

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

PAULA FERNANDA MASSINI

Rattus norvegicus infectados com *Trypanosoma cruzi*: efeitos clínicos do tratamento com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* ultradiluídos.

Maringá
2013

PAULA FERNANDA MASSINI

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, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Silvana Marques de Araújo

Maringá
2013

Ficha catalográfica- biblioteca UEM
*Elaborado pela Biblioteca Central

Essa ficha deve ser impressa no verso da folha de rosto

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA FERNANDA MASSINI

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, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Denise Lessa Aleixo
Universidade Estadual de Maringá

Prof. PHd. Ricardo Souza Vasconcellos
Universidade Estadual de Maringá

Prof^ª. Dr^ª. Carla Holandino Quaresma
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Cidéli de Paula Coelho
Universidade de Santo Amaro

Aprovada em: 26 de março de 2013.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amores:
Vinícius, Maria Luiza a caminho,
Natalino, Inez e Rafael.
Nunca soltem de minhas mãos!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e oportunidades de aprendizado e crescimento espiritual.

Aos meus pais, Inez Paulin Sabaini Massini e Natalino Massini pelo amor incondicional, trabalho e dedicação aos filhos.

Ao meu esposo Vinícius, pelo companheirismo, amor e compreensão.

À Professora Dra. Ana Lúcia Falavigna Guilherme pela oportunidade, confiança, força e apoio incondicional.

À Professora Dra. Silvana Marques de Araújo pela orientação, dedicação e dom do ensino da ciência, essenciais ao desenvolvimento desta pesquisa, a quem tenho grande admiração, carinho e respeito.

À Professora Dra. Denise Lessa Aleixo pelo apoio incondicional.

Ao grupo de estudos em homeopatia, pela contribuição indispensável na realização deste trabalho.

À duas grandes parceiras Neide e Carol, meu agradecimento especial.

Ao Professor Msc. Rogério Tiyo por me auxiliar e apoiar na realização de sonhos.

À aluna de iniciação científica Katiucha, pela dedicação e trabalho.

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

Às professoras Carla Holandino e Cidéli Coelho que, como membros da banca de qualificação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

Aos alunos da medicina veterinária, que me impulsionam na busca pelo aperfeiçoamento da docência.

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

EPÍGRAFE

*“O que eu faço é uma gota
no meio de um oceano, mas sem
ela o oceano será menor.”*

Madre Tereza de Calcutá

Rattus norvegicus infectados com *Trypanosoma cruzi*: efeitos clínicos do tratamento com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* ultrailuídos.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma enfermidade tipicamente tropical e amplamente dispersa no continente americano, representando um desafio para a saúde pública na América Latina. No Brasil, apenas o benznidazol está disponível para o tratamento da afecção e este, além de apresentar eficácia limitada na fase crônica, possui ainda alta toxicidade e efeitos adversos importantes que diminuem a adesão do paciente ao tratamento. Neste sentido, a busca por novas abordagens terapêuticas mais efetivas e menos tóxicas tem impulsionado o estudo de medicamentos ultradiluídos, oferecendo esperança e benefício para pacientes chagásicos. Além disso, pesquisas que utilizem medicamentos homeopáticos com observações e experimentações controladas associadas a modelos experimentais mais resistentes possibilitam a obtenção de informações clínicas que oferecem melhores condições de estudo. Este ensaio é composto de um artigo no qual abordamos os resultados de experimentos com medicamentos homeopáticos, *Lycopodium clavatum* (LY) e *Phosphorus* (PH), substâncias naturais que apresentam efeitos biológicos importantes no tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em ratos Wistar. Os parâmetros clínicos avaliados incluíram peso, temperatura, consumo de água e ração, quantidade de excretas, frequência cardíaca e respiratória, diâmetro e comprimento intestinal, aspectos da pelagem e das fezes. Os resultados mostraram que a utilização de quimioterápicos obtidos de produtos naturais, *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* 13DH, trouxeram benefícios aos animais tratados. A utilização de *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* diluídos na proporção de 1:1x10²⁶, apresentaram efeitos benéficos diferentes. Dez e cinco parâmetros de 14 analisados mostraram efeitos positivos para LY e PH, respectivamente. Os parâmetros consumo de água e ração, quantidade de excretas, diarreia, queda de pelos, frequência

cardíaca e respiratória, e comprimento intestinal apresentaram diferença significativa em relação ao controle infectado o que reforça a importância do aprofundamento de estudos com *T. cruzi* versus medicamentos ultradiluídos.

Palavras-chave: Doença de chagas, medicamento homeopático, ratos Wistar, *Trypanosoma cruzi*.

Rattus norvegicus infected with *Trypanosoma cruzi*: clinical effects of treatment with *Lycopodium clavatum* and *Phosphorus* hight diluted.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a disease typically tropical and widely dispersed in the Americas, representing a challenge to public health in Latin America. In Brazil, only benznidazole is available for the treatment of this condition and, besides having limited efficacy in chronic phase, also has high toxicity and significant adverse effects that reduce patient compliance to treatment. In this sense, the search for new therapeutic approaches more effective and less toxic has driven the study drug highly diluted, offering hope and benefit to patients with Chagas disease. Furthermore, studies using homeopathic medicines with controlled experiments and observations associated with experimental models toughest possible to obtain clinical information that offer best study conditions. This test consists of a paper in which we discuss the results of experiments with homeopathic medicines, *Lycopodium clavatum* (LY) and *Phosphorus* (PH), natural substances that have important biological effects in the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in wistar mice. Clinical parameters included weight, temperature, water consumption and diet, amount of excreta, heart rate and breathing, intestinal length and intestinal stenosis, aspects of fur and feces. The results showed that the use of chemotherapeutics derived from natural products, *Lycopodium clavatum* 13DH and *Phosphorus*, brought benefits to treated animals. The use of *Lycopodium clavatum* and *Phosphorus* and diluted 1:1x10²⁶ showed beneficial effects different. Ten and five of 14 parameters analyzed showed positive effects for LY and PH, respectively. The parameters of water and feed consumption, amount of feces, diarrhea, drop by, heart rate and respiratory, intestinal length and showed a significant difference compared to control infected which reinforces the importance of further studies with T. cruzi versus drugs hight diluted.

Keywords: Chagas disease, homeopathic medicine, *Trypanosoma cruzi*, Wistar rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Curvas da evolução do ganho de peso e temperatura em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* nos diferentes grupos experimentais ao longo dos dias de infecção.....56
- Figura 2. Curvas da evolução do consumo de água e ração em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* nos diferentes grupos experimentais ao longo dos dias de infecção.....56
- Figura 3. Fotos dos parâmetros diarreia, piloereção e alopecia difusa em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* durante período experimental.....57
- Figura 4. Curvas da evolução da frequência cardíaca (bpm) e respiratória (mpm) em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* ao longo dos dias de infecção.....57
- Figura 5. Medidas do comprimento intestinal total, cólon proximal e distal, em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi*.....58
- Figura 6. Enema opaco em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* aos 315 dias de infecção nos diferentes grupos experimentais.....58
- Figura 7. Foto do comprimento intestinal total em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y aos 315 dias de infecção para os diferentes grupos experimentais.....59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Consumo de água avaliado em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.....60
- Tabela 2. Consumo de ração avaliado em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.....60
- Tabela 3. Quantidade de excretas avaliada em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.....61
- Tabela 4. Avaliação do comprimento intestinal- Comprimento total, comprimento do cólon proximal, comprimento do cólon distal, em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y aos 315 dias de infecção.....61
- Tabela 5. Avaliação do comprimento intestinal- Comprimento total, comprimento do cólon proximal, comprimento do cólon distal, em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y aos 315 dias de infecção.....62
- Tabela 6. Parâmetros clínicos avaliados em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.....62
- Tabela 7. Avaliação do comprimento intestinal em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.....63

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e do artigo a ser publicado (Capítulo II): *Veterinary Research* disponível em:

<<http://www.veterinaryresearch.org/>>

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	15
1.1. <i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i>	15
1.1.1 Infecção experimental murina com a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	15
1.2. DOENÇA DE CHAGAS.....	16
1.2.1. Epidemiologia atual.....	16
1.2.2. Formas clínicas.....	18
1.3. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	19
1.4. HOMEOPATIA.....	20
1.4.1 Utilização de medicamento homeopático como perspectiva para o tratamento da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	21
1.5. <i>Rattus norvegicus</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	23
1.6. JUSTIFICATIVA.....	25
1.7. OBJETIVOS.....	25
1.8. REFERÊNCIAS.....	26
2. CAPÍTULO II.....	35
2.1. Artigo: <i>Rattus norvegicus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> : efeitos clínicos do tratamento com <i>Lycopodium clavatum</i> e <i>Phosphorus</i> ultradiluídos.....	35
3. CAPÍTULO III.....	65
3.1. CONCLUSÕES.....	65
4. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66

CAPÍTULO I:

1.1. *Trypanosoma cruzi*

Muitas doenças parasitárias de importância médica e veterinária são desencadeadas por diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*, principalmente na África, Ásia, América central e América do Sul¹.

O *Trypanosoma cruzi*, CHAGAS 1909², é o agente causador da doença de Chagas. É um protozoário flagelado da família *Trypanosomatidae* que parasita mamíferos e tem como hospedeiros invertebrados insetos de inúmeras espécies de hemípteros hematófagos, artrópodes pertencentes à classe Insecta, ordem Hemiptera, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* e gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*³. Mais de 100 espécies de triatomíneos são vetores potenciais de *T. cruzi*, das quais 52 já foram descritas no Brasil^{4,5,6}.

No Brasil, uma das formas de transmissão da doença a humanos e a outros mamíferos é por intermédio de seus hospedeiros invertebrados, vetores conhecidos como barbeiros, chupança, fincão, bicudo, chupão³.

Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado e infectado pelo *T. cruzi*, o triatomíneo ingere os tripomastigotas que posteriormente transformam-se em epimastigotas e multiplicam-se no intestino médio do artrópode. Após migrarem para o intestino posterior do inseto, diferenciam-se nas formas infectantes do parasito, tripomastigotas metacíclicos, que podem invadir uma variedade de tipos celulares³. A transmissão é resultado da contaminação de conjuntivas, mucosas ou lesões cutâneas por fezes e/ou urina dos vetores, produzidas durante a alimentação com sangue em um mamífero^{3,7,8}. Outras formas de transmissão descritas incluem a transfusão sanguínea, transmissão pelas vias oral e transplacentárias, transplante de órgãos e ainda acidentalmente em laboratórios⁷.

1.1.1. Infecção experimental murina com a cepa Y de *T. cruzi*.

A cepa Y do *T. cruzi*, isolada por Silva & Nussenzweig^{9,10}, é considerada uma cepa de referência por apresentar características bem definidas como alta virulência e patogenicidade, resistência parcial a quimioterápicos¹¹, pico máximo de parasitos até o 12º dia de infecção e taxa de mortalidade em camundongos de 100% quando não tratada^{12,13}. Esta cepa apresenta ampla utilização em modelo murino, constituindo-se em um ótimo modelo experimental para avaliação de intervenções medicamentosas o que a tornaram uma cepa de referência, sendo provavelmente uma das mais citadas e estudadas na literatura sobre *T. cruzi*¹⁴.

A manutenção da cepa pode ser realizada em laboratório por meio de sucessivas passagens em camundongos que desenvolvem a fase aguda da infecção mantendo suas

características sem alteração de parâmetros parasitológicos, mesmo após longos períodos de tempo^{15,16}. Devido à suscetibilidade a infecção e a fácil manutenção da cepa em laboratório, o modelo murino apresenta uma quantidade de dados acumulados na literatura que proporcionam segurança e confiabilidade para a pesquisa de protocolos de tratamento, para melhora da abordagem terapêutica¹⁷.

Os roedores têm sido os animais mais utilizados pelos centros de pesquisa por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhantes à dos humanos o que permite o estudo de uma grande variedade de parâmetros que refletem sinais e sintomas que são observados também na infecção humana^{18,19}. Alguns protocolos de pesquisa com parâmetros clínicos já estabelecidos proporcionam uma análise clínica mais minuciosa auxiliando na avaliação de intervenções medicamentosas na infecção experimental pelo *T. cruzi*²⁰.

Em ratos a infecção manifesta-se de maneira menos letal com maior sobrevivência dos animais podendo oferecer melhores condições de estudo de infecções crônicas²¹. Também pelo maior porte dos ratos em relação aos camundongos é possível fazer avaliações clínicas mais minuciosas²¹.

1.2. DOENÇA DE CHAGAS:

1.2.1. Epidemiologia atual.

A doença de Chagas, tipicamente tropical é amplamente dispersa no continente americano e representa um desafio para a saúde pública na América Latina²².

A Organização Mundial da Saúde considera a doença de Chagas como endêmica em 18 países e estima que cerca de 13 milhões de indivíduos nas Américas Central e do Sul estejam infectados. Anualmente registra-se 200 mil novos casos mundiais e 25 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção na América Central e do Sul. As regiões endêmicas destacadas na América Latina são países como Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela^{21,22}.

Considerando ainda a crescente migração de populações, cresce o risco de transmissão por transfusão de sangue e transplante de órgãos em diversos outros países fora da América Latina¹. O aumento na transmissão da doença envolve novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos, além dos já conhecidos relacionados à saúde pública o que torna a doença de Chagas mais do que uma simples zoonose, um problema de saúde global²³.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, entre os anos de 2005 e 2010 foram notificados 703 casos da forma aguda da doença, com predominância no norte do país, dos quais 93% dos casos foram notificados na Amazônia Legal²⁴. Esta região apresenta uma série

de determinantes biológicos e sociais que facilitam a transmissão que levam à forma aguda da doença. Entre eles a diversidade de reservatórios silvestres de *T. cruzi* que resultam em intenso ciclo de transmissão silvestre e atividades laborais regionais como o extrativismo de fibra de piaçava e consumo de alimentos *in natura* contaminados e com altas cargas parasitárias²⁵.

A princípio, a doença era considerada como uma enzootia de animais silvestres e posteriormente sofreu adaptações nos triatomíneos, vetores presentes nos ciclos da agricultura e pecuária²⁶. Apesar de sua incidência ter diminuído nas últimas décadas devido às medidas profiláticas adotadas e ao processo de urbanização da população, a doença de Chagas ainda é prevalente no território brasileiro²⁷.

A organização Pan-Americana da Saúde no ano de 2006 certificou o Brasil como livre da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, porém a certificação representa a eliminação da transmissão do parasito, especificamente pelo *T. infestans*, e não a interrupção definitiva da transmissão, alertando para necessidade de ações de manutenção do controle de vigilância¹⁰.

Há mais de 100 anos de sua descoberta, à medida que algumas formas de transmissão se tornaram menos comuns, como a vetorial e a transfusional, outras emergiram e se tornaram mais aparentes. Atualmente a transmissão vetorial extradomiciliar, ou seja, aquela em que os mecanismos de transmissão envolvem a participação do homem e que poderia ser considerada acidental tornou-se hoje, a forma de transmissão mais importante e prevalente no Brasil^{25,28}.

Apesar da doença de Chagas ter apresentado progresso em termos de conceitos e aplicações, a transformação social que envolve a conscientização da população, com a prática de hábitos mais higiênicos e o tratamento da doença, ainda necessitam de avanços. O grande contingente de casos de infecção chagásica crônica acumulado ao longo dos anos caracterizam uma situação epidemiológica com novos desafios de vigilância, controle, diagnóstico e tratamento da doença²⁵.

1.2.2. Formas clínicas.

A doença de Chagas apresenta duas formas clínicas distintas que são definidas como a fase aguda (aparente ou inaparente) e a fase crônica (indeterminada)²⁹. A fase aguda corresponde ao período inicial da infecção pelo *T. cruzi* com parasitemia detectável por exames parasitológicos diretos do sangue. Esta fase possui curta duração, no homem de 4 a 12 semanas, alto parasitismo tecidual e parasitemia patente que tende a se reduzir na fase crônica da doença devido à resposta imune do hospedeiro frente ao parasita^{3,13}.

Na maioria dos pacientes, a fase aguda é assintomática ou oligossintomática. Quando aparente, os pacientes apresentam sintomas frequentes que incluem febre, sonolência, mialgia,

diarréia, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), edema e taquicardia^{4,12}. Secundariamente à infecção pelo parasito na fase aguda da doença ocorrem complicações clínicas que podem ocasionar o óbito do paciente³⁰.

A redução nos níveis de parasitemia ocorre após o estabelecimento da resposta imune específica contra antígenos de *T. cruzi*. A remissão completa de sinais e sintomas clínicos num período de 60 a 90 dias associada à redução nos níveis de IgM, assim como aumento nos índices de IgG, definem a passagem da fase aguda para a fase crônica da doença¹. A ausência da sintomatologia pode tornar a infecção despercebida na maioria dos pacientes explicando porque na maioria dos casos agudos o prognóstico é definido como benigno, com remissão completa de sinais e sintomas num período de 60 a 90 dias, com ou sem intervenção medicamentosa^{4,12}.

Na fase crônica da doença algumas alterações clínicas são observadas, entre elas as cardíacas (forma cardíaca), digestivas (forma digestiva) ou as duas associadas (forma mista). Pode ainda não ser observado sintomas (forma indeterminada), sem alterações tanto no eletrocardiograma quanto nas radiografias de tórax, permanecendo o paciente positivo anos desta forma^{31,32,40}.

A manifestação mais séria e frequente da doença de Chagas crônica é a cardiopatia chagásica, principal causa de morte em pacientes de 30 a 50 anos na América Latina. A cardiopatia é caracterizada por processo inflamatório com miocardite fibrosante crônica que ocorre anos ou décadas após a infecção inicial e varia muito de acordo com a extensão e a localização das lesões cardíacas^{32, 33,34}.

Os pacientes com a doença de Chagas crônica desenvolvem distúrbios na motilidade do trato digestório, esôfago e cólon, com diminuição do trânsito e dificuldade de esvaziamento o que resulta no aumento do calibre do órgão, caracterizado como megaesôfago e megacólon. O envolvimento do sistema nervoso autônomo precede as alterações observadas nesses órgãos^{35,36,37}.

As variações clínicas dependem de fatores inerentes ao parasito (cepa, virulência, tropismo) e a individualidades do hospedeiro (idade, perfil da resposta imune)¹.

1.3. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Embora alguns avanços no controle de vetores nos países da América Latina tenham reduzido a incidência da doença de Chagas, o tratamento dos casos crônicos e a grande quantidade de casos na fase aguda da doença ainda são problemas e constituem um desafio para a saúde pública³⁸.

O protocolo terapêutico data da década de 60, quando pesquisadores utilizaram nitrofuranos e descreveram sua efetividade na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*³⁹. Após várias décadas, existem disponíveis para o tratamento clínico com efeito parasiticida apenas duas drogas: o nifurtimox e o benznidazol^{40,41,42,43}.

No Brasil, apenas o benznidazol está disponível com aplicabilidade na fase aguda e com eficácia observada na maioria dos pacientes, porém na fase crônica seu efeito é limitado. Este medicamento possui diversas limitações, como necessidade de administração por longos períodos, alta toxicidade e efeitos adversos importantes que impedem a continuidade do tratamento e resulta em baixa adesão pelos pacientes⁴⁴. As reações adversas mais frequentes são a dermatite (20-25% dos pacientes tratados) e alterações digestivas como anorexia e perda de peso (5% dos pacientes tratados) e podem ser observadas em até 50% dos pacientes tratados, com aproximadamente 18% dos casos culminando em descontinuidade do tratamento, devido aos desconfortos observados^{45,46,47,48,49}.

O Ministério da Saúde, através do Consenso Brasileiro em Doença de Chagas “Tratamento Etiológico da Doença de Chagas” recomenda a utilização do benznidazol como droga de escolha nas fases aguda e crônica recente e na prevenção da infecção congênita pelo *T. cruzi*, independente do mecanismo de transmissão^{50,51}.

O tratamento durante a fase aguda da doença consegue cura entre 30 a 80% dos casos relatados, incluindo os congênitos, levando à regressão dos sintomas e obtenção de razoáveis taxas de cura parasitológica. Em geral, quanto mais precocemente feitos o diagnóstico e o tratamento da infecção chagásica, melhores são os resultados de cura. Conforme dados apresentados por Andrade et al. (1996)⁵², a administração do benznidazol é recomendada como medida de saúde pública para crianças soropositivas.

Na fase crônica da doença, a eficácia do medicamento nas indicações clínicas para pacientes com cardiopatia chagásica têm sido controverso. Alguns resultados mostram-se positivos com interrupção e reversão do quadro clínico destes pacientes^{53,54,55,56}. Porém, outros resultados foram obtidos em estudos sobre a evolução clínica da doença crônica, mostrando que pacientes tratados apresentaram parasitemia persistente e alterações progressivas de eletrocardiograma, assim como observado nos pacientes que não receberam tratamento algum^{53,54}. Nesta fase, a eficácia terapêutica é restrita com cura parasitológica de que varia de 0 a 20%^{47,48}.

A quimioterapia para o tratamento da doença de Chagas não têm se mostrado satisfatória e a busca por uma terapia mais eficiente ou alternativas de tratamento que

valorizem os efeitos antiparasitários e reduzam os efeitos indesejáveis do benznidazol tem sido perseguida por muitos autores, constituindo esperança no manejo de pacientes com a infecção pelo *T. cruzi*^{48,50,60,61}.

Conhecimentos mais recentes sobre a biologia e a genética do parasito têm sido abordados na literatura, permitindo o aparecimento de novas propostas terapêuticas como a identificação de vacinas, imunoterapias com vacinas de DNA e transplantes de células tronco no reparo de músculo cardíaco acometido pela doença^{62,63}.

De acordo com FERRAZ (2005), alguns antifúngicos de última geração são capazes de inibir enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol. Nesta busca, vários quimioterápicos têm sido obtidos, alguns de produtos naturais, outros de princípios químicos com bons resultados em estudos experimentais, porém as informações são ainda preliminares. Como ainda não há a disponibilidade de um medicamento eficaz e pontual para a doença de Chagas, a busca por novas terapias que possam reduzir os efeitos colaterais e tóxicos do benznidazol oferecem ao paciente chagásico esperança por uma melhor qualidade de vida^{64,65,66}.

1.4. HOMEOPATIA

A homeopatia é uma modalidade terapêutica que possui como idealizador o médico alemão Samuel Hahnemann (1755-1843) cujo princípio central baseia-se na “Lei de Similitude” em que substâncias são submetidas a diluições seriadas e sucções ritmadas (dinamização). Este processo despertaria propriedades medicinais latentes em substâncias em seu estado bruto, conservando uma condição curativa contra doenças com sintomas semelhantes a aqueles produzidos pela substância quando administrada em indivíduos sãos, fenômeno definido como patogenesia^{80,81}.

No Brasil, a medicina homeopática foi reconhecida como uma especialidade pela Associação Médica brasileira em 1979, pelo Conselho Federal de Medicina em 1980 e atualmente recebe estímulo através da instituição de uma “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde”^{68,69,82,83}.

Os medicamentos que seguem os princípios de semelhança e reproduzem o conjunto de características físicas e mentais do indivíduo são chamados de medicamentos constitucionais. A abordagem terapêutica adequada desta terapia deve fortalecer a ação defensiva do indivíduo promovendo regulação do sistema imunológico e consequente aumento na eficácia do processo de cura do organismo⁸⁴.

O desenvolvimento de pesquisas com a utilização de medicamentos ultradiluídos em modelos experimentais bem definidos e mais resistentes, 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 esperança para o tratamento de pacientes crônicos da doença de Chagas.

1.4.1. Utilização de medicamento homeopático como perspectiva para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*.

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 a utilização da homeopatia. Estas terapias podem constituir uma alternativa eficiente e segura no tratamento da doença e neste sentido, representam uma perspectiva no tratamento não só da doença de Chagas, mas também de diversas outras doenças.

A homeopatia é utilizada a mais de 200 anos e em razão dos bons resultados obtidos com estes medicamentos a sua utilização tem aumentado a cada ano, em todo o mundo⁸¹. O interesse da população por "práticas não convencionais em saúde" fez com que o Ministério da Saúde do Brasil aprovasse a "Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde com o intuito de incentivar o desenvolvimento de projetos que visem incrementar a disponibilidade destas práticas, incluindo a homeopatia junto aos sistemas públicos de saúde, de forma coadjuvante aos tratamentos clássicos^{68,69,70}. Essa iniciativa reflete atitude da Organização Mundial da Saúde⁷¹.

De acordo com a Farmacopeia homeopática, vários sinônimos têm sido utilizados na atualidade para definição de medicamentos que são produzidos através de diluições e triturações seguidas de sucucões sucessivas: medicamentos homeopáticos, ultradiluídos, ultra moleculares ou UHD (*ultra high dilution*) e sistemas dinamizados, uma vez que são preparados de forma a apresentarem quantidades não ponderais de solutos, ultrapassando a concentração de $6 \times 10^{-24} \text{ M}$ ⁷².

A utilização de medicamentos ultradiluídos tem sido muito discutida, e seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido^{73,74}. Porém, estudos experimentais mostram que este tipo de terapia é eficaz através dos efeitos biológicos observados em animais tratados e criteriosamente avaliados^{75,72}.

Aleixo *et al.* (2012) avaliou o efeito de diferentes protocolos de tratamento com bioterápico *T. cruzi* 17 DH (BIOTTc17dH) na evolução clínica / parasitológica de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Os autores observaram que o grupo BIOT4DI tratado por período prolongado com o medicamento oferecido diluído em água e

4 dias após a infecção apresentou a melhor evolução clínica e parasitológica, com menor parasitemia e uma tendência para menor mortalidade e um longo período de sobrevivência⁷⁶.

Ferraz et al. (2011) avaliou os efeitos de diferentes formas de administração dos bioterápicos *T. cruzi* 7DH nos parâmetros parasitológicos e nas taxas de sobrevivência em camundongos infectados experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos indicam que a administração do bioterápico 7DH antes da infecção (7 ou 30 dias) produziram diferentes efeitos como redução na parasitemia e aumento do período de sobrevivência, sugerindo modulação do sistema imunitário do hospedeiro⁷⁷.

Sandri et al. (2011) avaliaram a quantificação de células do baço e fígado apoptóticas em camundongos tratados com bioterápicos 17DH de *Trypanosoma cruzi* através da detecção in situ de DNA fragmentado. Os autores concluíram que a apoptose estava aumentada nos animais infectados tratados com bioterápico 17DH de *T. cruzi*⁷⁸.

Almeida et al. (2008) avaliou a ação do bioterápico *T. cruzi* 12DH e phosphorus 12DH nos parâmetros parasitológicos e nas taxas de sobrevivência em camundongos experimentalmente infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos sugeriram que o pré tratamento com o bioterápico modulou a resposta imune do hospedeiro sobretudo durante a fase aguda da infecção¹.

Queiroz et al. (2006) testou a atividade biológica acompanhada de parasitemia e cinética da resposta imune humoral em camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* e tratados com o bioterápico *T. cruzi* 30DH. Os autores obtiveram como resultado uma taxa de 50% de sobrevida no grupo de animais que recebeu o tratamento prévio com o bioterápico, sugerindo que a administração nos animais testados estimulou uma resposta imune humoral, que se traduziu em altos títulos de IgG e ausência da parasitemia⁷⁹.

Pesquisas que utilizem medicamentos homeopáticos com observações e experimentações controladas associadas a modelos experimentais resistentes e que possibilitem observações clínicas seguras, resultantes de vivências diárias e experiências profissionais, fornecem informações que devem ser valorizadas não somente pelos que atuam no meio clínico, mas também por todos que buscam novas abordagens terapêuticas no tratamento de várias doenças.

1.5. *Rattus norvegicus* COMO MODELO EXPERIMENTAL NO ESTUDO DO *Trypanosoma cruzi* VERSUS MEDICAMENTOS ULTRADILUIDOS

A utilização de modelos animais se difundiu ao longo dos anos e atualmente é utilizada em todos os campos da pesquisa biológica, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e da tecnologia. Os modelos experimentais em pesquisa

tonaram-se importantes na medida em que auxiliaram a compreensão de fenômenos naturais como o estudo das infecções, da fisiologia, da etiopatogenia das doenças e da ação de medicamentos⁸⁵.

Foi Bernard (1865) que através de seus estudos de fisiologia introduziu o uso de animais como modelo experimental, assim como a possibilidade de transposição dos resultados obtidos para a fisiologia humana. Ele obteve situações físicas e químicas que resultavam em alterações nos animais semelhantes à de doenças em humanos⁸⁶.

De acordo com Ferreira (2003), tratando-se de modelos experimentais é importante conceituar o termo doença animal: Aquela cujos mecanismos patológicos são similares àqueles de uma doença humana, atuando assim como modelo, apresentando precisão de dados por meio de comprovação prévia e pelas demonstrações das suas limitações em relação à realidade que irá se apresentar⁸⁷. Neste sentido, 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 que se objetiva estudar⁸⁸.

Atualmente, na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* não há um modelo de consenso para avaliação de vários aspectos da doença devido à heterogeneidade dos resultados obtidos nos diferentes estudos. Dependendo da linhagem dos animais e da estirpe parasitária utilizada, diferentes resultados na cinética parasitária, na intensidade da carga parasitária e na taxa de mortalidade são obtidos no curso da infecção⁸⁹.

O modelo de infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* mais utilizado no estudo de uma grande variedade de parâmetros é o camundongo suíço não isogênico, porém existem diferenças consideráveis entre a doença e este modelo experimental¹⁹. Estes animais são mais susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi* e importantes alterações nos parâmetros eletrocardiográficos e de pressão arterial foram relatados durante o curso da infecção pela cepa y de *T. cruzi*⁹⁰. Os modelos de doença muitas vezes dependem da descrição dos sinais clínicos específicos observados, que em animais de pequeníssimo porte podem passar despercebidos aos olhos do pesquisador.

A utilização de ratos de laboratório, *Rattus norvegicus* espécie Wistar, como modelo experimental na infecção pelo *T. cruzi*, embora apresente uma infecção menos letal, mostra-se mais resistente, com maior sobrevivência dos animais o que pode oferecer melhores condições de estudo, sobretudo na fase crônica da doença, devido a avaliações clínicas mais visíveis e segura devido ao maior porte da espécie em relação ao camundongo²¹. Outro benefício da espécie é a possibilidade, pelo maior porte, de coleta de maior quantidade de material

biológico, o que proporciona mais diversidade de dosagens, ampliando o entendimento dos processos envolvidos.

1.6. JUSTIFICATIVA

A utilização de medicamentos ultradiluídos vem crescendo em todo o mundo. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou uma “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde”, com o intuito de incentivar o desenvolvimento de projetos homeopáticos que visem incrementar sua disponibilidade junto aos sistemas públicos de saúde, de forma coadjuvante aos tratamentos clássicos. Por outro lado, a doença de Chagas não conta com tratamento eficiente e a busca de alternativas tem sido perseguida por muitos autores ^{61,91,92}.

O modelo de infecção experimental pelo *T. cruzi* é bem conhecido podendo constituir uma excelente ferramenta para o estudo de intervenções medicamentosas⁹³. A utilização de ratos como modelo experimental mostra-se mais resistente, com maior sobrevivência dos animais podendo contribuir para o entendimento dos mecanismos de efeito destes medicamentos⁹⁴, além de constituir uma possibilidade de encontro de novas alternativas de tratamento na infecção pelo *T. cruzi*.

1.7. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a espécie *Rattus norvegicus* como modelo experimental para estudo do efeito de medicamentos ultradiluídos.

Avaliar aspectos clínicos que mostrem o efeito do medicamento ultradiluído do *Lycopodium clavatum* e do *Phosphorum* na infecção experimental pelo *T. cruzi* em ratos Wistar.

ESPECÍFICOS

Avaliar os aspectos clínicos quantitativos e qualitativos em *Rattus norvegicus* infectados por *T. cruzi* tratados ou não com medicamento ultradiluído: Peso, temperatura, consumo de água e ração, quantidade de excretas, frequência cardíaca e respiratória, aspectos da pelagem e das fezes.

Avaliar os aspectos morfológicos e morfométricos em *Rattus norvegicus* infectado por *T. cruzi* tratados ou não com medicamento ultradiluído: alteração do tamanho do cólon, diâmetro e comprimento intestinal.

1.8. REFERÊNCIAS:

1. ALMEIDA LR: **Efeitos de medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em Camundongos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 e *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909.** Seropédica, RJ: 2007. Tese Doutorado em Ciências Veterinárias- Instituto de Veterinária/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
2. CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizitrypanum cruzi*, n. gen., n. SP., agente estiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
3. BRENER, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.431, 2000.
4. DIAS J.C.P, COURA J.R. Epidemiologia, In: Dias, J.C.P., Coura, J.R., (Ed.), **Clínica e terapêutica da doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Editora da Fundação Oswaldo Cruz, p. 33-66, 1997.
5. DIAS J.C.P, MACEDO V.O. Doença de Chagas. In: Coura, J.R., (Ed.) **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, v. 1. p. 557-593, 2005.
6. LENT H, WYGODZINSKY P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas "disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123-520, 1979.
7. GOMES, Y. M. PCR and serodiagnosis of chronic Chaga's disease. Biotechnological advances. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.66, p.107-119,1997.
8. REY, L. Bases da parasitologia médica. 3. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 295, 2010.
9. OPAS. Organization Panamericana de la Salud. **Reporte sobre la enfermedad de Chagas.** Grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Reunión Técnica, Buenos Aires, Argentina: Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales. 2007.
10. DIAS, J. C. P.; PRATA, A.R.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.41, p. 193-196, 2008.
11. 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, p.755-759, 1987.
12. DIAS, J. C. P. Acute Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.79, p.85-89, 1984.
13. PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.** v.1, p. 92-100, 2001.

14. PINTO, P. L. S.; TAKAMI, R.; NUNE, E. V.; GUILHERME, C. S.; OLIVEIRA, O. C.; GAMA-RODRIGUES, J.; OKUMURA, M. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. **Rev. Hosp. Clin.**, São Paulo, v. 54, n.5, 1999.
15. PIZZI, T.; PRAGER, R. Estabilizacion de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitucion genetica uniforme: analisis cuantitativo del curso de la infeccion. **Biologica** v.16, p.3-12, 1952.
16. CHIARI, E.; Grouwth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture formas kept in laboratory for diferente periods of time. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.16, p. 81-87, 1974.
17. DESQUESNES, M. e LANA, M. Veterinary aspects and experimental studies, In: Telleria, J., Tibayrenc, M., (Eds.), **American Trypanosomiasis Chagas Disease: one hundred year of research**. Elsevier Inc., London, p.277-305, 2010.
18. HARKNESS, J.E e WAGNER, J.E. Biologia e clínica de coelhos e roedores. 3. ed. São Paulo: Roca, p.238, 1993.
19. ARAÚJO-JORGE, T.C., Modelos experimentais para o estudo in vivo da doença de Chagas: Camundongo, In: Araújo-Jorge, T.C., Castro, S.L. (Eds.), **Doença de Chagas: Manual de experimentação animal**. Fiocruz Inc., p.133-139, 2000.
20. FALKOWISKI, G.J.S.; BRAGA, C.F.; [ALEIXO, D.L.](#); [SANDRI, P.F.](#); ARAUJO, S.M. Parâmetros para avaliação clínica de camundongos em experimentação. XXX CONGRESSO DE HOMEOPATIA, 2010, Recife. **Anais do XXX Congresso de Homeopatia**: Uma abordagem sistêmica do ser, Recife: 2010. Disponível em: <http://homeopatia.itarget.com.br/>, 1:1-1. 2010. Acesso em: 05 de janeiro de 2013.
21. WHO. World Healthy Organization. **Sixty-third World Healthy Assembly**. Chagas disease: control and elimination. 2010.
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005. Disponível em: www.who.int. Acesso em: 01 dez. 2002.
23. COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, New York, n.465, p. 6-7, 2010.
24. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Óbitos por doença de Chagas Aguda, 2005 a 2010, Brasil, 2011.
25. SILVEIRA, A.C. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle, História da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.44, supl.II, p.122-124, 2011.
26. COURA, J.R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Revista ciência e cultura**, v.55, p.30-33, 2003.
27. OLIVEIRA R.B, TRONCON L.E.A, DANTAS, R.O, MENEGHELLI, U.G. Gastrointestinal manifestations of Chagas" disease. **Am J Gastroenterol**, v. 93,p. 884-9, 1998.

28. COURA, J.R. Chagas disease: what is needed – A background article. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.
29. DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, p.147-56, 1989.
30. GIORDANENGO,L.; GUINAZU,N.C. STEMPIN, R.; FRETES, F.; CERBAN.; GEA,S. Cruzapain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor parasite. **Eur. J. Immunol.** V. 32, p.1003-1011, 2002.
31. DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 22, p.147-156, 1989.
32. COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, n.6, p.641-645, 2011.
33. HIGUCHI, M.L; BRITO, T; REIS, M; BELLOTTI, G; PEREIRA-BARRETO, A.C; PILEGGI F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immune-histochemical findings. **Cardiovasc Pathol**, v.2, p. 101-6, 1993.
34. TEIXEIRA, A.R.L, NASCIMENTO, R.J, STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, 463-91, 2006.
35. COURA, J.R, BORGES-PEREIRA, J, ARAÚJO, R.M. Morbidity and regional variation of Chagas disease in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94: 26-7, 1999.
36. FLÓREZ, O, HIGUERA, S, BARRAZA, M.F, CABRERA, H.B, MANTILLA, J.C, RUGELES, C.I. Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* I in a Colombian patient. **Parasitol Res**, v. 107, p.439-42, 2010.
37. MILES, M.A, CEDILLOS, R.A, POVOA, M.M, SOUZA A.A, PRATA A, MACEDO V. Do radically dissimilar *Trypanosoma* strains (zimodemes) cause Venezuelan and cardiac forms of Chagas" disease? **Lancet**, v.1, p.1338-40, 1981.
38. VILLA, L; MOROTE, S; BERNAL, O; BULLA, D; ALBAJAR-VINAS P. Access to diagnosis and treatment of Chagas disease/infection in endemic and non-endemic countries in the XXI century. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, p. 87-93, 2007.
39. BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.9, p.233-238, 1962.
40. HABERKORN, A.; GONNERT, R.; Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. **Arzneimittelforschung.**v.22, n.9, p.1570-1582, 1972.

41. RAAFLAUB, J.; ZIEGLES, W.H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung**.v.29, n.10, p. 1611-1614, 1979.
42. 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.
43. 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.
44. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian consensus on Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.38, p.7-29, 2005.
45. GUEDES, P.M.M.; SILVA, G.K.; GUTIERREZ, F.R.S.; SILVA, J.S. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Rev. Anti Infect. Ther**. v.9, n.5. p. 609-620, 2011.
46. 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, p.755-759, 1987.
47. COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.1, p.3-24, 2002.
48. CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.44, p.1-20, 2002.
49. HASSLOCHER-MORENO, A.M.; BRASIL, P.E.A.A.; SOUZA, A.S.; XAVIER, S.S.; CHAMBELA, M.C.; SILVA, G.M.S. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **J. Antimicrob. Chemother**, v.35, p.345-356 , 2012.
50. ALEIXO, D.L: **Utilização de medicamento homeopático em infecções parasitárias: Modelo *Trypanosoma cruzi***. Maringá, PR: 2012. Tese Doutorado em Ciências da Saúde/ Universidade Estadual de Maringá.
51. MARINO, A. P. M. P. **Migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco durante a fase precoce da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: identificação de alvos terapêuticos**. Rio de Janeiro, RJ: 2005. Tese Doutorado em Biologia Parasitária/ Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz.
52. ANDRADE, M. A. M.; NASCIMENTO, M. M.; ALMEIDA SILVA, S.; LUGUETTI, A.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C.; ANDRADE, S. S.; ANDRADE, J. G.; MARTELLI, C. M. Ransomised Trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, v. 348, n. 9039, p. 1407-13, 1996.

53. FABBRO, S.D.; ARIAS, E, STREIGER, M. Evolutive behaviour towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.42, n.2, p. 99-109, 2000.
54. MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O. BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; LOEBENBERG,D.; URBINA, J.A. Activities of the triazole derivative SCH56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **Antimicrob. Agent. Chemother.** v. 44, n.1., p.150-155, 2000.
55. URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitol.** , v.19, n.11, 2003.
56. OLIVIERI, B.P.; MOLINA, J.T.; DE CASTRO, S.L. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v.36, n.1, p.79-83, 2010.
57. BRAGA, M.S.; LARIA-PIRES, L.; ARGANARAZ, E.R.; NASCIMENTO, R.J.; TEIXEIRA, A.R. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** V.42, n.3, p. 157-161, 2000.
58. BRITTO, C. C.; Silveira, C.; CARDOSO, M. A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACEDO, V.; FERNANDES, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 823-6, 2001.
59. LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M. S.; VEXENAT, A. C; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D. L.; TEIXEIRA, A. R. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Am J Trop Med Hyg**, v. 63, p. 111-8, 2000.
60. BATHIA, V.; SINHA, M.; LUXON, B.; GARG, N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by silico and in vitro screening. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6245-64, 2004.
61. FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J.; The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 4, p. 1359-64, 2007.

62. COSTA, F.; FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; RIBEIRÃO, M.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of transialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine**, v.16, p.768-774, 1998.
63. ZAPATA-ESTRELA, H; HUMMEL-NEWELL, C.; SANCHEZ, BURGOS, G.; ESCOBEDO-ORTEGON, J.; RAMIREZ-SIERRA, M.J.; ARJONA-TORRES, A.; DUMONTEIL, E. Control of *T. cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. **Immunology Letters**, v.103, n.2, p.186-191, 2006.
64. FERRAZ, M.L. Influência de citocinas e células do sistema imune sobre a atividade do inibidor da biossíntese de ergosterol (Posaconazol) na infecção experimental pelo *T. cruzi*. 2005. 87p. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Fundação Oswaldo Cruz**, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2005.
65. LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.J.K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **RBCF Rev. Bras. Ciencias Farm.** v. 41., n.1, p. 85-94, 2005.
66. IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; NAKAMURA, C.V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **The Royal Soc. of Chem. Nat. Prod. Rep.** v. 28, p. 809-923, 2011.
67. ALEIXO et al. Benznidazol ultra diluído e dinamizado diminui efeitos adversos do medicamento administrado em dose ponderal na infecção pelo *Trypanossoma cruzi*. Universidade estadual de Maringá-Maringá, 2011.
68. 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.
69. TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. **Rev Med**, v. 85, n. 2. p. 30-43, 2006.
70. 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.
71. Saúde. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS, 2002. Sobre medicina tradicional, Ginebra, Organización Mundial de la Salud. p. 65, 2002-2005.
72. BONAMIM, L.V. Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects *in vivo*. **Br Homeopath J**, v. 90, n. 4, p.198-203, 2001.

73. BONAMIN, L.V. Teorias Interpretativas sobre ultradiluições: Ilustrações Experimentais. **Cultura Homeopática**. p. 6-17, 2006.
74. 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.
75. BONAMIN, L.V. A homeopatia sob a ótica dos novos paradigmas de ciência: Revisão bibliográfica. **Rev. De Homeop.**, v.66, n.1, p.27-32, 2001.
76. 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.
77. FERRAZ, F. N.; GONÇALVES, A. V.; ALEIXO, D. L.; MIZUTANI, A. S.; ARAÚJO, S. M. Effect of biotherapy *T. cruzi* 7x in several therapeutic schemes on experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Int J High Dilution. Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH**, v. 10, n. 36, p. 125-27, 2011.
78. SANDRI, P.F.; FALKOWSKI, G. J. S.; HERNANDES, L.; DALÁLIO, M. M. O.; ALEIXO, D. L.; GOMES, M. L.; NASCIMENTO JÚNIOR, A. D.; 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. 110-14, 2011.
79. 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.
80. HAHNEMANN, S. Doenças crônicas. São Paulo: **GEHSP “Benoit Mure”**, p. 202, 1835.
81. MARTINEZ, J. Patogenesis Homeopática. **Homeopatia (Buenos Aires)**, v. 49, n. 3, p. 168-75, 1997.
82. BONAMIN, L.V. A homeopatia sob a ótica dos novos paradigmas de ciência: Revisão bibliográfica. **Rev. de Homeop.**, v.66, n.1, p.27-32, 2001.
83. BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete de ministro. Portaria nº971, de 03 de maio de 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 1(84): 20-25, 2006.
84. CASALI, V. W. D.; CASTRO, D. M.; ANDRADE, F. M. C.; LISBOA, S. P. Homeopatia bases e princípios. Viçosa: UFT, p.139-49, 2006.

85. HOCHMAN, B.; FERREIRA, L. M.; VILAS BÔAS, F. C.; MARIANO, M. Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, 2013.
86. TAHA, M.O.; FAGUNDES, J.D. Modelo animal de doença: criterios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n.1, p.59-65, 2004.
87. FERREIRA, M.L.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, n.2, p.28-34, 2005.
88. 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.
89. SILVA, D. R. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p.211-216, 2012.
90. 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.
91. CHAN I, AU A, LI P, CHUNG R, LEE MP, YU P. Illness-related factors stress and coping strategies in relation to psychological distress in HIV-infected persons in Hong Kong. **Aids Care**, v.18, n.8, p. 977-982, 2007.
92. GRANT, I; ATKINSON, J.H. The evolution of neurobehavioural complications of HIV infection. **Psychological Medicine**, v.20, p. 747-754, 1990.
93. BONAMIN, L.V. Teorias Interpretativas sobre ultradiluições: Ilustrações Experimentais. **Cultura Homeopática**, p. 6-17, 2006.
94. 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.

CAPÍTULO II

Artigo: “*RATTUS NORVEGICUS* INFECTADOS COM *Trypanosoma cruzi*: EFEITOS CLÍNICOS DO TRATAMENTO COM *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* ULTRADILUÍDOS”.

Resumo

A doença de Chagas causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* acomete milhões de pessoas no mundo e não conta com um medicamento de ação efetiva para o seu tratamento etiológico. As drogas disponíveis, o nifurtimox e o benznidazol possuem índices de cura baixos com efeitos colaterais e toxicidade que dificultam a adesão dos pacientes à terapia. Este fato impulsiona a busca por alternativas de tratamento que sejam mais efetivas e menos agressivas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação dos efeitos clínicos apresentados por *Rattus norvegicus* infectados por *T. cruzi* e tratados com soluções ultradiluídas de *Phosphorus* ou *Lycopodium clavatum*. O estudo envolveu 93 ratos com quarenta e cinco dias de idade infectados intraperitonealmente com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, distribuídos nos grupos: Sadio SD (n=13) - controle não infectado e não tratado, grupo CI (n=27) - controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY diluição $1:1 \times 10^{26}$ (n=27) - infectado e tratado com *Lycopodium*, grupo PH diluição $1:1 \times 10^{26}$ (n=26) - infectado e tratado com *Phosphorus*. Os animais foram avaliados clinicamente através dos parâmetros peso, temperatura, consumo de água e ração, quantidade de excretas, frequência cardíaca e respiratória, diâmetro e comprimento intestinal, aspecto da pelagem e consistência das fezes. Este estudo mostrou que os parâmetros utilizados foram importantes para a definição clínica da infecção de *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar pelo *T. cruzi*. Mostrou que os medicamentos LY e PH apresentam efeitos benéficos na evolução da clínica dos animais tratados. A utilização de *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* diluídos na proporção de

$1:1 \times 10^{26}$, apresentaram efeitos benéficos diferentes. Nove e cinco parâmetros de 14 analisados mostraram efeitos positivos para LY e PH, respectivamente. Os parâmetros consumo de água e ração, quantidade de excretas, diarreia, alopecia difusa, frequência cardíaca e respiratória, e comprimento intestinal apresentaram diferença significativa em relação ao controle infectado reforçando a importância do aprofundamento de estudos com *T. cruzi* versus medicamentos ultradiluídos.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de chagas, medicamentos ultradiluídos, ratos wistar, *Trypanosoma cruzi*.

Introdução

Descrita por Carlos Chagas em 1901 [1], a tripanossomíase americana causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* [2,3], é na atualidade uma das patologias tropicais mais importantes no Brasil e na América Latina. Cerca de oito milhões de pessoas estão infectadas mundialmente pela zoonose e outros 50,000 novos casos são relatados anualmente nas Américas [4,5]. Apesar disto, a doença é considerada negligenciada e não conta, até o momento, com uma droga de ação efetiva para o seu tratamento etiológico [6]. -

As primeiras e únicas drogas disponíveis para o tratamento da infecção chagásica humana, o nifurtimox e o benznidazol, contam com índices de cura muito baixos na fase crônica da doença e apresentam efeitos colaterais e toxicidade que reduzem a adesão dos pacientes ao tratamento [7,8]. Assim, a busca de um medicamento mais eficaz têm sido um dos principais objetivos dos pesquisadores constituindo esperança para a melhoria do tratamento da doença [9-14].

Estudos recentes relatam que alguns produtos de origem natural são eficazes no tratamento de doenças, promovendo uma ativação do sistema imune e consequente resistência a infecções [15,16]. Neste contexto, substâncias naturais ultradiluídas têm sido avaliadas [17,18] e constituem alternativa eficiente e segura de tratar ou contribuir na redução de

toxicidade e de efeitos colaterais observados no tratamento de diversas doenças [19]. Ao longo dos anos, cresce progressivamente a quantidade de pacientes que utilizam este tipo de tratamento, assim como o número de pesquisadores e experimentos científicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, buscando seus prováveis mecanismos de ação [9-14].

Em razão dos resultados observados, a organização mundial da saúde – WHO têm estimulado a utilização de medicamentos ultradiluídos, o que aumentou seu consumo e tornou esta opção um dos tratamentos complementares/ alternativos mais utilizados em todo o mundo. No Brasil, com o intuito de incentivar o desenvolvimento de projetos que visem incrementar a disponibilidade destas práticas, o Ministério da Saúde do Brasil aprovou uma “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde” [20].

O rato de laboratório, *Rattus norvegicus*, têm sido um dos animais mais utilizados como modelos experimentais em centros de pesquisa no mundo todo, proporcionando condições ideais de estudos por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhantes à dos humanos [21]. Além disto, por seu maior porte em relação ao camundongo permite melhor manejo e coleta de maior quantidade de materiais biológicos o que proporciona a avaliação de maior número de parâmetros em estudos experimentais [22].

Em ratos, a infecção experimental por *T. cruzi* manifesta-se de maneira menos letal que no camundongo com maior sobrevida dos animais, oferecendo melhores condições de estudo e permitindo melhor avaliação clínica.

Embora possam ser identificados na literatura artigos [11,12, 23-25] que estudaram o efeito de alguns medicamentos ultradiluídos na infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi*, não foi possível encontrar artigos que mostrassem o efeito de substâncias naturais ultradiluídas sob o curso clínico da infecção de ratos pelo *T. cruzi*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos clínicos apresentados por *Rattus norvegicus* infectados por *T. cruzi* tratados com soluções ultradiluídas de *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus*.

Material e método

Ética:

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso dos animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná- Parecer 063/ 2012. 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 93 ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) distribuídos em dois experimentos. Os animais eram machos, com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UEM. Os animais chegaram ao biotério setorial e permaneceram por sete dias para um processo de adaptação antes do início do experimento. Foram acondicionados em caixas convencionais de polipropileno (dimensão de 30x20x13cm) com tampa de metal contendo divisórias para ração e água (Modelo GC 111 - Beiramar®). As caixas permaneceram em biotério climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas. Receberam água e ração (Nuvilab Cr-1® da Nuvital®) *ad libitum* e o piso da gaiola (forração ou cama) utilizado foi a zeólita clinoptilolita (Zeocel®, Celta Brasil) pela sua alta capacidade de adsorção.

Infecção:

Os animais foram infectados intraperitonealmente com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y, por animal [26]. O número de parasitos foi determinado de acordo com Brener (1962) [8].

Grupos experimentais e tratamento:

Foram organizados os seguintes grupos: Grupo Sadio SD (n=13) - controle não infectado e não tratado, grupo CI (n=27) - controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY (n=27) - infectado e tratado com *Lycopodium clavatum* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH (n=26) - infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶.

Todos os tratamentos foram oferecidos diluídos em água (1 mL /10 mL) e oferecidos *ad libitum* no segundo dia antes da infecção e no segundo, quinto e sétimo dia após a infecção. Foram disponibilizados aos animais por 16 horas consecutivas e o período de tratamento baseou-se na relação entre a ação do medicamento e o efeito que este produz no sistema imunológico animal. Além disso, considerou a evolução específica do *T. cruzi* em roedores [27,28,29]. Assim, os tratamentos realizados antes da infecção animal - CI, PH e LY simulam a ação do medicamento quando o sistema imunológico não está em contato com o parasito. Após a infecção, é possível observar a ação do medicamento e do sistema imunológico frente à presença dos parasitas nos períodos que antecedem o pico de parasitemia, exatamente durante o pico máximo e depois dele [27,28].

Phosphorus e Lycopodium clavatum:

As tinturas-mãe de *Lycopodium clavatum* (Doith Homeopathy Union, Alemanha) e de *Phosphorus* (Homeopatia Bento Muri, São Paulo, Brasil) foram preparadas através da maceração dos esporos secos da planta ou do mineral em etanol que atuou como insumo inerte de forma que o teor alcoólico durante e ao final da extração fosse de 90% (V/V). Para alcançar a diluição final (1:10²⁶) 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)[30]. Foi utilizado como solvente solução hidroalcoólica a 7%.

Parâmetros analisados:

Todos os animais foram avaliados clinicamente durante quatro dias antes da infecção, 14 dias consecutivos após a infecção e a cada três dias entre o 15º e 27º dia de infecção [31] em horário fixo às 09h00min. Os dados obtidos eram registrados em fichas de desempenho animal.

Peso - expresso em grama, foi avaliado individualmente em balança BEL®.

Temperatura - expressa em grau centigrado, foi medida individualmente na região anterior da coxa traseira esquerda (menor quantidade de pêlos) utilizando termômetro Icel, modelo TD-920.0387.

Consumo de água e ração - expressos em mililitro e grama, respectivamente. Foram avaliados coletivamente, considerando o valor inicial oferecido ao grupo subtraído do valor medido após um dia de consumo. O valor obtido foi dividido pelo número de animais para estimar os valores individuais.

Quantidade de excretas - expresso em grama, foi obtido pela pesagem da cama das gaiolas antes do uso subtraída do valor da pesagem obtido após um dia de uso. Foram consideradas fezes e urina conjuntamente.

Aspecto das fezes – Foi avaliada presença ou ausência de diarreia com fezes pastosas.

Aspectos da Pelagem - foram avaliadas a presença de piloereção (pelos eriçados) e queda de pelos, definidas como presentes ou ausentes durante três dias consecutivos.

Frequência cardíaca e respiratória- expressas em batimentos por minuto (bpm) e movimentos por minuto (mpm), avaliados com auxílio de um estetoscópio BD®.

Diâmetro e comprimento intestinal- Foram avaliados aspectos anatômicos morfológicos e morfométricos do intestino grosso de cinco animais sorteados no grupo SD e CI, quatro

animais tratados do grupo LY e quatro animais tratados do grupo PH no 125º dia de infecção. No 315º dia de infecção foram avaliados três animais de cada grupo. Os animais foram sedados (cloridrato de cetamina e xilasina- 1:1, via intramuscular), e submetidos a exames radiológicos com a administração retal de 5,0 ml de sulfato de bário (enema opaco) [32]. O alargamento do cólon (diâmetro intestinal) foi mensurado através da utilização de um paquímetro digital (Starret®) na radiografia obtida nos locais destacados pela seta (Figura 6). Após os exames, os animais sofreram eutanásia por aprofundamento anestésico (cloridrato de cetamina 50mg/kg e xilasina-10mg/kg, intraperitonealmente), e o comprimento dos cólons foram mensurados a partir da prega íleo cecal até o final do reto, com auxílio de uma fita métrica.

Análise estatística:

Os dados obtidos foram comparados utilizando-se o programa *Statistica 8.1* com nível de significância de 5%. Para verificação de normalidade o teste *Shapiro-Wilk* foi realizado. Quando os dados apresentaram distribuição normal, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste LSD (*Least Significant Difference*). Os dados não paramétricos foram analisados através do teste *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn* e para a comparação de proporções foi utilizado o teste *Z*. Foram considerados os diferentes períodos: Menos 3º ao 4º dia de infecção- período pré-infecção com tratamento ou até o início da constatação da infecção pelo *T. cruzi*, 5º ao 10º dia de infecção- período em que ocorre o pico de parasitemia, 11º ao 27º dia de infecção- quando os níveis parasitemicos caem vertiginosamente com infecção subpatente.

Resultados

A curva de peso apresentou evolução característica de animais infectados com menor ganho de peso após o 10º dia de infecção, sem diferença estatística entre os grupos. No

entanto, foi possível observar tendência de melhor desempenho no grupo tratado com LY (Figura 1A).

Quanto à temperatura, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Do 11^o ao 27^o dia de infecção a probabilidade de diferença entre os grupos é menor que 10% ($p=0,07$) com o grupo LY apresentando curva que se destaca dos demais grupos e com a hipotermia característica de piora clínica da infecção pelo *T. cruzi* mais suave (Figura 1B).

A figura 2A evidencia o decréscimo do consumo de água de forma contínua e progressiva nos grupos infectados até o 24^o dia de infecção quando é possível observar a recuperação de todos os grupos. No segundo período, 3^o ao 10^o dia de infecção, o tratamento, LY ou PH diminuíram o consumo de água ($p=0.0011$, Tabela 1). Do 11^o ao 27^o dia de infecção o grupo tratado com LY apresentou melhor desempenho já que não foi observada diferença significativa em relação ao controle sadio ($p=0.0003$, Tabela 1).

A figura 2B mostra o consumo de ração ao longo do período de infecção, com efeitos diferentes de acordo com o tratamento. No primeiro e segundo períodos, o grupo sadio foi responsável pela diferença estatística ($p=0,0040$, Tabela 2) e não se observa diferença entre os grupos tratados e controle infectado. No terceiro período, do 11^o ao 27^o dia de infecção, o grupo tratado com LY mostra melhores resultados com melhor performance que o grupo controle infectado e PH ($p=0,0003$, Tabela 2).

Com relação à quantidade de excretas, efeitos diferentes foram observados de acordo com o tratamento. No primeiro período, o grupo PH aumentou a quantidade de excretas enquanto LY diminuiu significativamente ($p=0.00011$, Tabela 3). No último período, do 11^o ao 27^o dia de infecção, o grupo CI mostra redução da quantidade de excretas em relação aos demais grupos ($p=0,00021$, Tabela 3). Nos grupos tratados a quantidade de excretas é menor que nos animais sadios, sem diferença estatística.

A Tabela 4 mostra os dados para ocorrência de diarreia, piloereção e alopecia difusa para os parâmetros aspecto das fezes e da pelagem obtidos durante todo período de infecção

(figura 3). O tratamento com o LY proporcionou menores índices de diarreia e de alopecia difusa ($p= 0.0404$, Tabela 4).

Nos parâmetros frequência cardíaca- FC (bpm- batimentos por minuto) e respiratória- FR (mpm- movimentos por minuto), os efeitos foram observados no primeiro e segundo período, do 3º dia antes da infecção ao 10º dia de infecção. O grupo PH mostrou melhor desempenho do que o grupo tratado com LY ($p=0,006495$ e $p=0,00016$ em relação ao grupo sadio). O PH mostrou tendência de manutenção dos valores de FC e FR mais próximos dos níveis dos animais do grupo sadio. No último período este efeito não foi observado (Figura 4, Tabela 5 e Tabela 6).

O parâmetro diâmetro intestinal (medida utilizando o enema opaco) não apresentou diferença estatística tanto aos 123º dias quanto aos 315º dias de infecção (figura 5). O comprimento intestinal total aos 123º dias de infecção não apresentou diferença estatística, porém aos 315º dias os grupos tratados LY e PH diferiram entre si significativamente ($p=0,01862$, Tabela 7) com o grupo tratado LY apresentando maior alongamento intestinal do que o grupo tratado PH. O comprimento do cólon distal também foi significativamente diferente do grupo tratado com LY para CI ($p=0,04173$, Tabela 7) com maior alongamento intestinal observado no grupo tratado LY. A figura 5, 6 e 7 ilustram os resultados obtidos para os 315º dias após a infecção.

Discussão

Neste trabalho, ratos da linhagem Wistar infectados pelo *T. cruzi* e tratados com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* mostraram perfis clínicos diferentes na evolução da infecção por *T. cruzi* - cepa Y. Os resultados mostraram benefícios em 10 e 5 de 14 parâmetros estudados para LY e PH: peso, temperatura, consumo de água e ração, quantidade de excretas, queda de pelos e diarreia, frequência cardíaca e respiratória, comprimento intestinal total e comprimento do cólon distal.

É importante destacar que todos os grupos iniciaram o experimento nas mesmas condições clínicas, como animais saudáveis, e foram submetidos a condições ambientais padronizadas, além de o experimento ter sido conduzido como ensaio controlado, cego, randomizado por sorteio e ter sido repetido pelo menos duas vezes. Tal fato proporciona boa qualidade na metodologia utilizada neste experimento, requisito imprescindível para aceitação de resultados científicos de maneira geral e em especial com substâncias altamente diluídas [33,34].

Em modelos animal a quantidade de ingesta tanto de sólidos quanto de líquidos está diretamente ligada às condições de saúde animal [35]. Bem estar, maior ganho de peso e produção economicamente viável representam o tripé da cadeia da produtividade animal muito discutida no contexto médico veterinário [36]. No presente trabalho, os grupos tratados LY e PH mostraram melhor evolução clínica. Os efeitos observados são indicativos de interferência positiva dos medicamentos diluídos no eixo metabólico neuro-psico-imuno-endócrino, um sistema integrado que promove uma resposta biológica do hospedeiro frente ao parasito e favorece a recuperação clínica dos animais regulando a homeostase orgânica [37]. Vale destacar a necessidade de explorar a interferência destes medicamentos na modulação das concentrações de citocinas, sobretudo TNF-alfa, relacionada ao ganho de peso [37]. Nossos dados mostram evolução de ganho de peso do grupo tratado LY mais próxima do comportamento dos animais sadios que dos grupos PH e CI, esta dinâmica pode ser detectada visualmente e constatada através da tendência gráfica de melhor desempenho neste grupo.

Com relação ao consumo de água e ração e quantidade de excretas o grupo tratado com LY apresentou melhor desempenho. A literatura deixa claro que após o 10º dia de infecção pelo *T. cruzi*, os animais infectados tendem a obter menor ganho de peso, menor consumo de água e ração, e maiores índices de excretas relacionada à diarreia [8,26]. Em modelos murinos de infecção pelo *T. cruzi* a morbidade está ligada à carga parasitária e a

manifestação da doença mais letal está diretamente relacionada ao desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro, o que é caracterizado pelo aumento de debilidade dos animais ao longo da infecção [38].

A presença de diarreia, piloereção e queda de pelos nos animais infectados eram esperadas, visto que estas alterações estão presentes no curso da infecção pelo *T. cruzi* [29]. O aspecto do pelo reflete a condição de adoecimento com acometimento sistêmico, além de estresse na manipulação do animal, mostrando que estar em experimentação já é um fator em si estressante [29]. As fezes amolecidas resultantes da depleção neuronal do plexo mientérico, são consequentes de alterações fisiológicas e funcionais do trato gastrointestinal, o que modifica a consistência das fezes e caracteriza a presença de períodos diarréicos [39]. O tratamento com LY mais uma vez mostrou benefícios para os animais tratados. Neste grupo a ocorrência de menores índices de diarreia e queda de pelos reforça a compreensão global de que a terapêutica utilizada estimula o organismo proporcionando melhor condição clínica para que possa reagir contra a dinâmica do adoecimento [37]. Reforçando este fato, a avaliação da temperatura corporal dos animais mostrou uma condição corporal estável e, mesmo não se mostrando estatisticamente significativa, os grupos tratados não apresentaram a hipotermia característica do agravamento da infecção [8,26]. A especulação do envolvimento de modulação do sistema imunológico neste processo tem base na literatura e a busca dos mecanismos desta melhor condição constitui perspectiva de trabalho [37].

Os valores médios obtidos de frequência cardíaca inferior e respiratória superior às referências literárias para animais sadios refletiram os efeitos da infecção pelo *T. cruzi*, assim como a adaptação destes ao meio [21]. Estes foram resultantes do acometimento cardíaco e do comprometimento do sistema de condução atrioventricular que reduziram a média dos batimentos cardíacos e aumentaram os movimentos respiratórios na tentativa de compensação cardíaca e de suprimento de oxigênio [40,41]. O grupo tratado com PH mostrou tendência de manutenção dos valores de frequência cardíaca e respiratória próximas dos níveis dos animais

sadios sugerindo uma tentativa de reestabelecimento da homeostasia. Estes achados são importantes e indicam o favorecimento do sistema biológico que, em condições de higidez, tendem a manter seu meio interno constante por meio de controles de limites de variação [39].

A utilização do enema opaco avaliou a presença de alteração morfológica e morfométrica relacionada ao comprimento intestinal total ou diâmetro do colón. Estas alterações são consequentes às lesões na camada circular interna do intestino e ao acometimento do sistema nervoso autônomo local durante a fase crônica da doença [42]. Santos Júnior 2002 [42] ressalta que as alterações fisiológicas na enteromegalia da doença de Chagas cursam por conta da denervação, variável individual em dependência do equilíbrio estabelecido entre o hospedeiro e o *T. cruzi*, relação esta que envolve fatores da reação do sistema imunológico.

No 315º dia, quando a infecção é considerada crônica, os animais tratados com LY e PH não apresentaram diferenças no comprimento intestinal total em relação ao controle de infecção. No entanto, os animais tratados com LY apresentaram o intestino com maior comprimento total que os tratados com PH. Ainda, animais tratados com LY apresentaram maior cólon distal que os animais do grupo CI. Este efeito pode refletir a tentativa do organismo em impedir a complicação da doença, tendência observada na análise macroscópica do intestino, porém não expressa estatisticamente. A literatura médica veterinária descreve a síndrome do intestino curto em animais após ressecção intestinal e que, secundariamente a ela, apresentaram menor absorção e aproveitamento nutricional com menor ganho de peso e maior ocorrência de diarreia [43,44]. Em humanos a síndrome também é descrita, assim como a capacidade de adaptação anatômica e funcional na tentativa de compensação das funções digestivas e de absorção [45,46,47]. Assim, pode ser discutido que o maior alongamento do cólon distal observado no grupo tratado LY em relação ao observado no grupo CI está relacionado a benefício para os animais tratados. Como visto anteriormente, animais do grupo LY apresentaram menor quantidade de diarreia observada no grupo CI. Esta

ocorrência reforça os achados de melhor condição de saúde observados no grupo LY. Segundo Carvalho [34] o organismo não é passivo nas doenças e lesões, pelo contrário, faz todo um movimento para combatê-las e restabelecer seu equilíbrio. O estado de doença, portanto, é um esforço do organismo para recuperar um equilíbrio perturbado. Este alongamento é uma tentativa de reequilibrar os danos que o parasito causou com a despopulação neuronal intestinal descrita na literatura [42].

Os resultados obtidos mostram que o *Rattus norvegicus* constitui um bom modelo experimental de avaliação clínica de intervenções para infecção experimental pelo *T. cruzi*. Mostram que o tratamento com *Phosphorus* ou *Lycopodium clavatum* trouxeram benefícios aos animais, em concordância com os achados de outros estudos que têm mostrado a capacidade de resposta de sistemas biológicos quando estimulados por soluções ultradiluídas [48,49,50,51,52,53,54,55,56,57].

Conflito de interesses

Não existem conflitos de interesse.

Lista de abreviaturas

WHO- Organização Mundial da Saúde;

SD – Grupo controle sadio não infectado e não tratado;

CI- Grupo controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água);

LY- Grupo infectado e tratado com *Lycopodium clavatum* diluição 1:1x10²⁶;

PH- Grupo infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶;

LSD- Teste *Least Significant Difference*;

FC- Frequência cardíaca;

BPM- Batimentos por minuto;

FR- Frequência respiratória;

MPM- Movimentos por minuto;

TNF- Fator de necrose tumoral;

Contribuição dos autores

Todos os autores contribuíram como membros chave para este trabalho, fizeram contribuições substanciais para o delineamento, concepção e aquisição de dados na pesquisa. Participaram na escrita do manuscrito e deram sua aprovação para a versão final.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e Fundação Araucária do Paraná pelo apoio financeiro.

Referências:

1. Chagas C: **nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909, **1**: 159-218.
2. Coura J.R: **Tripanossomose, doença de chagas.** *Cienc Cult* 2003, **55**:1-7.
3. Who: **Chagas' Disease, Chile** *In Weekly epidemiological record.* Volume 75, 2000: 9-16.
4. Senior K: **Chagas disease: moving towards global elimination.** *Lancet Infectious Diseases* 2007, **7**: 572-581.
5. Who: **Control of Chagas disease.** *Technical Reports Series* 2002, **905**: 1-109.
6. Coura JR: **Tripanosomose, doença de chagas.** *Cienc. Cult.* 2003, **55**:1-7.
7. de Castro S. L: **The challenge of Chagas's disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*.** *Acta Tropica* 1993, **53**: 83-98.
8. Brener Z, Andrade Z A, Barral-Netto M: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

9. Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ: **The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**: 1359-64.
10. San-Rodríguez CE, Concepción JL, Pekerar S, Oldfield E, Urbina JA: **Bisphosphonates as inhibitors of trypanosome cruzi hexokinase: Kinetic and metabolic studies.** *J Biol Chem* 2007, **282**: 12377-12387.
11. Almeida RL, Campos MCO, Herrera LVB, Bonamin LV, Fonseca AH: **Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** *Homeopath* 2008, **97**: 65-69.
12. Queiroz AO, Xavier SCC, Faria KG, Bernardo RR, Leitão TCA: **Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: um estudo in vivo.** *Cult Homeopát* 2006, **17**: 9-13.
13. Holandino C: **Chagas disease: an old disease in need of new therapies.** *Homeopathy* 2008; **97**: 57-58.
14. Aleixo DL, Ferraz FN, De Melo CS, Gomes ML, Toledo MJ, Kaneshima EN, Bersani-Amado CA, Araújo SM: **Changes of RaPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole.** *Homeopathy* 2008, **97**: 59-64.
15. Bin-Hafeez RH, Suhel P, Suwarna P, Iqbal S, Raisuddin S: **Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice.** *International Journal of Immunopharmacology* 2003, **3**: 257–265.
16. Mungantiwar, AA, Nair AM, Shinde UA, Dikshit VJ, Saraf MN, Thakur VS, Sainis, KB: **Studies on the immunomodulatory effects of *Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction.** *Journal of ethnopharmacology* 1999, **65**: 125-131.

17. Bonamin LV, 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. São Paulo: Signals and Images, 2008: 3-28.
18. Bonamin LV: **Teorias Interpretativas sobre ultradiluições: ilustrações experimentais**. *Cultura Homeopática* 2006, **16**: 6-17.
19. Teixeira, M Z: **Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar**. *Rev Med* 2006, **85**:43.
20. **Homeopatia Online. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a homeopatia** [www.homeopatiaonline.com]
21. Harkness JE & Wagner JE: *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. São Paulo: Roca; 1993.
22. Who: **Estrategia de la OMS. Sobre medicina tradicional**, 2002.
23. Aleixo DL, Ferraz FN, Ferreira EC, de Lana M, Gomes ML, de Abreu Filho BA, Araújo SM: **Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by Trypanosoma cruzi**. *BMC Research Notes* 2012, **5**:352.
24. Ferraz FN, Simoni GK, Nascimento AD, Melo CS, Aleixo DL, Gomes ML, Spaki M, Araújo SM: **Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by Trypanosoma cruzi produce different effects**. *Homeopathy* 2011, **100**: 237–243.
25. Sandri PF, Falkowski GJS, Hernandes L, Dalalio MO, Aleixo DL, Gomes ML, Anélio DN, Moliterno RA, Araújo SM: **Biotherapeutic of trypanosoma cruzi 17 d increases apoptosis in experimentally infected mice**. *Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH on International Journal of High Dilution Research* 2011, 2011:119-124.
26. Silva LHP, Nussenzweig V: **Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco**. *Folia Clínica Biologia* 1953, **20**:191–201.
27. Sandri PF: **Influência da idade sobre os efeitos do bioterápico 17 dH na infecção decamundongos pelo Trypanosoma cruzi**. Dissertação de mestrado da Universidade Estadual de Maringá, Biociências Aplicada a Farmácia, 2010.

28. Almeida LR: **Efeitos de medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em Camundongos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 e *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909.** tese Doutorado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2007.
29. Falkowski GJS, Braga CF, [Aleixo DL](#), [Sandri PF](#), Araujo SM: **Parâmetros para avaliação clínica de camundongos em experimentação.** Nos anais Anais do XXX Congresso de Homeopatia: uma abordagem sistêmica do ser:. 22-27 de novembro de 2010. Recife: 2010. XXX Congresso de Homeopatia, 2010.
30. Farmacopéia Homeopática Brasileira: Parte I - Métodos Gerais. São Paulo, 1997.
31. Pereira da Silva LH & Nussenzweig V: **Sobre uma cepa *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo albino.** *Folia clin. Biol* 1953, **20**: 191-207.
32. Okumura M, Corrêa Neto A: **Produção experimental de megas em animais de inoculados com *trypanosoma cruzi*.** *Rev. Hosp. Clin. S. Paulo* 1961, **16**: 338-341.
33. Andrade A, Pinto SC & Oliveira RS: Animais de Laboratório: criação e experimentação. Fiocruz. Rio de Janeiro, 2002.
34. As três formas de cura [<http://www.ecomedicina.com.br/site/conteudo/artigo11.asp>]
35. **A higiene no processo produtivo**
[<http://www.fmvz.unesp.br/paulodomingues/graduacao/aula1-texto.pdf>]
36. **Animal welfare, economics and policy: report on a study undertaken for the Farm & Animal Health Economics Division of Defra**
[<http://archive.defra.gov.uk/evidence/economics/foodfarm/reports/documents/animalwelfare.pdf>]
37. Teixeira MZ: **Possíveis contribuições do modelo homeopático à humanização da formação médica.** *Revista Brasileira de Educação médica* 2009, **33**:454-463.

38. 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.
39. Carvalho GD, Masseno APB, Zanini MS, Zanini SF, Porfírio LC, Machado JP, Mauad H: **Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos**. *Revista Ceres* 2009, **56**: 51-57.
40. Barret SC, Holmes RA & Klei TR: **Electrocardiographic features of trypanosomiasis in dogs inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates**. *Am. J. Vet. Res* 1992, **53**:521-527.
41. LP Tilley: **Essentials of Canine and Feline Electrocardiography**. Lea and Febiger: Philadelphia; 1992.
42. Santos Júnior JCM: **Megacólon - Parte II: Doença de Chagas**. *Rev bras Coloproct* 2002, **4**: 266-277.
43. Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P, Novotny BJ: **Small Animal Clinical Nutrition**. *Mark Morris Institute* 2010, **5**: 1086, 1087.
44. Ammourey RF, Ghishan, FK: **Pathophysiology of diarrhea and its Clinical Implications**. In: JOHNSON, L.R. et al. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 5th edition, Elsevier, London 2012, **2**: 2182-2197.
45. Hwang ST, Shulman RJ: **Síndrome do intestino curto**. *Clin Perinatol* 2002, **29**: 181-94.
46. Chagas Neto FA, Barreto ARF, Muglia VF, Junior JE, Bellucci AD, Júlio Marchini JS, Cunha SFC: **Avaliação e seguimento de pacientes adultos com síndrome do intestino curto pelo exame contrastado de trânsito intestinal**. *Radiologia brasileira* 2011, 188-91.

47. Fontes CE, Bandeira COP, Ferreira MV, Nigro ATN, Campos LF, Júnior SS: **Estudo comparativo do tratamento de ferimento de colon de coelho com reparo seroso da parede de jejunum e sutura primária.** *Acta Cir. Bras.* 2000, **15**.
48. Bildet J, Guyot M, Bonini F, Grignon MC, Poitevin B, Quilichini R: **The effect of dilutions of Apis mellifica and Apium virus on ultraviolet light-induced erythema in the guinea pig.** *Ann Pharm Fr* 1989, **47**: 24-32.
49. Davenas E, Poitevin B, Benveniste J: **Effect of mouse peritoneal macrophages of orally administered very high dilutions of silica.** *Eur J Pharmacol* 1987, **135**: 313-319.
50. Bonamim, L.V: **Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects *in vivo*.** *Br Homeopath J* 2001, **90**:198-203.
51. Poitevin B, Davenas E, Benveniste J: **In vitro immunological degranulation of human basophils is modulated by lung histamine and Apis mellifica.** *Br J Clin Pharmacol* 1998, **25**: 439-444.
52. Wayne J, Yu lin, Frank T: **Neuroprotection from glutamate toxicity with ultra-low dose glutamate** *Neuroreport* 2001, **12**: 335-339.
53. Shipley M, Hedley B, Broster G, Jenkins M, Clover A, Williams I: **Controlled trial of homeopathic treatment of osteoarthritis** *Lancet* 1983, **1**: 97-98.
54. Long L. & Ernst E: **Homeopathic remedies for the treatment of osteoarthritis: a systematic review** *Br Homeopath J* 2001, **90**: 37-43.
55. Mesquita L.P: **Homeopathy and physiotherapy with special reference to osteoarthropathy** *Br Homeopath J* 1998, **76**:16-18.
56. Aabel S, Laerum E, Dolvik S, Djupesland P: **Is homeopathic 'immunotherapy' effective? A double-blind, placebocontrolled trial with the isopathic remedy Betula 30c for patients with birch pollen allerg.** *Br Homeopathy J* 2000, **89**: 161-168.

57. Stock-schröer B, Albrecht H, Betti L, Endler PC, Linde K, Lüdtkke R, Musial F, Wijk R, Witt C, Baumgartner S: **Reporting experiments in homeopathic basic research (REHBaR) – A detailed guideline for authors.** *Homeopathy* 2009, **98**: 287-298.

Figuras

Figura 1- Curvas da evolução do ganho de peso e temperatura em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Evolução do ganho de peso (A) e temperatura (B) em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* nos diferentes grupos experimentais CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição $1:1 \times 10^{26}$, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição $1:1 \times 10^{26}$, grupo SD- animais sadios.

Figura 2- Curvas da evolução do consumo de água e ração em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*

Evolução do consumo de água (A) e ração (B) em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* nos diferentes grupos experimentais: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição $1:1 \times 10^{26}$, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição $1:1 \times 10^{26}$, grupo SD- animais sadios.

Figura 3- Parâmetros diarreia, piloereção e queda de pelos em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Parâmetros diarreia, piloereção e queda de pelos em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* durante período experiental para o diferentes grupo experimental CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água). A- Animal com região anal inflamada e restos de fezes aderidos; B- Animal apresentando piloereção evidente, C- Queda de pelo facilmente diagnosticada ao manuseio.

Figura 4- Curvas da evolução da frequência cardíaca (bpm) e respiratória (mpm) em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Evolução da frequência cardíaca (bpm) (A) e respiratória (mpm) (B) em ratos Wistar infectados pelo com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* nos diferentes grupos experimentais: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição $1:1 \times 10^{26}$, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição $1:1 \times 10^{26}$, grupo SD- animais sadios.

Figura 5- Medidas do comprimento intestinal total, cólon proximal e distal, em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

A- Medida do comprimento total intestinal, B- cólon proximal e C- cólon distal em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* aos 315 dias de infecção para os grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶.

Figura 6- Enema opaco em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi* aos 315 dias de infecção.

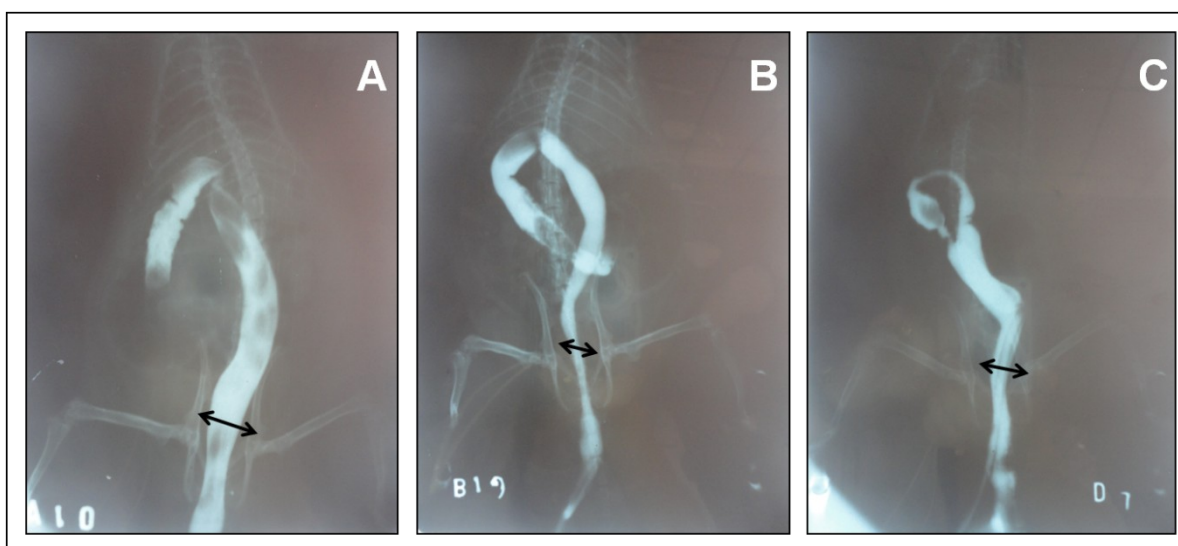


Figura representativa dos diâmetros intestinais observados nos exames radiológicos- enema opaco, realizados em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* aos 315 dias de infecção para os diferentes grupos experimentais: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶. A- CI animal 10, B- LY animal 12, C- PH animal 7. Imagem de duplo contraste em intestino grosso. Setas indicam os locais onde foram feitas as medidas comparadas dos diâmetros intestinais.

Figura 7- Comprimento intestinal total em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*.

Figura representativa dos achados observados em porções intestinais referentes ao comprimento intestinal total em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* aos 315 dias de infecção para os diferentes grupos experimentais: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorus* diluição 1:1x10²⁶. A- PH animal 7, B- CI animal 10, C- LY animal 12

Tabelas

Tabela 1 - Consumo de água avaliado em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.

Grupo	Consumo de água										
	Menos 3 ^o ao 4 ^o dias			<i>p</i> *	5 ^o ao 10 ^o dia			<i>p</i> *	11 ^o dia ao 27 ^o dia		
	n	Média ± Desvio Padrão	n		Média ± Desvio Padrão	n	Média ± Desvio Padrão		<i>p</i> **		
<i>Controle infectado</i>	2	46,4 ± 5,3	2	43,2 ± 3,7	1	33,2 ± 4,4					
<i>Lycopodium</i>	2	43,1 ± 3,9	5	38,4 ± 4,0	1	34,4 ± 1,7	0,03691 ⁽¹⁾	0,0011 ⁽²⁾	0,0003 ⁽³⁾		
<i>Phosphorus</i>	2	44,2 ± 2,0	6	40,2 ± 4,0	1	31,4 ± 3,6					
<i>Sadio</i>	1	47,1 ± 0,0	3	41,1 ± 0,0	3	41,8 ± 0,0					

*Kruskal-Wallis seguida do teste post-hoc Dunn; ** ANOVA seguida do teste post-hoc LSD; ⁽¹⁾ Sadio difere de *Lycopodium*; ⁽²⁾ Sadio difere de *Lycopodium* e de *Phosphorus*; ⁽³⁾ Sadio difere de controle infectado e de *Phosphorus*.

Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* 1:1x10²⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Três (3) dias antes da infecção (- 3^o) ao 4^o dia de infecção, 5^o ao 10^o dia de infecção, 11^o ao 27^o dia de infecção. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão *significância estatística (p<0.05).

Tabela 2 - Consumo de ração avaliado em ratos Wistar infectados com 5x10⁶ formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.

Consumo de ração									
Grupo	Menos 3 ^o ao 4 ^o dias		p*	5 ^o ao 10 ^o dia		p*	11 ^o dia ao 27 ^o dia		p**
	n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão	
<i>Controle infectado</i>	27	21,8 ± 3,5		27	20,5 ± 3,1		19	20,1 ± 3,2	
<i>Lycopodium</i>	26	21,4 ± 4,3	0,0040 ⁽¹⁾	25	19,8 ± 4,0	0,0011 ⁽²⁾	16	22,6 ± 1,7	0,0003 ⁽³⁾
<i>Phosphorus Sadio</i>	26	21,6 ± 4,5		26	19,8 ± 2,6		17	19,3 ± 3,9	
	13	26,9 ± 3,9		12	26,8 ± 1,1		3	26,6 ± 0,1	

*Kruskal-Wallis seguida do teste post-hoc Dunn; ** ANOVA seguida do teste post-hoc LSD; ⁽¹⁾⁽²⁾ Sadio difere dos demais; ⁽³⁾ Sadio difere dos demais, *Lycopodium* difere do controle infectado e *Phosphorus* difere de *Lycopodium*.

Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Três (3) dias antes da infecção (- 3^o) ao 4^o dia de infecção, 5^o ao 10^o dia de infecção, 11^o ao 27^o dia de infecção. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão.*significância estatística (p<0.05).

Tabela 3 - Quantidade de excretas avaliada em ratos Wistar infectados com 5x10⁶ formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.

Excretas									
Grupo	Menos 3 ^o ao 4 ^o dias		p*	5 ^o ao 10 ^o dia		p*	11 ^o dia ao 27 ^o dia		p*
	n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão	
<i>Controle infectado</i>	27	13,7 ± 1,8		27	11,8 ± 1,6		19	8,0 ± 1,3	
<i>Lycopodium</i>	26	11,1 ± 2,1	0,00011 ⁽¹⁾	25	11,4 ± 2,2	0,07911	16	9,4 ± 1,6	0,00021 ⁽²⁾
<i>Phosphorus</i>	26	14,5 ± 3,7		26	13,2 ± 2,5		17	9,5 ± 2,2	
<i>Sadio</i>	13	13,4 ± 1,0		12	13,0 ± 1,8		3	16,5 ± 0,0	

*Kruskal-Wallis seguida do teste post-hoc Dunn; ⁽¹⁾ *Lycopodium* difere dos demais; ⁽²⁾ Controle infectado difere dos demais.

Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Menos 3^o ao 4^o dia de infecção, 5^o ao 10^o dia de infecção, 11^o ao 27^o dia de infecção. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. *significância estatística (p<0.05).

Tabela 4 - Parâmetros clínicos avaliados em ratos Wistar infectados com 5x10⁶ formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.

Grupo	Diarreia		Piloereção		Queda de pelos	
	n/N (%)	p	n/N (%)	p	n/N (%)	P
<i>Controle infectado</i>	9/27 (33,3)	Referência	14/28 (50,0)	Referência	21/28 (75,0)	Referência
<i>Lycopodium</i>	0/13 (0,0)	0,0233*	0/13 (0,0)	0,0032*	0/13 (0,0)	0,0001*
<i>Phosphorus</i>	1/26 (7,7)	0,0001*	11/26 (42,3)	0,5732	11/26 (42,3)	0,0404*
<i>Sadio</i>	2/26 (15,0)	0,1321	11/26 (42,3)	0,5732	14/26 (53,8)	0,1729

* p significativo pelo teste Z

Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶. *significância estatística (p<0.05).

Tabela 5 - Frequência respiratória em ratos Wistar infectados com 5x10⁶ formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.

Grupo	Frequência respiratória								
	Menos 3 ^o ao 4 ^o dias			p*	11 ^o dia ao 27 ^o dia				
	n	Média ± Desvio Padrão	n		Média ± Desvio Padrão	n	Média ± Desvio Padrão		
<i>Controle Infectado</i>	14	128,8 ± 15,2	1 4	149,0 ± 8,5	1 4	153,0 ± 10,5			
<i>Lycopodium</i>	13	136,4 ± 10,3	0,00016**	11	150,5 ± 6,0	0,56093	1 0	159,1 ± 7,6	0,5985 1
<i>Phosphorus</i>	13	140,9 ± 10,4		1 3	154,5 ± 9,8		1 2		
<i>Sadio</i>	10	154,1 ± 13,1	1 0	153,2 ± 17,2	Nenhum animal				

* ANOVA seguida do teste post-hoc LSD; ** *Sadio* difere dos demais e *Phosphorus* difere do

controle infectado.

Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Menos 3^o ao 4^o dia de infecção, 5^o ao 10^o dia de infecção, 11^o ao 27^o dia de infecção. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. *significância estatística (p<0.05).

Tabela 6 - Frequência cardíaca em ratos Wistar infectados com 5x10⁶ formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.

Frequência cardíaca									
Grupo	Menos 3 ^o ao 4 ^o dias		p*	5 ^o ao 10 ^o dia		p*	11 ^o dia ao 27 ^o dia		p*
	n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão	
<i>Controle Infectado</i>	14	166,6 ± 9,2		14	185,4 ± 6,3		14	183,4 ± 7,3	
<i>Lycopodium</i>	13	163,7 ± 9,9	0,006495**	11	188,6 ± 3,3	0,31611	10	185,8 ± 5,0	0,56851
<i>Phosphorus</i>	13	170,5 ± 6,2		13	187,8 ± 4,3		12	183,0 ± 5,2	
<i>Sadio</i>	10	175,9 ± 6,6		Nenhum animal			Nenhum animal		

* ANOVA seguida do teste post-hoc LSD; ** *Sadio* difere dos demais e *Phosphorus* difere do *Lycopodium*.

Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Menos 3^o ao 4^o dia de infecção, 5^o ao 10^o dia de infecção, 11^o ao 27^o dia de infecção. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. *significância estatística (p<0.05).

Tabela 7 - Avaliação do comprimento intestinal em ratos Wistar infectados com 5x10⁶ formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Y.

Comprimento intestinal									
Grupo	Total (cm)		p*	Cólon proximal (cm)		p*	Cólon distal (cm)		p*
	n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão		n	Média ± Desvio Padrão	
<i>Controle infectado</i>	4	16,5 ± 1,1		4	1,0 ± 0,1		4	0,90000 ± 0,1	
<i>Lycopodium</i>	3	18,5 ± 1,4	0,01862 ⁽¹⁾	3	1,1 ± 0,0	0,4129 ₃	3	1,26667 ± 0,3	0,04173 ⁽²⁾
<i>Phosphorus</i>	3	13,8 ± 2,9		3	1,2 ± 0,3		3	1,06667 ± 0,1	

*ANOVA seguida do teste post-hoc LSD; ⁽¹⁾*Phosphorus* difere de *Lycopodium*;
⁽²⁾*Lycopodium* difere de controle infectado;

Avaliação do comprimento intestinal- Comprimento total, comprimento do cólon proximal, comprimento do cólon distal aos 315 dias de infecção para os diferentes grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium*, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* 13CH. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. *significância estatística ($p < 0.05$).

CAPÍTULO III

3. CONCLUSÕES

Este estudo sobre a utilização de quimioterápicos obtidos de produtos naturais mostrou que:

- 1) Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com manipulados de *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus* trouxeram benefícios aos animais tratados.

- 2) Medicamentos ultradiluídos proporcionam benefícios no tratamento de doenças infecciosas reforçando a importância do aprofundamento de estudos com *T. cruzi* versus novas abordagens terapêuticas.
- 3) A utilização da terapia requer um aperfeiçoamento das técnicas e disseminação do conhecimento sobre estes medicamentos.
- 4) Pesquisas que utilizem medicamentos ultradiluídos com observações e experimentações controladas associadas a modelos experimentais resistentes, *Rattus norvegicus*, possibilitam observações clínicas seguras e fornecem informações que devem ser valorizadas não somente pelos que atuam no meio clínico, mas também por todos que buscam novas abordagens terapêuticas no tratamento de várias doenças.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Elaborar um artigo científico que descreva a *praxis* para realização de experimentos envolvendo medicações ultradiluídas, com observações e experimentações controladas, experimento cego e randomizado, análises estatísticas adequadas, trabalho em grupo, considerando o máximo possível à eliminação do viés incorporado pelo executor.

2. Utilizar equipamentos que possibilitem o acréscimo de novos parâmetros clínicos que poderão fornecer informações importantes a respeito da forma de atuação destes medicamentos.
3. Avaliação detalhada do perfil de citocinas nos experimentos onde se testou *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus*.
4. Avaliação detalhada da histopatologia nos experimentos onde se testou *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus*.
5. Avaliação detalhada da contagem neuronal dos segmentos intestinais nos experimentos onde se testou *Lycopodium clavatum* ou *Phosphorus*.

