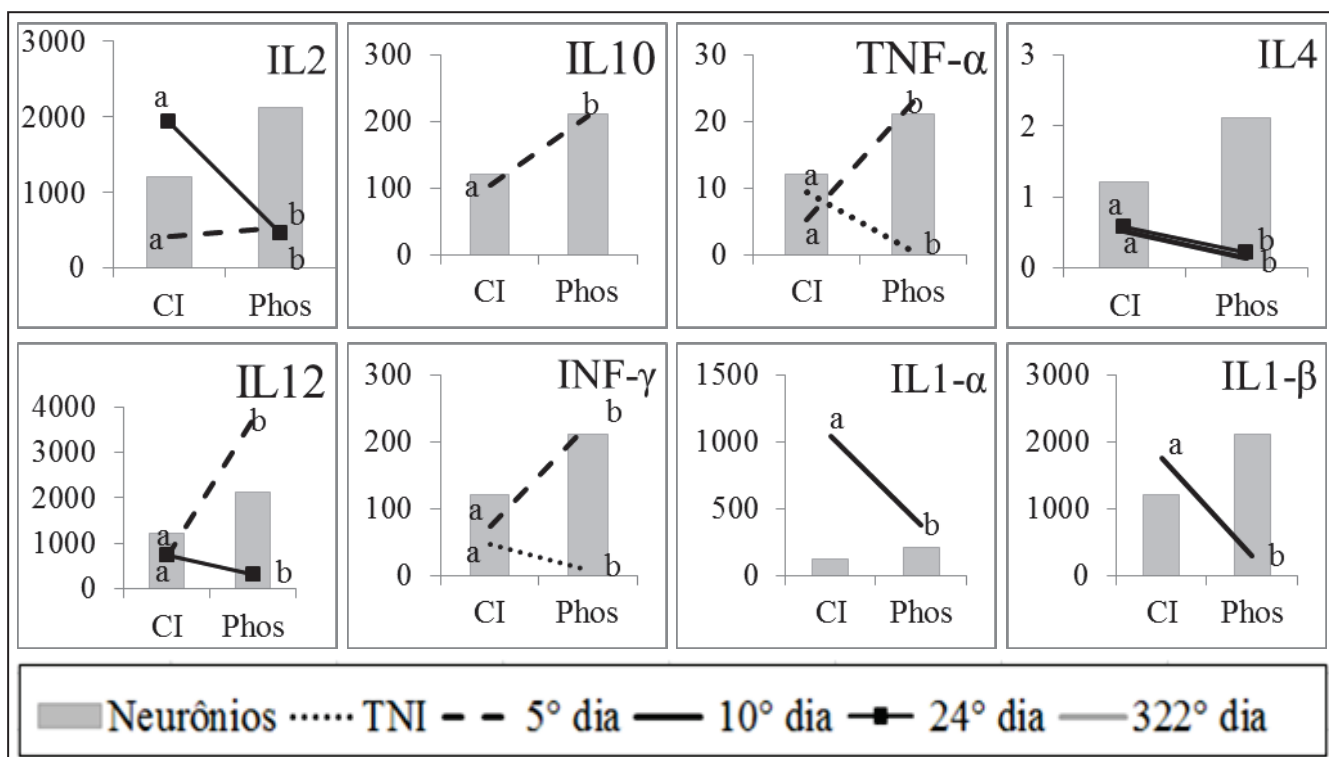
( $p < 0,01$ ) na quantidade de focos inflamatórios, sendo que no 10° dpi os animais tratados com Ly demonstraram uma redução na inflamação de 51,8% e 67,5% quando comparados a CI e Phos respectivamente. O grupo Phos apresentou maior número de focos inflamatórios que o grupo CI ( $p > 0,005$ ) e Ly ( $p < 0,0001$ ). No 24° dpi os dois tratamentos Ly (29,7%) e Phos (40,5%) apresentaram menor inflamação que o CI ( $p < 0,01$ ). No músculo estriado esquelético, foi observada diferença significativa somente no 24° dpi com animais do grupo Phos mostrando o número de focos inflamatórios 43,6% maior que CI ( $p = 0,0192$ ).

#### Correlação entre citocinas e proteção neuronal



**Figura 4.** Comparação entre os grupos Controle Infectado (CI) e *Lycopodium clavatum* (Ly). Média do número de neurônios totais do cólon distal de ratos Wistar infectados com *T. cruzi* aos 322 dpi, correlacionados à média das concentrações (pg/mL) de citocinas. TNI (Animais tratados e não infectados), 5° dia de infecção, 10° dia de infecção, 24° dia de infecção e 322° dias de infecção. Diferentes letras nos grupos, Controle infectado (CI) e Tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) em um mesmo dia de infecção representam diferença significativa a 5% usando teste T de Student. Foram apresentadas as comparações significativas para as diferentes citocinas em cada tempo avaliado.





**Figura 5.** Comparação entre os grupos Controle Infectado (CI) e *Phosphorus* (Phos). Média do número de neurônios totais do cólon distal de ratos Wistar infectados com *T. cruzi* aos 322 dpi, correlacionados à média das concentrações (pg/mL) de citocinas. TNI (Animais tratados e não infectados), 5° dia de infecção, 10° dia de infecção, 24° dia de infecção e 322° dias de infecção. Diferentes letras nos grupos, Controle infectado (CI) e Tratados com *Phosphorus* (Phos) em uma mesmo dia de infecção representam diferença significativa a 5% usando teste T de Student. Foram apresentadas as comparações significativas para as diferentes citocinas em cada tempo avaliado.

As figuras 4 e 5 apresentam ilustrações relativas à correlação entre as diferentes citocinas dosadas, após o tratamento sem infecção (TNI), e no 5°, 10°, 24° e 322° dias após a infecção e o número de neurônios no colón distal de ratos Wistar (322 dpi) para os três grupos estudados.

Observou-se (Figura 4) aumento nas concentrações das citocinas, GM-CSF, e IFN- $\gamma$  no 10° dpi e IL1- $\beta$ , IL-4 e IL12 no 24° dpi, assim como redução de TNF- $\alpha$  após o tratamento e antes da infecção, IL1- $\alpha$  e IL1- $\beta$  no 10° dpi e IL10 no 24° dpi para animais tratados com o medicamento homeopático *Lycopodium clavatum* quando comparados ao controle infectado. Esta dinâmica, esta relacionada à proteção neuronal.

Para animais tratados com medicamento homeopático *Phosphorus* observou-se (Figura 5) que aumento nas concentrações de IL2, IL4, IL10, IL12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no 5° dpi, e redução de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  após o tratamento e antes da infecção (TNI) e IL1-

$\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL4 no 10° dpi e IL2, IL4 e IL12 no 24° dpi, quando comparado ao grupo controle infectado, pode estar relacionado à proteção neuronal.

Não foi observada correlação significativa para o número de neurônios no cólon distal aos 322 dpi e cada citocina avaliada individualmente (Correlação de Pearson).

Quando efetuada a correlação parcial que mede a associação entre duas variáveis e, ao mesmo tempo, controla o efeito de uma terceira (Ayres *et al.*, 2007), nos três grupos estudados (CI, Ly e Phos) foi observado forte correlação entre as variáveis número de neurônios no colón distal no 322° dpi e as citocina IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,009$ / $r > 0,7$ ). Nos grupo CI e Ly, observou-se também forte correlação entre número de neurônios do colón distal no 322° dpi e as citocina GMC-SF e IL4 ( $p = 0,0004$ / $r > 0,8$ ).

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo realizado com a finalidade de verificar a influência do tratamento com os medicamentos homeopáticos *Lycopodiumclavatum* e *Phosphorus* sobre neurônios mientéricos do cólon de ratos Wistar infectados por cepa Y de *T. cruzi* e aspectos parasitológicos, inflamatórios e imunológicos da infecção.

A cepa Y de *T. cruzi*, isolada por SILVA & NUSSENZWEIG (1953), é considerada de referência por apresentar características bem definidas. Possui morfologia predominantemente fina para as formas sanguíneas, com pico de parasitemia bem definido, é altamente virulenta, patogênica, apresenta elevada taxa de mortalidade e demonstra resistência parcial a quimioterápicos (SCORZA & SCORZA, 1972; FILARDI; BRENER, 1987). Em ratos esta cepa apresenta curva de parasitemia, com pico compreendido entre 12° e 14° dias de infecção, quando os parasitos desaparecem da circulação iniciando a fase crônica (ANDRADE; CARVALHO; FIGUEIRA, 1970; ANDRADE, 1974; UYEMURA; ALBUQUERQUE, CURTI, 1995).

O tratamento com os diferentes medicamentos homeopáticos, mesmo mostrando uma tendência em reduzir a parasitemia no pico (5° dia) não promoveu diferença significativa nos parâmetros parasitológicos avaliados por este estudo quando comparados aos animais infectados controle (CI). A curva de parasitemia apresentou pico precoce de parasitos no 5° dia de infecção comparado aos dados da literatura (ANDRADE; CARVALHO; FIGUEIRA, 1970; ANDRADE, 1974; UYEMURA; ALBUQUERQUE, CURTI, 1995). Este achado pode ser justificado considerando que alguns autores demonstraram que a manutenção de cepas de *T. cruzi* em roedores



através de sucessivas passagens sanguíneas, modifica o parasitismo no sangue circulante, assim como sua resistência a medicamentos (LANA & CHIARI, 1986; VELOSO *et al.*, 2005).

#### *Análise quantitativa de neurônios mientéricos*

A proteção da população neuronal total observada aos 322 dpi no cólon distal mostra benefício com melhor prognóstico dos animais tratados, ao contrário do observado nos animais do grupo controle infectado, onde no seguimento distal foi observado desnervação significativa (54,7%), assim como mostra a literatura (50%) (KOBBERLE, 1968). Segundo Koberle (1968), as alterações funcionais no cólon estão associadas à perda da população neuronal no plexo mientérico, assim, as alterações observadas sugerem a possibilidade de desenvolvimento de megacólon com a evolução da infecção no grupo controle e ação neuroprotetora nos grupos tratados com os medicamentos *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus*

#### *Morfometria de neurônios mientéricos*

Quanto à morfometria neuronal mientérica, aos 125 dias de infecção, nos dois segmentos analisados, os animais tratados apresentaram neurônios hipertrofiados, com aumento significativo do corpo neuronal, que se deveu principalmente ao aumento da área citoplasmática, bem como da área nuclear, sugerindo benefício para estes animais. Aos 322 dpi tanto no cólon distal quanto proximal animais do grupo CI, demonstraram aumento no tamanho dos neurônios sobreviventes. Pode-se entender que o aumento observado é uma tentativa do organismo para suprir a morte da população neuronal, induzida nos animais tratados pelo medicamento e reação natural de compensação nos animais controle. Este comportamento já foi observado por outros autores (MOREIRA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2013) e pode estar relacionado ao aumento do metabolismo neuronal e à síntese de proteínas que auxiliam na manutenção do peristaltismo. O tratamento homeopático com os medicamentos *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus*, aos 322 dpi no cólon distal demonstrou benefícios. Além de preservarem a população neuronal, provocaram hipertrofia significativa do corpo celular, devido ao aumento da área citoplasmática e nuclear preservando as funções neuronais no intestino. No cólon proximal, apenas o Ly promove essa hipertrofia. Nos dois segmentos, os animais tratados com medicamento *Lycopodium clavatum* apresentaram melhor desempenho. Estes achados indicam que o tratamento influenciou o metabolismo

destes neurônios, possivelmente aumentando a expressão gênica e a síntese de proteínas nucleares e citoplasmáticas de neurônios colinérgicos e nitrérgicos, relativa à síntese das enzimas colina-acetiltransferase e óxido nítrico sintase neuronal, para formação ativa de acetilcolina e do óxido nítrico (avaliar estes marcadores pode ser uma perspectiva de continuação) responsáveis pela contração e dilatação muscular intestinal respectivamente, resultando em aumento do volume celular, (FURNES & COSTA, 2006) para compensar a perda neuronal. Sendo assim, a hipertrofia observada contribuiu, com melhora da condição animal em nível celular, indicando que o efeito neurotrópico do tratamento com os medicamentos homeopáticos *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus*, criaram condições para manutenção e controle do peristaltismo intestinal em animais infectados por *T. cruzi*. Estes dados explicam e ampliam os de Massini *et al.* (2013) que demonstrou que ratos Wistar infectados por *T. cruzi* e tratados com medicamento *Lycopodium clavatum* (13 Ch) mostram um melhor prognóstico, clínico e anatômico considerando parâmetros relacionados ao cólon. Ainda confirmam outro dado desta autora (Massini, *et al.* 2013) que demonstrou que o *Phosphorus* (13 Ch) também apresenta benefícios no tratamento da infecção de ratos pelo *T. cruzi*, embora de menor significado considerando o aparelho digestivo, porém melhores que o *Lycopodium clavatum* considerando o aparelho cardio-respiratório. A discussão deste resultado torna-se mais interessante quando nos reportamos à matéria médica homeopática (DEMARQUE *et al.*, 2009) destes medicamentos e verificamos que eles são indicados para humanos, na gastroenterologia (Ly) e na gastroenterologia e cardiologia (Phos).

#### *Processo Inflamatório*

A doença de Chagas é caracterizada por um processo inflamatório generalizado (LANA & TAFURE, 2011). Ao avaliar o processo inflamatório no 5º, 10º e 24º dpi, e considerando a importância fisiológica dos tecidos avaliados, pode-se afirmar que os medicamentos utilizados diminuíram os focos inflamatórios em órgãos importantes, relacionados às principais morbidades/formas clínicas desencadeadas pela evolução da infecção por *T. cruzi* quando existem complicações (DIAS, 1989; COURA; PEREIRA, 2011). Houve ação benéfica dos dois medicamentos sendo que Ly apresentou melhor desempenho no intestino e Phos no coração. Na musculatura esquelética o processo inflamatório não foi controlado, o que pode explicar o maior grau neurodegenerativo no plexo mientérico, observado neste grupo. O processo inflamatório mais intenso nos

animais tratados, parece ter sido desviado de um órgão vital (coração) para um tecido de menor importância em termos de manutenção de vida, como tem sido sugerido ocorrer em tratamentos com medicamentos homeopáticos relatados na clínica médica (HAHNEMANN, 1835). Esses dados de inflamação, associados a resultados de morfometria neuronal estão de acordo com dados de nosso laboratório, onde Massini (2013) observou melhor performance clínica de animais tratados com *Lycopodium clavatum* e *phosphorus* com ocorrência de melhor clínica em geral, menos diarreia, melhores dados radiográficos para Ly, bem como, melhor controle da função cardiorrespiratória para Phos.

#### *Correlação entre citocinas e proteção neuronal*

Neste trabalho fica claro a importância da dosagem de diferentes citocinas de forma dinâmica, em vários dias do experimento, pelo fato destas substâncias variarem suas concentrações nos diferentes grupos experimentais de acordo com a evolução da infecção. Não se consegue mostrar esta variação quando se dosa estes efeitos imunológicos em um único dia da infecção como é comumente visto na literatura (PUPULIN *et al.*, 2010; GABRIEL *et al.*, 2012). Essas observações em diferentes dias proporcionam melhor entendimento sobre a participação destas moléculas na patologia e patogenia da doença de Chagas, e no entendimento do efeito de medicamentos ultradiluídos.

As citocinas agem em conjunto para complementar a resposta imune inata ampliando e direcionando as reações, promovendo benefício quando ocorre de forma equilibrada. Exemplificando, os macrófagos quando ativados desempenham importantes funções contra a infecção por *T. cruzi* com interações entre moléculas biologicamente ativas. (REED, 1995; ALIBERTI *et al.*, 1996). Macrófagos ativos sintetizam IL-12, que ativam células NK (Natural Killer) a produzirem IFN- $\gamma$ , citocina envolvida na ativação de macrófagos potencializando a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio para atividade microbicida (ALIBERT *et al.*, 1996). O TNF- $\alpha$ , também importante na resistência contra o *T. cruzi*, é produzido por macrófagos após sua invasão pelo parasito, participando desta interação de forma sinérgica induzindo mais produção de óxido nítrico (NO). Por outro lado sabe-se que este derivado de oxigênio (NO) se produzido em excesso gera danos teciduais, através da exacerbação da inflamação com morte celular, inclusive da população neuronal mientérica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI,

2008), sendo necessário equilíbrio entre a secreção de todas as substâncias envolvidas no processo para que a ação resultante seja benéfica.

Em nossos resultados observou-se ação imunoestimuladora dos medicamentos homeopáticos *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* na produção de IL-12. Juntamente a estes dados foi possível observar forte correlação parcial entre TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e proteção neuronal. A dinâmica de secreção destas citocinas influenciada pelos tratamentos homeopáticos com *Lycopodium Clavatum* e *Phosphorus* pode ser provável explicação para os benefícios aos animais tratados relacionados à proteção e hipertrofia da população neuronal mientérica e diminuição do processo inflamatório em tecidos importantes, reduzindo as possibilidades de ocorrência de complicações digestivas e/ou cardíacas para os animais infectados. Mais detalhadamente, o aumento destas citocinas parece estar relacionado à menor grau de inflamação no coração, fígado, e intestino. Sugerindo que o aumento na concentração de IL-10 no 5º dpi observado em animais tratados com o medicamento homeopático *Phosphorus* promoveu a manutenção de concentrações ideais de NO a fim de obter os benefícios observados neste grupo com redução do número de focos inflamatórios no coração. Estes dados estão de acordo com os de Costa *et al.* (2009), que afirmam que a elevada expressão de IL-10 esta ligada a melhora das funções cardíacas e concordam ainda com os dados de Massini *et al.* (2013) que observou melhores condições clínicas em ratos Wistar infectados por *T. cruzi*. Juntamente com a IL-10, a IL-4 contribui regulando a atividade de macrófagos e produção de NO (SEDER & PAUL, 1994). A dinâmica de produção desta citocina influenciada pelos diferentes medicamentos utilizados neste estudo podem estar relacionada a benefícios, com redução de focos inflamatórios em diversos órgãos assim como proteção da população neuronal.

Morrissey *et al.* (1989) demonstraram que os macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *T. cruzi*, quando incubados com GM-CSF, mostraram-se menos infectados e com menor número de parasitos por célula, demonstrando que o GM-CSF melhorava a capacidade dos macrófagos em inibir a infecção e replicação do *T. cruzi*. Em nosso estudo aumento nas concentrações dessa citocina no 10º dia de infecção pode estar relacionado à melhor prognóstico intestinal para os animais tratados com medicamento homeopático *Lycopodium clavatum*, possivelmente ligados a diminuição na inflamação provavelmente relacionado a alteração no padrão de parasitismo tecidual, com conseqüente proteção neuronal, resultante desse controle da citocina.

A IL-2 é um fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação para linfócitos T. Os linfócitos são responsáveis por desencadear resposta imunológica específica celular e ou humoral dependendo do antígeno. Os linfócitos Th1 secretam IL-2 e IFN- $\gamma$  que ativam Linfócitos T citotóxicos, que aumentam o nível da expansão clonal e seu metabolismo interno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008) para efetuar suas ações. Nos animais tratados com o medicamento homeopático *Phosphorus* fica claro que a dinâmica de secreção desta citocina com aumento no 5° dpi e diminuição no 24° dpi pode ter influenciado na redução de focos inflamatórios no coração demonstrado no presente trabalho, contribuindo assim para melhora clínica do animal em nível cardiorrespiratório conforme relatado por Massini *et al.* (2013).

As IL-1 (IL1- $\alpha$  e IL1- $\beta$ ) são produzidas por diversos tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células epiteliais. São mediadoras da resposta inflamatória em infecções e outros estímulos. Seus efeitos biológicos são muito semelhantes aos do TNF- $\alpha$  e dependem da quantidade de citocina produzida. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Em nossos resultados animais tratados com medicamento homeopático *Lycopodium clavatum* apresentaram variação alternada nas concentrações desta citocina (IL1- $\alpha$  e IL1- $\beta$ ) que estiveram relacionadas a benefícios intestinais.

Como observado em nossos resultados o equilíbrio estabelecido pela utilização dos diferentes medicamentos ultradiluídos foi atingido de forma diversa com cada um dos medicamentos utilizados. Além disso, como a espécie *Rattus norvegicus* é uma espécie naturalmente resistente ao *T. cruzi*, foi possível perceber os danos provocados assim como a tentativa de proteção ensaiada e atingida pelo organismo de forma natural sem intervenção (CI) comparando-a com as reações onde usou-se medicação. Analisando estes dados juntamente com os resultados de Massini *et al.* (2013) que utilizou exatamente o mesmo modelo experimental e protocolo de tratamento conseguimos correlacionar efeitos clínicos dos medicamentos utilizados a efeitos celulares e mecanismos imunológicos de defesa desencadeados pelo organismo infectado e tratado ou não. Foi mostrado que a avaliação individual de uma única citocina ou de várias citocinas em um único dia de um dado processo não são suficientes para caracterizar os efeitos resultantes de uma determinada intervenção em um modelo experimental. Da mesma forma não podemos deixar de discutir como seria interessante no presente trabalho ter-se avaliado a cinética de secreção de TGF-beta (citocina de regulação fina e tardia do sistema imunológico (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008) ou de marcadores de inflamação como as prostaglandinas (ABBAS;

LICHTMAN; PILLAI, 2008). Ainda, seria extremamente esclarecedora a caracterização das diferentes células presentes nos infiltrados inflamatórios assim como a avaliação do parasitismo tecidual no sentido de entender o processo de produção de equilíbrio da relação parasito-hospedeiro quando se utiliza ou não diferentes medicamentos ultradiluídos como tratamento. Estas observações ficam como perspectivas de futuros trabalhos, de preferência utilizando os mesmos modelo experimental e protocolo clínico-terapêutico.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento homeopático com os medicamentos *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus* promoveram efeitos benéficos sobre diversos parâmetros avaliados na infecção pelo *T. cruzi* em ratos Wistar. Os grupos tratados possivelmente estabelecem equilíbrio da relação parasito-hospedeiro de forma diversa, com menores danos celulares e teciduais para o hospedeiro infectado.

O medicamento *Lycopodium clavatum* modifica o perfil de resposta imunológica dos animais, promovendo menor inflamação e protegendo o intestino, com preservação da população neuronal mientérica e hipertrofia de neurônios.

O medicamento *Phosphorus*, diminui inflamação em tecido cardíaco e protege neurônios de forma menos acentuada.

A avaliação de vários marcadores de resposta imunológica em diferentes momentos de um processo facilita o entendimento do controle deste processo, seja pelas vias naturais de manutenção de homeostasia do organismo (controle infectado) seja pela intervenção com medicamentos.

Medicamentos ultradiluídos proporcionam benefícios no tratamento da infecção experimental por *T. cruzi* reforçando a importância do aprofundamento destes estudos para proposição de novas abordagens terapêuticas para esta infecção e de doenças infecciosas de maneira geral.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; LITCHMAN, A. H. & PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

ADAD, S. J.; CANÇADO C. G.; ETCHEBEHERE, R. M.; TEIXEIRA, V. P.; GOMES, U. A.; CHAPEDEIRO, E.; LOPES, E R. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasicmegacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Arch.** 438: 254–258, 2001.

ALEIXO, D. L.; FERRAZ, F. N.; DE MELO, C. S.; GOMES, M. L.; TOLEDO, M. J.; KANESHIMA, E. M.; AMADO, C. A. B.; DE ARAÚJO, S. M. Changes of RAPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole. **Homeopathy**. 97: 59–64, 2008.

ALEIXO, D. L.; FERRAZ, F. N.; FERREIRA, E. C.; DE LANA, M.; GOMES, M. L.; FILHO, B. A. A.; DE ARAÚJO, S. M. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. **BMC Research Notes**. 5(352): 1-8, 2012.

ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. G.; MARTINS, G. A. et al. Interleukin -12 mediates resistanceto *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotas. **Infection and Immunity**. p. 1961-1967, 1996.

ALMEIDA, R.L.; CAMPOS, M. C. O.; HERRERA, L. V. B.; BONAMIN, L. V.; FONSECA, A. H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopath**. 97: 65-69, 2008.

ANDRADE, S. G., CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Med. Bahia**. 70: 32-42, 1970.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. Chagas' disease and neuron changes in Auerbach's plexus. (Experimental study in mice). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 8: 219-224, 1966.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano. **Rev. Patol. Trop**. 3: 65-121, 1974.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; Immunochemical study of experimental Chagas' disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 11: 44-47, 1969

ARANTES, R. M.; MARCHE, H. H.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi* - infected mice. **Am J Pathol**. 164 (4), 1361-8; 2004.

AYRES, M.; JR AYRES, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Bio Estat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. 5º edição. Belém-Pará-Brasil, 2007.

BARBOSA, A. J. A. Técnica histoquímica para gânglios nervosos intramurais e preparados espessos. **Rev Bras Pes Méd Biol**. 11: 95-97, 1978.

BONAMIN, L. V. Teorias Interpretativas sobre ultradiluições: ilustrações experimentais. **Cultura Homeopática**. 16: 6-17, 2006.

BONAMIN, L. V.; LAGACHE, A.; BASTIDE, M. Research on Ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: The Follow Up. In: Contributions and contradictions about high dilution research. Ed. Bonamin LV. **Signals and Images**. 3-28, 2008.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v.9: 233-238, 1962.

BRUSTOLIN, C. F.; LOPES, C. R.; MOREIRA, N. M. BRAGA, C. F.; ALEIXO, D. L.; DE ARAÚJO, S. M. Modelo de desnervação neuronal em ratos infectados experimentalmente com diferentes inóculos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Trabalho apresentado in: EPCC-ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, VIII. 2013, Editora CESUMAR.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida para o homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.1, p. 159-218, 1909.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: O camundongo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.28, p.11-23, 2007.

COSTA, G. C.; DA COSTA ROCHA, M.O.; MOREIRA, P. R.; MENEZES, C. A.; SILVA M. R.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. **J Infect Dis**. 199: 451-554, 2009.

COURA, J. R.; PEREIRA, J. B. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 106(.6): 641-645, 2011.

DEMARQUE, D.; JOUANNY, J.; POITEVIN, B.; SAINT-JEAN, Y. **Farmacologia e material médica homeopática**. 1º edição. São Paulo: Editora Organon, 2009.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 22: 147-156, 1989.

FALKOWSKI, G. J. S.; ALEIXO, D. L.; SANDRI, P. F.; ARAUJO, S. M. . Parameters for evaluation of clinical trial in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64: 1539-1546, 2012.



- Farmacopéia Homeopática Brasileira: Parte I - Métodos Gerais. São Paulo, 1997.
- FERRAZ, F. N.; SIMONI, G. K.; DO NASCIMENTO, A.; DE MELO, C. S.; ALEIXO, D. L.; GOMES, M. L.; SPACK, M.; DE ARAUJO, S. M. Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy**. 100: 237-243, 2011.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.81: 755-759, 1987.
- FURNES J.B. & Costa M. The enteric nervous system. New York: Churchill livinestone. 2006.
- GABRIEL, M.; FERREIRA, E. C.; AMADO, C. A. B.; ALEIXO, D. L.; MOREIRA, N. M.; PUPULIM, A. R. T.; DALALIO, M. M. O.; KANESHIMA, E. N.; ARAUJO, S. M. Níveis de TNF-alfa correlacionam-se com parâmetros parasitóticos e histopatológicos em camundongos infectados com cepa resistente ao BZ e tratados com o MC. In: XXVII reunião de pesquisa aplicada em doença de chagas e xv reunião de pesquisa aplicada em leishmanioses, 2011, Uberaba. Anais da XXVII reunião de pesquisa aplicada em doença de chagas e xv reunião de pesquisa aplicada em Leishmanioses, 2011.
- HAHNEMANN, S. Doenças crônicas. São Paulo: **GEHSP “Benoit Mure”**, p. 202, 1835.
- HONDA, P. A.; FERREIRA, I. C. P. ; CORTEZ, D. A. G.; AMADO, C. A. B. ; SILVEIRA, T. G. V. ; BREZAN, M. A.; LONARDONI, M. V. C.Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Phytomedicine*. v. 17, p. 333-338, 2010.
- KOBERLE, F. Chagas' disease and chagas' syndromes: The pathology of american trypanosomiasis. **Adv Parasitol**. 6:63-116, 1968.
- LANA, M. & CHIARI, E. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice-62 e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi*, isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 81(3), p. 247-253, 1986.
- LANA, M. & TAFURE, W. L. *Trypanosoma cruzi* doença de Chagas In: NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M. & VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 12<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Atheneu. cap.11, pp 89-114, 2011.
- LAZARIN-BIDÓIA D.; DESOTI, V. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; SILVA, S. O. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoide-5: Confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radic.Biol.Med**. 60: 17–28, 2013.

MAIFRINO, L. B. M.; AMARAL, S. O. N.; WATANABE, I.; LIBERTI, E. A. and 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. **Exp Parasitology**. 111: 224-229, 2005

MAIFRINO, L. B. M.; LIBERTI, E. A.; WATANABE, I.; SOUZA, R. R. Morphometry and acetylcholinesterase activity colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Trop Med Hyg**. 60: 721-725, 1999.

MASSINI, P. F. (2013) *Rattus norvegicus* infectados com *Trypanosoma cruzi*: efeitos clínicos do tratamento com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* ultrailuídos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

MENDES, M. F. A.; LOPES, W. S.; NOGUEIRA, G. A.; WILSON, A.; ARAÚJO, S. M.; GOMES, M. L. Exercício físico aeróbico em mulheres com doença de Chagas. **Fisioter Mov**. 24(4): 591-601, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian consensus on Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.38, p.7-29, 2005.

MOREIRA, N. M.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A.; TOLEDO, M. J. O.; GOMES, M. L. & DE ARAÚJO S. M. Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: an experimental model. **An. Acad. Bras. Ciênc**. 83: 545-555, 2011.

MOREIRA, N. M.; SANTOS, F. N.; TOLEDO, M. J. O.; MORAES, S. M. F.; ARAUJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G.; DE ARAUJO, S. M. Moderate physical exercise reduces parasitemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int J Exp Path**. 94: 426-435, 2013.

MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; REED, S. G.; COLON, P. J. Granulocyte/macrophage colony stimulating factor. A potent activation signal for mature macrophages and monocytes. **Int Arch Allergy Appl Immunol**. 88(1-2):40-5, 1989.

OLIVEIRA, G. M.; MASUDA, M. O.; ROCHA, N. N.; SCHOR, N.; HOOPER, C. S.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; HENRIQUES, P. A. Absence of Fas-L aggravates renal injury in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.104, p.1063-1071, 2009.

PEDRA, R. A.; OLIVEIRA, R. A.; BEYRODT, C. G. P.; FRANÇA, H. H. Desafio em saúde pública: Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. **Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba**. 13(2): 5-9, 2011.

PORTAL DA SAÚDE. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454). Acessado em: 15-01-2013.

- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas diseases. **Lancet Infect Dis.** 1. 92-100, 2001.
- PUPULIN, A. R. T.; DE ARAÚJO, S. M.; TOLEDO, M. J. O.; GOMES, M. L.; TAKEJIMA, E.; CUMAN, R. K. N.; AMADO, C. A. B. Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol.** 126: 435–440, 2010.
- QUEIROZ, A. O.; XAVIER, S. C. C.; FARIA, K. G.; BERNARDO, R. R.; LEITÃO T. C. A. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: Um Estudo in vivo. **Cult Homeopat**, v. 17: 9-13, 2006.
- RASSI JR, A.; RASSI A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am.**26(2): 275-91, 2012.
- REED, S. G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In *Molecular approaches to Parasitology*. New York: **Wiley-Liss Inc.** p. 443-445, 1995.
- SANDRI, P. F.; FALKOWSKI, G. J. S.; JÚNIOR, A. D. N.; SPACK, M.; MOREIRA, N. M.; TOLEDO, M. J. O.; FILHO, B. A.; GABRIEL, M.; DE ARAÚJO, S. M. Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17x controlled histopathological alterations in mice infected by this protozoon. **Int J High Dilution Res.** 10(36): 110-114, 2011.
- SCHEBELESKI-SOARES C.; OCCHI, R. C.; DE MORAES, F.; MARTA, S. D.; DE OLIVEIRA, M. & ALMEIDA, F. N. Pre-infection aerobic treadmill training improves resistance against. **Appl. Physiol. Nut. Metab.** 34: 659-665, 2009.
- SCHMUNIS G.A. & YADON Z.E. Chagas' disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta. Trop.** 115, 14-21, 2010
- SCORZA, C. & SCORZA, J. V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after inoculation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 14: 171-177, 1972.
- SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Annu Rev Immunol.** 12: 635-73, 1994.
- SHER, A.; GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E. J.; et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunol Rev.** 127:183-204, 1992.
- SILVA, L. H. P. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folha Clínica Biol. São Paulo.** V. 20, p. 191 – 201, 1953.
- SILVEIRA, A. B. M.; D'AVILA, REIS D.; OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; POOLE, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.

Nurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Dig Dis Sci.** 52: 2877-2883, 2007.

SOARES, R. C. O.; SOARES, C. S.; FRANZÓI-DE-MORAES, S. M.; BATISTA, M. R.; KWABARA, H. N.; SOUSA, A. M. R.; MOREIRA, N. M.; GOMES, M. L.; DE ARAÚJO, S. M. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. **Rev Bras Med Esporte.** 18: 51-57, 2012.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. **Rev Med,** v. 85 (2): 30-43, 2006.

UYEMURA, S. A.; ALBUQUERQUE, S.; CURTI, C. Energetics of Heart Mitochondria during Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection in Rats. **Inst. J. Biochem. Cell Biol.** 27 (11): 1183-9, 1995.

VEIGA-SANTOS, P.; DESOTI, V. C.; MIRANDA, N.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.*125(3): 349–356, 2013.

VELOSO, V. M.; ROMANHA, A. J.; LANA, M.; MURTA, S. M. F.; CARNEIRO, C. M.; ALVES, C. F.; BORGES, E. C.; TAFURI, W. L.; MACHADO-COELHO, G. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. **Parasitol. Res.** 96: 382-389, 2005.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. **Molecules.**17(11), 12771-12791, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 25-02-2013.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Curva média de parasitemia em ratos Wistar, machos, 45 dias de idade, infectados com  $5,0 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Comparação dois a dois entre os grupos tratados com *Lycopodium* e *Phosphorus* (Ly e Phos) e controle infectado (CI). ( $p > 0,05$ ).....38
- Figura 2.** Foto representativa de neurônios do cólon distal de ratos Wistar infectados pela cepa Y de *T. cruzi* aos 322° dpi para os grupos: CI – Controle Infectado (A), Ly – Tratado com *Lycopodium clavatum*(B) e Phos - Tratado com *Phosphorus* (C).....40
- Figura 3.** Focos inflamatórios em coração e intestino de ratos wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Grupos: Coração-CI (A) e coração-Phos (B), aumento de 40x. Intestino-CI (C) e intestino Ly-(D), aumento de 20x.....44
- Figura 4.** Comparação entre os grupos Controle Infectado (CI) e *Lycopodium clavatum* (Ly). Média do número de neurônios totais do cólon distal de ratos Wistar infectados com *T. cruzi* aos 322 dpi, correlacionados à média das concentrações (pg/mL) de citocinas. TNI (Animais tratados e não infectados), 5° dia de infecção, 10° dia de infecção, 24° dia de infecção e 322° dias de infecção. Diferentes letras nos grupos, Controle infectado (CI) e Tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) em um mesmo dia de infecção representam diferença significativa a 5% usando teste T de Student. Foram apresentadas as comparações significativas para as diferentes citocinas em cada tempo avaliado.....45
- Figura 5.** Comparação entre os grupos Controle Infectado (CI) e *Phosphorus* (Phos). Média do número de neurônios totais do cólon distal de ratos Wistar infectados com *T. cruzi* aos 322 dpi, correlacionados à média das concentrações (pg/mL) de citocinas. TNI (Animais tratados e não infectados), 5° dia de infecção, 10° dia de infecção, 24° dia de infecção e 322° dias de infecção. Diferentes letras nos grupos, Controle infectado (CI) e Tratados com *Phosphorus* (Phos) em uma mesmo dia de infecção representam diferença significativa a 5% usando teste T de Student. Foram apresentadas as comparações significativas para as diferentes citocinas em cada tempo avaliado.....46

**Tabela 1.** Médias e desvio padrão de parâmetros parasitológicos avaliados em ratos, Wistar, machos, 45 dias de idade. Controle Infectado (CI), Tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) e *Phosphorus* (Phos).....38

**Tabela 2.** Médias ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (sd) da densidade de neurônios mientéricos do cólon de ratos Wistar, machos submetidos à infecção com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 125 e 322 dias após a infecção.....39

**Tabela 3.** Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (sd) da área do corpo celular, citoplasma e núcleo, de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos Wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 125 e 322 dias após a infecção.....41

**Tabela 4.** Média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (sd) da área do corpo celular, citoplasma e núcleo, de neurônios mientéricos do cólon distal de ratos Wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 125 e 322 dias após a infecção.....41

**Tabela 5.** Médias ( $\bar{x}$ ) e desvios padrão (SD) do número de focos inflamatórios presentes em cortes de tecido de ratos Wistar infectados com  $5 \times 10^6$  formas trispomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Controle Infectado (CI), tratados com *Lycopodium clavatum* (Ly) ou *Phosphorus* (Phos). Avaliação realizada aos 5, 10 e 24 dias após a infecção (dpi).....43

### CAPÍTULO III

#### CONCLUSÕES

Este estudo sobre a utilização de medicamentos homeopáticos constitucionais em modelo murino na infecção por *Trypanosoma cruzi* mostrou que:

- 1) O tratamento com medicamentos homeopáticos constitucionais para *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* promovem efeitos sobre diversos parâmetros na infecção pelo *T. cruzi*.
- 2) O medicamento *Lycopodium clavatum* promove maior benefícios a nível intestinal em ratos infectados por cepa altamente virulenta de *T. cruzi*.
- 3) O medicamento *Phosphorus* promove maior benefícios a nível cardiorrespiratório em ratos infectados por cepa altamente virulenta de *T. cruzi*.
- 4) Medicamentos ultradiluídos proporcionam benefícios no tratamento de doenças parasitárias reforçando a importância de estudos experimentais utilizando o modelo rato e outros esquemas de tratamento.
- 5) Pesquisas que utilizam medicamento homeopático de forma controlada, cega e randomizada por sorteio em modelos animais, possibilitam segurança e excelência nos resultados obtidos.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

1. Realizar análise de novos parâmetros em equipamentos que possibilitem o fornecimento de informações a respeito da atuação destes medicamentos.
2. Investigar a presença e atividade de células inflamatórias (macrófagos) no sangue e nos tecidos, associado a isto dosagem de óxido nítrico tecidual.
3. Alterar o esquema terapêutico, com uma associação dos dois medicamentos (*Lycopodium clavatum e Phosphorus*).
4. Avaliar através de técnicas histopatológicas a presença de parasitos teciduais.