

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

DENISE LESSA ALEIXO

**Utilização de medicamento homeopático em infecções parasitárias: Modelo  
*Trypanosoma cruzi*.**

MARINGÁ

2012

DENISE LESSA ALEIXO

**Utilização de medicamento homeopático em infecções parasitárias: Modelo  
*Trypanosoma cruzi*.**

Tese 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 Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Silvana Marques de Araújo

**MARINGÁ**

2012  
FOLHA DE APROVAÇÃO

DENISE LESSA ALEIXO

**Utilização de medicamento homeopático em infecções parasitárias: Modelo  
*Trypanosoma cruzi*.**

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

COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Marques de Araújo  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Áurea Regina Telles Pupulin  
Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Carlos Moacir Bonato  
Universidade Estadual de Maringá  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmem Lúcia de Mello Sartori Cardoso da Rocha  
Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo  
Universidade Estadual de Maringá  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin  
Universidade Paulista

Aprovada em: 20 de junho de 2012.

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

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus amores

Emerson, Giovana e Eduardo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me mostrar muitas vezes o caminho a ser seguido.

A todos os meus familiares que tornaram esta caminhada mais suave.

Aos meus pais, Carlos e Neide, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

Ao meu esposo Emerson e meus filhos Giovana e Eduardo pelo amor e compreensão.

Aos meus irmãos Célia e Carlos e a minha sobrinha Melina pela ajuda em todos os momentos solicitados.

À minha orientadora e amiga Silvana Marques de Araújo. Presença fundamental na minha formação profissional. Não existem palavras que expressem minha gratidão.

Às minhas queridas parceiras de laboratório: Camila, Carina, Caroline, Franciele, Paula, Gislaine, Neide, Rafaela e Izabela.

À minha grande parceira de experimentos, Fabiana Nabarro Ferraz, meu agradecimento especial.

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

Às professoras Leoni Villano Bonamin e Marta de Lana, pela participação intelectual e leitura crítica dos manuscritos.

Ao professor David Pereira Neves, por mostrar que sonhos podem ser realizados.

Aos professores Áurea Regina Telles Pupulin e Carlos Moacir Bonato que, como membros da banca de qualificação, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

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

## EPÍGRAFE

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas – que já tem a forma do nosso corpo – e esquecer nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares... É o tempo*

*de travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado sempre a margem de nós mesmos”.*

Fernando Pessoa

Utilização de medicamento homeopático em infecções parasitárias: Modelo *Trypanosoma cruzi*.

## RESUMO

O benznidazol é o único medicamento disponível para o tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. A eficácia deste medicamento na fase crônica da doença é limitada, e efeitos adversos importantes podem comprometer a adesão do paciente ao tratamento. O encontro de novos compostos com ação sobre a infecção ou que otimizem a ação de medicamentos já existentes pode oferecer benefício aos pacientes. A homeopatia vem sendo amplamente utilizada em todo o mundo, e neste sentido, pode se tornar uma alternativa para o tratamento de casos onde a ação do benznidazol é limitada e/ou seus efeitos adversos interferem na continuidade do tratamento. Este estudo é composto de três artigos nos quais abordamos os resultados de experimentos com medicamentos homeopáticos no tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. No primeiro artigo foi realizada uma revisão com discussão crítica sobre os aspectos da homeopatia em doenças parasitárias e infecciosas. Os principais aspectos dos efeitos, o esquema de tratamento e/ou dinamizações utilizadas em diferentes publicações são discutidos. Os bioterápicos constituem a medicação ultradiluída mais utilizada contra parasitoses. Assim, no segundo artigo, foi testado o bioterápico *T. cruzi* 17DH em diferentes esquemas de tratamento em camundongos suíços, infectados pelo parasito. Os resultados mostraram que a administração constante do medicamento resultou em benefícios, com redução de parasitemia, período pré-patente e maior sobrevida. Em um terceiro artigo, foi testado o efeito do benznidazol ultradiluído em diferentes esquemas de tratamento, associado ou não ao benznidazol em dose ponderal, em camundongos suíços infectados pelo parasito. Foi observada diminuição dos efeitos adversos do benznidazol em dose ponderal, com melhora clínica nos animais tratados com o medicamento ultradiluído, administrado quatro dias após ou concomitantemente ao início do tratamento com o medicamento em dose ponderal. Em conjunto os três artigos mostram que a utilização de medicamentos homeopáticos em parasitoses no geral e na infecção pelo *T. cruzi* em particular deve ser melhor explorada.

**Palavras-chave:** medicamento homeopático, infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, tratamento.

## Use of homeopathic medicine in parasitic infections: Model *Trypanosoma cruzi*.

### **ABSTRACT**

The benznidazole is the only drug available for the etiological treatment of Chagas disease in Brazil. The efficacy of this medication in the chronic phase of the disease is limited, and important adverse effects can compromise the patient's compliance to the treatment. The finding of new compounds that either act on the infection or optimize the action of existing medications can offer benefits to patients. Homeopathy has been extensively used worldwide and, in this sense, it may be an alternative treatment since the action of benznidazole is limited and/or its adverse effects interfere in the continuity of the treatment. This study consists of three articles in which we show the results of experiments with homeopathic medications in the treatment of Chagas disease. In the first article we develop a bibliographic review with a critical discussion about some aspects of homeopathy in infectious and parasitic diseases. The main aspects related to the effects, the treatment scheme and/or the dynamization used in the experiments are discussed in various articles. The biotherapies are the most widely used highly diluted medication against parasitoses. The issue tackled in the second article was a trial with the biotherapeutic *T. cruzi* 17DH in different treatment schemes in Swiss mice infected with the parasite. The results show that the constant administration of the medication brought better benefits, with a reduction of parasitaemia and the prepatent period as well as longer survival periods. In the third article we test the effect of benznidazole highly diluted in different treatment schemes, associated or not with benznidazole in a ponderal dose, in Swiss mice infected with the parasite. Results show a reduction of the adverse effects of benznidazole in a ponderal dose, as well as a clinical improvement of the animals treated with the associations of the medication in a ponderal dose and highly diluted. Therefore, three papers altogether show that the use of homeopathic medicines in parasitic infections in general and, particularly, in the infection with *T. cruzi* should be further explored.

**Keywords:** homeopathic medicine, *Trypanosoma cruzi* infection, treatment.



Tese elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *Homeopathy* (artigo 1) disponível em: <[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/623042/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623042/authorinstructions)>, *BMC- Research Notes* (artigo 2) disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/bmcresnotes/authors/instructions>>, e *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (artigo3) disponível em: <<http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescript>

ion.print/681019/gfa\_printerversion?  
avoidEmail=true&printHome=cws\_home>.

## SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I.....	11
1.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	11
1.1.1 Epidemiologia atual.....	11
1.1.2 Formas clínicas.....	12
1.1.3 Tratamento etiológico.....	14
1.1.4 Infecção experimental murina com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	15
1.1.5 Utilização de medicamento homeopático como perspectiva para o tratamento da infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	16
1.3 JUSTIFICATIVA.....	17
1.4 OBJETIVOS.....	18
1.5 REFERÊNCIAS.....	19
2. CAPÍTULO II.....	24
2.1 Artigo 1: Homeopathy in parasitic diseases.....	25
2.2 Artigo 2: Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by <i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> .....	46
2.3 Artigo 3: Benznidazol diluído diminui efeitos adversos em animais infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com benznidazol em dose ponderal.....	62
3 CAPÍTULO III.....	77
4 CONCLUSÕES.....	77
5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78
6 ANEXOS.....	79

## CAPÍTULO I

### 1.1. DOENÇA DE CHAGAS

### 1.1.1. Epidemiologia atual

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é uma enfermidade atual, global e negligenciada<sup>1</sup>. Foi descrita pela primeira vez, em 1909, por Carlos Chagas, médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz<sup>2</sup>, e até os dias atuais é considerada como um sério problema de saúde pública.

A Organização Mundial da Saúde estima que oito milhões de pessoas encontram-se infectadas em todo o mundo, com aproximadamente 11.000 casos de óbito por ano<sup>1,3</sup>. A doença é endêmica na América Latina, em 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<sup>3</sup>. Estima-se também que a mortalidade nestas áreas endêmicas é maior para a doença de Chagas do que para doenças como malária, esquistossomose, filariose e leishmaniose<sup>4</sup>.

Os processos de urbanização na América Latina e os movimentos migratórios têm aumentado o número de casos da doença em áreas não endêmicas, incluindo países do Continente Americano (Canadá e Estados Unidos), Europa (Alemanha, Áustria, Bélgica, Croácia, Dinamarca, Espanha, França, Holanda, Itália, Noruega, Portugal, Reino Unido, Romênia, Suíça, Suécia), assim como regiões a oeste do pacífico (Austrália e Japão). Nestes locais, na ausência do vetor, a infecção se propaga verticalmente, por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos<sup>3</sup>.

O aumento na transmissão da doença nestas regiões envolve novos desafios além dos relacionados à saúde tais como: epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos, tornando a doença de Chagas mais do que uma simples zoonose, um problema de saúde global<sup>5</sup>.

No Brasil, a situação epidemiológica da doença de Chagas foi alterada como resultado das ações de controle e em função de mudanças ambientais, econômicas e sociais<sup>6</sup>. Dados do Ministério da Saúde mostram que, entre 2000 e 2010, foram notificados 1086 casos de doença de Chagas aguda, sendo a maior parte dos casos registrados na região norte do país, nos estados do Pará e do Amazonas<sup>3</sup>.

A transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* foi interrompida e formalmente certificada no Brasil em 2006, pela Organização Pan-Americana da Saúde. 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 vigilância<sup>7</sup>.

De acordo com o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas<sup>1</sup>, à medida que foram sendo controladas as formas de transmissão, até pouco tempo consideradas corriqueiras, como a

vetorial e a transfusional, emergiram ou, se tornaram mais aparentes, mecanismos de transmissão onde a participação do homem poderia ser considerada acidental. Deste modo observamos hoje, que alguns mecanismos de transmissão passaram a ter importância, como a transmissão vetorial extradomiciliar. Ainda, atividades laborais extrativistas, e o consumo de alimentos *in natura*, contaminados pelo protozoário, tem se tornado importante via de transmissão, com número crescente de casos de doença de Chagas aguda, sendo conhecidos, principalmente na região Amazônica. Em especial, a transmissão por via oral, é hoje a forma de transmissão mais importante e prevalente no país. A transmissão congênita, ainda que possível, ocorre em níveis muito baixos, com alguns casos identificados no estado do Rio Grande do Sul<sup>8,6</sup>.

De acordo com estes dados, a doença de Chagas na região Amazônica, vem sendo reconhecida como uma importante antropozoonose emergente. Somente nos anos de 2005 a 2010, dos 703 casos agudos da doença notificados no país, 93,0% ocorreram nos estados que compõem a Amazônia Legal<sup>9</sup>. Nesta região, a epidemiologia da doença envolve uma série de determinantes biológicos e sociais. Fatores biológicos ligados à grande diversidade dos reservatórios silvestres de *T. cruzi*, resultam em intenso ciclo de transmissão silvestre. Fatores sócio-econômicos que envolvem atividades laborais regionais como o extrativismo de fibras de piaçava e consumo de alimentos *in natura*, contaminados durante seu processamento, resulta em transmissão oral com altas cargas parasitárias, que levam a doença aguda grave<sup>6</sup>.

A mais de 100 anos de sua descoberta, a doença de Chagas apresentou avanços em termos de conceitos e aplicações, mas o tratamento e a transformação social não se tornaram prática. Hoje, deve ser considerado, além dos pacientes agudos, o grande contingente de casos de infecção chagásica crônica que ao longo de muitos anos foi sendo acumulado. Diante desta situação epidemiológica, grandes desafios devem ser enfrentados nos procedimentos de vigilância, controle, diagnóstico e tratamento da doença de Chagas<sup>6</sup>.

#### 1.1.2. Formas clínicas.

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda corresponde à fase inicial da doença, de curta duração, com alto parasitismo tecidual e parasitemia patente<sup>10</sup>.

Na maioria dos pacientes, a fase aguda é assintomática ou oligossintomática. Entre os sintomas mais frequentes apresentados pelos pacientes nesta fase da infecção podemos citar febre, sonolência, mialgia, diarreia, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), edema e taquicardia<sup>11,12</sup>. Em alguns casos, pode ocorrer o óbito do paciente devido a complicações diretas da infecção pelo parasito, resultando em

miocardite, meningoencefalite ou ainda, em complicações secundárias tais como broncopneumonia<sup>13</sup>.

Após o estabelecimento da resposta imune específica contra antígenos do parasito, o parasitismo tende a diminuir e a falta de sinais e sintomas clínicos pode tornar a infecção despercebida na maioria dos pacientes. Este fato explica porque na maioria dos casos agudos o prognóstico da doença é benigno, com remissão completa de sinais e sintomas num período de 60 a 90 dias, com ou sem intervenção medicamentosa<sup>11,12</sup>.

Após o término da fase aguda, o paciente passa à fase crônica da infecção. Nesta fase cerca de dois terços dos pacientes apresentam a forma indeterminada da doença, assintomática e sem alterações do eletrocardiograma ou radiografia do tórax, podendo permanecer assim por toda a vida<sup>14,15</sup>.

O outro terço dos indivíduos infectados, na fase crônica da doença, desenvolve complicações cardíacas, digestivas ou mistas. Estas manifestações podem ocorrer anos ou décadas após a infecção inicial, num estágio da doença onde o parasitismo tecidual e sanguíneo é escasso<sup>15</sup>.

O envolvimento cardíaco é a manifestação mais séria e frequente da doença de Chagas crônica, e sua apresentação clínica varia de acordo com a duração da doença e a extensão das lesões cardíacas. A cardiopatia chagásica crônica é um processo inflamatório caracterizado por uma miocardite focal, multifocal ou difusa, com prejuízo da função contrátil do miocárdio. O paciente pode apresentar insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo decorrentes desta patogenia. Aproximadamente 20 a 30% dos pacientes na fase crônica desenvolvem a forma cardíaca, que pode levar a insuficiência cardíaca ou morte súbita em até 70% dos casos de pacientes com cardiomiopatia chagásica<sup>16, 17</sup>.

Do total de pacientes crônicos sintomáticos, cerca de 8 a 10% desenvolvem manifestações digestivas caracterizadas por alterações anatomopatológicas do esôfago e cólon, muitas vezes associadas às manifestações cardíacas. Nestes casos, distúrbios na motilidade do trato digestório podem alterar as funções de secreção e absorção, diminuindo o trânsito e dificultando o esvaziamento do órgão afetado<sup>18,10</sup>.

A evolução da infecção pelo *T. cruzi* não está completamente compreendida, mas sabe-se que a presença do parasito é necessária para o desenvolvimento do processo inflamatório sendo que fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro exercem papel importante no curso da infecção<sup>19</sup>.

A doença de Chagas pode ser uma enfermidade incapacitante e debilitante, com grande impacto econômico e cultural na sociedade. Esta situação, aliada à incidência de transmissão oral por alimentos e transmissão transfusional em países não endêmicos têm sido muito

discutidos. Embora seja considerada uma doença negligenciada, o estudo de novos compostos com ação sobre o *T. cruzi* ainda é um dos principais objetivos das pesquisas atuais<sup>20,21</sup>. Neste sentido, uma das prioridades da pesquisa é o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento.

### 1.1.3. Tratamento etiológico.

O tratamento dos casos crônicos e o aumento no número de casos agudos em algumas regiões ainda é um problema a ser considerado, embora o avanço do controle vetorial, nos países do Cone Sul, tenha diminuído a incidência da doença de Chagas.

A elaboração de um protocolo terapêutico para esta doença data da década de 60, quando pesquisadores mostraram que o tratamento prolongado utilizando nitrofuranos apresentava efetividade na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*<sup>22</sup>. Após vários ensaios clínicos, dois compostos foram propostos para a terapia da doença de Chagas: o nifurtimox e o benznidazol (BZ)<sup>23,24,25</sup>. Após várias décadas, o tratamento etiológico da doença de Chagas ainda conta apenas com estes medicamentos, de efeito parasiticida, para o tratamento de pacientes, e no Brasil, atualmente, apenas o BZ está disponível<sup>1</sup>.

A eficácia do tratamento com BZ está aliada a resposta imunológica do paciente, podendo exercer seu efeito antiparasitário de forma mais ou menos efetiva. A ação do medicamento depende também de fatores que incluem o período de infecção, a dose aplicada, a idade e a origem geográfica do paciente, além da suscetibilidade da cepa do parasito envolvido na infecção<sup>26,27,28</sup>.

Na fase aguda da doença a eficácia deste composto pode ser observada na maioria dos pacientes, mas seu efeito na fase crônica é limitado. O Consenso Brasileiro em doença de Chagas recomenda a utilização do BZ nas fases aguda e crônica recente e na prevenção da infecção congênita pelo *T. cruzi*.

Na fase crônica, existem indicações clínicas para a sua utilização em pacientes cardíacos. Evidências clínicas mostram que o tratamento etiológico pode ser benéfico, evitando, interrompendo ou revertendo a patologia nestes pacientes na forma indeterminada e cardíaca da infecção crônica<sup>29,30,31,32</sup>. Porém, estes achados são contraditórios e outros estudos mostram que pacientes chagásicos crônicos tratados com BZ apresentam parasitemia persistente e alterações progressivas de eletrocardiograma assim como observado nos pacientes que não recebem tratamento algum<sup>29-34</sup>.

A ação do BZ é dose dependente, sendo necessários esquemas de tratamento prolongados para a observação de seu efeito parasiticida. Durante o período de tratamento, o paciente pode apresentar reações adversas medicamentosas (RAM) importantes. Viotti<sup>35</sup> mostrou que estas

reações podem ser observadas em até 50% dos pacientes tratados com BZ, com aproximadamente 18% dos casos culminando em descontinuidade do tratamento, devido ao desconforto observado. As RAM mais frequentemente observadas são a dermatite (20-25% dos pacientes tratados) e as alterações digestivas (5% dos pacientes tratados), que incluem anorexia e perda de peso<sup>28,36,37,38,39</sup>.

Alternativas de tratamento que valorizem o efeito antiparasitário do BZ e reduzam seus efeitos indesejados podem constituir uma esperança no manejo de pacientes com infecção pelo *T. cruzi*.

Atualmente, o aumento do conhecimento sobre a biologia e a genética do parasito tem permitido o desenvolvimento de novas abordagens de quimioterapia específica para a infecção pelo *T. cruzi*<sup>28,31</sup>. Neste sentido, novas propostas terapêuticas têm sido abordadas na literatura, como a utilização de vacinas<sup>40</sup>, imunoterapia utilizando vacinas de DNA<sup>41,42</sup> ou ainda tratamento utilizando células tronco<sup>43</sup>.

Novos quimioterápicos, obtidos de produtos naturais, medicamentos ativos contra outras doenças e compostos químicos originados de síntese têm apresentado bons resultados em estudos preliminares, sendo promissores para o tratamento de pacientes chagásicos. Na busca destes novos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas, destacam-se alguns antifúngicos que atuam na inibição de enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol<sup>44,45,46</sup>.

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

A cepa Y de *T. cruzi* foi isolada por Silva & Nussenzweig<sup>47</sup> de humano. Esta cepa apresenta alta virulência e patogenicidade para camundongos e resistência parcial a quimioterápicos<sup>36</sup>. O curso da infecção por esta cepa, em animais de laboratório, inclui pico de parasitemia alto e precoce, ocorrendo entre o 7º e 8º dia de infecção. A mortalidade dos animais infectados é alta e pode ocorrer entre a 2ª e 3ª semana de infecção para a maioria dos animais. O parasito pode ser mantido em laboratório por sucessivas passagens, em animais, na fase aguda da infecção, sem mostrar alterações de seus parâmetros, que se mantêm estáveis, mesmo após longos períodos de manutenção em camundongos ou cultura acelular, como sugerido por vários autores<sup>48,49</sup>.

Estes aspectos a tornaram uma cepa de referência, sendo provavelmente uma das mais citadas e estudadas na literatura<sup>50</sup>.

Da mesma forma, o modelo murino é amplamente utilizado pela sua suscetibilidade a infecção e fácil manutenção em laboratório. Este modelo conta com um número importante de dados acumulados na literatura que podem contribuir sobremaneira para a pesquisa de

protocolos de tratamento que propõem melhorar a abordagem e manejo terapêutico da infecção pelo *T. cruzi*<sup>51</sup>.

A utilização de camundongos suíços não isogênicos permite o estudo de uma grande variedade de parâmetros que refletem sinais e sintomas que são observados também na infecção humana<sup>52</sup>. Alguns parâmetros clínicos, já estabelecidos em protocolos de pesquisa<sup>53</sup>, permitem diferenciar camundongos infectados ou não pelo *T. cruzi*, além de auxiliar na avaliação de intervenções medicamentosas.

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

Medicamentos homeopáticos, ultradiluídos, ultra moleculares ou sistemas dinamizados, são sinônimos de compostos manipulados segundo a Farmacopéia homeopática por meio de “dinamizações” que são diluições e agitações sucessivas e ritmadas chamadas succussões<sup>54,55</sup>.

A utilização de medicamentos homeopáticos cresce à medida que os medicamentos tradicionais não alcançam os efeitos desejados ou produzem efeitos colaterais que comprometem a adesão ao tratamento. Há mais de 200 anos, em todo o mundo, utiliza-se o medicamento homeopático. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), vem estimulando o uso da Medicina Tradicional/Complementar/Alternativa nos sistemas de saúde de forma integrada com os tratamentos clássicos. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS)”, com o intuito de incentivar e apoiar projetos de assistência, ensino e pesquisas com medicamentos ultradiluídos nas diversas esferas do SUS, juntamente com outras práticas não convencionais<sup>56</sup>.

Vários trabalhos experimentais demonstram a existência de efeitos biológicos do medicamento homeopático, entretanto, tais resultados não minimizam o entrave a sua aceitação científica, que é a incompatibilidade com as bases filosóficas da ciência tradicional<sup>54</sup>.

Pesquisas que envolvam a utilização de medicamentos homeopáticos, em modelos experimentais já estabelecidos podem esclarecer muitas dúvidas sobre estes medicamentos, além de consistir em esperança de tratamento para a infecção pelo *T. cruzi*.

## JUSTIFICATIVA



A doença de Chagas ainda representa um importante problema de Saúde Pública no Brasil, sendo função dos pesquisadores a busca de alternativas de tratamento que visem a cura ou a melhora no prognóstico dos pacientes.

O tratamento convencional para a doença de Chagas, utilizando benznidazol apresenta eficácia limitada na fase crônica da doença além de apresentar efeitos adversos que podem levar a interrupção do tratamento.

A literatura conta com vários estudos que mostram a utilização de medicamentos homeopáticos em infecções parasitárias, inclusive na infecção pelo *T. cruzi*.

Encontrar um medicamento que promova a melhora clínica na infecção pelo *T. cruzi* ou que reduza os efeitos indesejados observados na terapêutica atual pode constituir uma opção de tratamento para esta infecção.

A utilização do medicamento homeopático associado ou não aos modelos terapêuticos já existentes pode ser uma opção para a melhoria de intervenção neste modelo ou em qualquer outro agravo.

Diante deste quadro surgem perguntas: O que a literatura apresenta sobre a utilização de medicamentos ultradiluídos em infecções parasitárias? Existe um medicamento ultradiluído que possa ser efetivo na infecção pelo *T. cruzi*? A utilização de uma associação de medicamento homeopático e alopático (benznidazol) pode ser uma boa opção na tentativa de diminuir os efeitos indesejados do benznidazol? O esquema de tratamento utilizado interfere na resposta do animal infectado ao tratamento com o medicamento homeopático?

Estas e outras questões ainda geram inúmeras dúvidas e discussões e, embora muitos trabalhos mostrem resultados promissores com medicamentos homeopáticos, a utilização de experimentos científicos realizados com rigor metodológico pode contribuir para este conhecimento.

## OBJETIVOS

1. Realizar um levantamento bibliográfico abordando a utilização do medicamento homeopático no tratamento de infecções parasitárias.
2. Avaliar diferentes esquemas de tratamento utilizando medicamento homeopático em animais infectados pelo *T. cruzi*.
3. Avaliar a ação do medicamento homeopático de *T. cruzi* 17DH na infecção experimental murina pelo *T. cruzi*.
4. Avaliar a ação do medicamento homeopático de benznidazol na diminuição dos efeitos adversos do medicamento benznidazol em dose ponderal em camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

1. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian consensus on Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38, p.7-29, 2005.
2. CHAGAS C.R.J. Nova tripanosomíase 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**, Rio de Janeiro, v.1, p.159-218, 1909.
3. WHO. World Healthy Organization. **Sixty-third World Healthy Assembly**. Chagas disease: control and elimination. 2010.
4. 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.
5. COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, New York, n.465, p. 6-7, 2010.
6. 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.
7. 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.
8. COURA, J.R. Chagas disease: what is needed – A background article. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Óbitos por doença de Chagas Aguda, 2005 a 2010, Brasil, 2011.
10. PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.** v.1, p. 92-100, 2001.
11. DIAS, J.C.P. Acute Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.79, p.85-89, 1984.
12. AMATO-NETO, V.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; AMATO, W.S. Doença de Chagas aguda. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro, Editora da Fundação Oswaldo Cruz. p.323-352, 1997.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M, BELLOTI,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.101-106, 1993.
17. TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, p. 463-491, 2006.
18. RASSI, A.J.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clin. Cardiol.**, v.23, p.883-889, 2000.
19. MACEDO, A.M.; MACHADO, C.; OLIVEIRA, R.; PENA, S. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p.1-12, 2004.
20. 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 of benznidazole. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, n.4, p.1359-1364, 2007.
21. SAN-RODRIGUEZ, C.E.; CONCEPCION, J.L.; PEKERAR, S.; OLDFIELD, E.; URBINA, J.A. Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies. **J. Biol. Chem.** v.282, n.17, p.12377-12387, 2007.
22. 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.
23. HABERKORN, A.; GONNERT, R.; Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. **Arzneimittelforschung.**v.22, n.9, p.1570-1582, 1972.
24. RAAFLAUB, J.; ZIEGLES, W.H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomide benznidazole in man. **Arzneimittelforschung.**v.29, n.10, p. 1611-1614, 1979.
25. 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.

26. CASTRO, S. The Challenge of Chagas Disease Chemotherapy: An update on Drugs Assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, v.53, n.2, p. 83-98, 1993.
27. FABBRO, D.L.; STREIGER, M.L.; ARIAS, E.D.; BIZAI, M.L.; AMICONE, N.A. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.40, n.1, p.1-10, 2007.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitol.** , v.19, n.11, 2003.
32. 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.
33. LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.63, p.111-118, 2000.
34. 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.
35. VIOTTI, R. VIRGLIANO, C.; LOCOCO, B. Side-effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert. Rev. Anti Infect. Ther.** , v.7, p.157-163, 2009.

36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. BHATIA, V.; SINHA, M.; LUXON, B.; GARG, N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. **Infection and Immunity**, v.72, p.6245-6254, 2004.
41. 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.
42. 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.
43. SOARES, M.B.; LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; TAKYIA, C.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DE CARVALHO, A.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **Am. J. of Pathol.**, v.164, p.441-447, 2004.
44. 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.
45. 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. Ciências Farm.** v.41, n.1, p.85-94, 2005.

46. 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.
47. SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin. & Biol.**, São Paulo, v.20, p.191-208, 1953.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. DESQUESNES, M. e LANA, M. Veterinary aspects and experimental studies, In: Telleria, J., Tibayrenc, M., (Eds.), **American Trypanosomiasis Chagas Disease: one hundread year of research**. Elsevier Inc., London, p.277-305, 2010.
52. 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.
53. 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 abril de 2012.
54. 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.
55. FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, Brasil – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 3ª edição, 2011.
56. 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.

## CAPÍTULO II

**Este volume é composto por três artigos:**

**Artigo 1: HOMEOPATHY IN PARASITIC DISEASES**

Enviado para o periódico Homeopathy. ISSN: 1475-4916 Qualis – B2.

Normas de publicação disponíveis em: <[http://www.elsevier.com/wps/find/Journaldescription.cws\\_home/623042/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/Journaldescription.cws_home/623042/authorinstructions)>.

**Artigo 2: HIGHLY DILUTED MEDICATION REDUCES PARASITEMIA AND IMPROVES EXPERIMENTAL INFECTION EVOLUTION BY *Trypanosoma cruzi*.**

Enviado para o periódico BMC Research Notes. ISSN: 1756-0500 Qualis – B2.

Normas de publicação disponíveis em: <<http://www.biomedcentral.com/bmcresnotes/authors/instructions>>.

**Artigo 3: BENZNIDAZOL ALTAMENTE DILUÍDO DIMINUI EFEITOS ADVERSOS EM ANIMAIS INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi* E TRATADOS COM BENZNIDAZOL EM DOSE PONDERAL.**

A ser enviado para o periódico Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. ISSN: 0035-9203 Qualis – B1.

Normas de publicação disponíveis em: <[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.print/681019/gfa\\_printerversion?avoidEmail=true&printHome=cws\\_home](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.print/681019/gfa_printerversion?avoidEmail=true&printHome=cws_home)>.



**Artigo 1: HOMEOPATHY IN PARASITIC DISEASES**

Enviado para o periódico Homeopathy. ISSN: 1475-4916 Qualis – B2.

Normas de publicação disponível em: <[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/623042/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623042/authorinstructions)>.

## HOMEOPATHY IN PARASITIC DISEASES

The use of homeopathic medicines has increased, because traditional medicines sometimes do not produce the desired effects, and also because the side effects might compromise the patient's adherence to the treatment. Several reports have shown the benefits of highly diluted medicine in the treatment of infectious diseases. **Aims:** In this context, this review attempts a critical discussion about aspects of homeopathy and the current status of veterinary experimentation, and the use of highly diluted drugs in infectious and parasitic infections. The main aspects of the effects, treatment regimens and / or dynamizations used in the different models are discussed. **Methodology:** A review of articles published since 2000 in journals indexed in the PubMed and Scielo databases was performed. The keywords used for the search were parasitosis /homeopathy and parasitosis / ultra-diluted, in English and Portuguese. Specialized journals such as Homeopathy, International Journal of High Dilution Research, and Brazilian Homeopathic Journal were also used. The contents of each issue of these journals were examined for articles that addressed the subject "Use of highly diluted medication in parasitic infections." **Results:** Several experimental studies have recently demonstrated the biological effect of highly diluted medications on parasitic infections, with reduction in the number of parasites and better clinical condition in the treated animals. Several articles have problems with methodological descriptions which commits the reproducibility of the experiment. **Conclusions:** Although in recent years, research on homeopathy has clearly developed, both in the implementation of more consistent methodologies and in the description of the data and published methods, improvement are still required in these matters. The acknowledgment of homeopathy depends on the credibility of the groups researching this topic. Precise and detailed descriptions will contribute to advances in the use of homeopathy, so that the wider community can benefit, in practice, from these findings.

**Keywords:** *homeopathy, parasitic infections, CAM (Complementary and Alternative Medicine).*

### 1. BACKGROUND

Homeopathic medicines, ultra-diluted or ultra-molecular compounds, or "dynamized" systems are synonyms of compounds that are manipulated in accordance with the theory of homeopathic pharmacopeia through "dynamizations", which are successive and rhythmic dilutions and agitations ("succussions").

A connection between homeopathic medicines and parasitology has existed since the eighteenth century, when Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843), considered the “father of homeopathy”, self-administered *quina*, a substance used at the time for the treatment of malaria. In this experiment, Hahnemann observed that the symptoms produced by this substance were similar to those produced by malaria. From these observations, Hahnemann established the laws that define homeopathy, whose principles differ from those of conventional medicine: similarity (*similia similibus curentur*), which means that diseases can be treated with substances that produce symptoms that are similar to those caused by the disease itself, using infinitesimally diluted doses, respecting the patient’s individuality and treating him in a systemic way<sup>1</sup>.

This integrated concept refers to the organic homeostasis, which is altered in parasitosis, reflecting an imbalance in the parasite-host relationship, which must be balanced to benefit the host.

The use of homeopathic medicines has increased because either conventional medicines do not have the desired effects, or because their side effects compromise the patient’s adherence to the treatment.

For infectious agents in general, many reports can be found in the literature. According to some authors<sup>2-6</sup>, the clinical use follows the same pattern, including worldwide and national policies to increase their use<sup>7,8</sup>.

In farming and cattle-ranching, the advances have been greater and the utilization of homeopathy is established, with the definition of national policies<sup>9</sup>, which include the use of homeopathic medicines as input in the production of organic systems<sup>10</sup>.

With regard to basic research in parasitology, several experimental models using the development of infections/infestations by parasites have been established. These models are excellent tools to evaluate the efficacy and mechanisms of action of new substances, either used in organic levels or highly diluted.

In this context, the aim of this review is attempt a critical discussion about aspects of homeopathy and the current status of veterinary experimentation, and the use of highly diluted drugs in infectious and parasitic infections. The main aspects of the effects, treatment regimens and / or dynamizations used in the different models are discussed.

## **2. METHODOLOGY**

A review of articles published since 2000 in journals indexed in the PubMed and Scielo databases was performed. Were also searched published works in Annals of Congress. The keywords used for the search were parasitosis /homeopathy and parasitosis / ultra-diluted, in

English and Portuguese language. Specialized journals such as Homeopathy, International Journal of High Dilution Research, and Brazilian Homeopathic Journal were also used. The contents of each issue of these journals were examined for articles that addressed the subject "Use of highly diluted medication in parasitic infections."

The works were divided in tables according to subject: the works in which homeopathic medication were used to treat arthropod infestations; the works in which homeopathic medication were used to treat helminthiasis and the works in which homeopathic medication were used to treat protozoosis. Was further performed a critical discussion about the works searched.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### *Homeopathic Medication*

Conceptually, the literature deals with a variety of medications, including "constitutional medication", "isotherapics", "nosodes", "sarcodes", "organotherapics", prepared according to the Homeopathic Pharmacopoeia<sup>11</sup>, which may contain, or not, a mass concentration of the solute, often exceeding Avogadro's number.

According to the Pharmacopoeia, "homeopathic medicine is any form of pharmaceutical dispensation administered in accordance with the principle of similarity and / or identity, with curative and / or preventive purposes. The homeopathic medicine is obtained by the technique of dynamization and for internal or external use."

The medications that follow the principle of similarity and reproduce all the physical and mental characteristics of the individual are called "constitutional." The constitutional medication of each patient is usually administered in high potency and as a single dose<sup>12</sup>.

The so-called homeopathic medications include the biotherapics, which are prepared from organic products, chemically undefined, such as secretions, excretions, tissues, organs, products of microbial origin and allergens. These preparations may be of pathological origin (nosodes) or non-pathological (sarcodes)<sup>11</sup>. Nosodes and sarcodes are defined as medications produced and administered to any patient; while the isotherapic medications, which follow the same principles, are produced from the patient's own biological material<sup>13</sup>.

Organotherapic medications are also included among the sarcodes, acting on the sick organ through its counterpart, the same healthy organ, diluted and dynamized, reestablishing the balance and correcting the altered functioning<sup>13</sup>.

The use of homeopathic medicines with higher dilutions has its origin in the eighteenth century, when, during his experiments, Hahnemann progressively decreased the concentration

of the active principle in order to minimize the side effects that the substances caused when used according to the therapeutic principle of similitude.

In 1796, Hahnemann reported that human illness occurs in a global and dynamic way, and that the *Simillimum* medication would stimulate the body to react against its own disorders<sup>14</sup>. The effects of different homeopathic substances on the immune system are now well known<sup>15,20</sup>.

Homeopathic medications are dispensed on different scales, which correspond to the proportion between the active ingredient (active principle) and the inert ingredient (solvent), diluted, according to different preparation techniques. On the "centesimal" scale, used by Hahnemann, dilutions are made in the proportion 1:100, i.e., one part of the active ingredient to 99 parts of the inert ingredient, to which 100 succussions are applied. The products resulting from this technique are called dynamizations, which have a number of dilutions that determine the nomenclature of the Hahnemann centesimal scale (1CH, 2CH, 3CH, etc.)<sup>11</sup>.

On the "decimal" scale created by Hering (1800-1880), the dilutions are made at 1:10, i.e., one part of the active ingredient to 9 parts of the inert ingredient, to which 100 succussions are also applied. The products of this scale, called "decimal Hering," are dilutions of different dynamizations, depending on how many times the dilution is repeated (1DH, 2DH, 3DH, etc.)<sup>11</sup>.

In the "fifty-millesimal" method, also described by Hahnemann, the dilutions are made in the proportion of 1:50,000, according to its own method, which differs from the methods used for the decimal or centesimal scales<sup>11</sup>.

In order to analyze these dilutions, we must remember that one mole of any substance contains Avogadro's number,  $6.02254 \times 10^{23}$  molecules, and dilutions beyond 1:10<sup>24</sup> have only a remote chance of containing a single molecule of the original compound. On the centesimal and decimal scales, it is still possible to find molecules of the active ingredient or solute in the first dynamizations. However, from the 12CH and 24DH dynamizations onwards, which represent dilutions of 1:10<sup>24</sup>, those molecules would likely no longer be found. Some studies have attempted to discuss the mechanisms that might be involved in the action of these drugs<sup>21-24</sup>.

Currently, a number of drugs use infinitesimal doses that may or may not exceed the Avogadro constant in their dilutions. Although dilutions above 1:10<sup>24</sup> likely do not contain molecules of the active principle, the current scientific literature provides information about the action of these drugs, particularly on the immune system and on the host's defenses<sup>15,25</sup>.

The debate about which dynamization should be used for a certain individual is as old as homeopathy itself<sup>26</sup>. Some authors consider that the dose in homeopathy is irrelevant, because the therapeutic action of homeopathic medication is given qualitatively and dynamically, as the raw material that originates it is highly diluted<sup>27-29</sup>. From this perspective, for example, five or ten drops of a certain homeopathic medication do not alter the treatment's expected result. The similarity, the choice of dynamization and the definition of the frequency in which it is administered in order to be effectively curative, according to the peculiarities of each patient, are important factors to take into consideration. However, Jahr (1987)<sup>30</sup>, based on personal observation of clinical results, emphasized the importance of the amount of homeopathic medicine prescribed for the effectiveness of the treatment. Experimentally, some studies have shown the importance of the treatment regimen and the medication dynamization used for the therapeutic efficacy, in certain situations<sup>31-33</sup>.

#### *Highly Diluted Medications for the Treatment of Parasitic Diseases*

Several experimental studies have recently demonstrated the biological effect of highly diluted medications on parasitic infections (Tables 1-3). In parallel to these scientific studies, the practical application of homeopathic products in veterinary medicine, especially in cattle-raising, has been recently consolidated. Currently, homeopathic products have been applied worldwide in animal husbandry, because of their benefits in the control of diseases, including endo and ectoparasitosis, as well as in the improvement of the animals' productivity in an environmentally safe way<sup>2,3,34,35</sup>. Similarly, in farming, the use of homeopathic products improves productivity, controlling insects and plagues without causing environmental impacts, contributing to sustainability and environmental protection as a whole<sup>36</sup>.

Table 1 lists articles<sup>37-43</sup> involving the use of homeopathic medication for the treatment of arthropod infestations. In the treatment of cattle infestations by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, the use of biotherapeutic medications has shown interesting results, with a reduction of the size of the parasites and the interruption of biological cycles, followed by a reduction in the number of parasites<sup>37-43</sup>, often exceeding the effects observed in conventional treatment.

Biotherapeutic treatment of cattle infested with larvae of *Dermatobia hominis* has also provided good results, reducing the number of parasites and the size of the lesions, which suggests a balance in the relationship between the parasite and the host during the period of infestation<sup>38,42</sup>. The study showed that neither the dosage of medication, nor the age of the animal seemed to influence the results, in agreement with authors who have reported that the dosage seems to be irrelevant<sup>27,29</sup>, although the frequency of administration is an important factor. The

animals received the medication mixed with food, *ad libitum*, showing that the constant stimulation seemed to give good results.

Aleixo *et al.*<sup>31-33,44</sup>, in experimental studies, observed the same results in mice infected with *Trypanosoma cruzi* in the acute phase, in which groups continually treated with the biotherapeutic for a long period responded better than the groups treated for a shorter period or in a single daily dose, again highlighting the importance of the stimulus frequency.

**Table 1: Use of homeopathic medication to treat arthropod infestations**

PARASITE	MEDICATION* (POTENCY)	ANIMAL MODEL (AGE)	TREATMENT REGIMENS	EFFECT	REFERENCE
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Factor C&MC* Biotherapeutic 12CH (10 <sup>-12</sup> )	bovine (different ages)	400g mixed with the mineral salt <i>ad libitum</i> for 24 months.	↓ number of parasites	Arenales and Coelho, 2002
<i>Dermatobia hominis</i>	Isotherapeutic 12DH (10 <sup>-12</sup> )	bovine (age not provided)	Mixed with the mineral salt ( <i>ad libitum</i> ) for 35 days.	↓ size of lesions Interrupted the life-cycle of the parasite.	Fonseca and Goloubeff, 2006
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Factor C&MC* Biotherapeutic 12CH (10 <sup>-24</sup> )	bovine (360-420 days old)	1.6g/animal/ day mixed with the mineral salt ( <i>ad libitum</i> ).	↓ number of parasites	Silva <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Biotherapeutic 12CH (10 <sup>-24</sup> )	bovine (age not provided)	Mixed with the mineral salt ( <i>ad libitum</i> ) for 6 months.	↓ number of parasites ↓ size of the parasites	Gazim <i>et al.</i> , 2010
	Biotherapeutic 30CH (10 <sup>-60</sup> )		Beginning of treatment – 6 months after Biotherapeutic 12CH on alternate days.		
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Factor C&MC* Biotherapeutic 12CH (10 <sup>-12</sup> )	bovine (age not provided)	5g mixed with the mineral salt <i>ad libitum</i>	↓ number of ectoparasites ↓ number of intestinal parasites ↓ eggs/g of feces	Signoretti <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Biotherapeutic 12DH (10 <sup>-12</sup> )	bovine (age not provided)	2mL mixed with the mineral salt for six months.	↓ number of parasites equivalent or in comparison to the to the conventional treatment.	Deffune and Oliveira, 2011
	Biotherapeutic 12CH (10 <sup>-12</sup> )		Biotherapeutic 12 CH 2mL/ mixed with the mineral salt/ after the use of Biotherapeutic 12DH for 6 months.		
<i>Dermatobia hominis</i>				<i>Boophilus microplus</i> ↓ number of parasites More effective than the conventional treatment.	
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Factor C&MC* Biotherapeutic 12CH (10 <sup>-24</sup> )	bovine (180-240 days old)	20g/ day / pre infection.	↓ number of parasites	Costa Júnior and Furlong, 2011

**Factor C&MC®:** Biotherapeutic complex\*: *Boophilus microplus*, *Amblyomma cajennense*, *Haematobia irritans*, *Musca domestica*, *Bunostomum sp.*, *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*, *Nematodirus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, *Strongyloides sp.*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichuris sp.*, *Eimeria sp.*, *Cysticercus cellulosae*, *Dermatobia hominis*, all in 12cH

Table 2 lists articles<sup>2,4,45-49,52</sup> involving the use of homeopathic medication for the treatment of helminth infections, which is widely used in cattle-raising<sup>4,45-48</sup>. The table also lists experimental studies<sup>39,47</sup>.

In this field, the classical homeopathic medicines are chosen by the "Epidemical Genius" method, in which we identify a set of symptoms shown by a group of sick animals, in order to identify the medications that have effects that are most similar to this manifestation. These cases showed interesting results, where the parasite load remained steady and the symptoms showed remission, leading to the hypothesis of "return to homeostasis," in which a balance in the parasite-host relationship is established<sup>4,39,45-49</sup>.

In these studies, the constant stimulus, obtained by administering the medication mixed with food, seemed to be more important than the dose of medication used. The articles (Table 2) also showed that, for the treatment of helminth infections, the use of biotherapeutic medications followed the same pattern.

**Table 2: Utilization of homeopathic medications in helminthiasis.**

PARASITE	MEDICATION* (POTENCY)	ANIMAL MODEL (AGE)	TREATMENT REGIMENS	EFFECT	REFERENCE
<i>Oesophagostomum sp</i>	<i>Phosphorus</i> 6CH (10 <sup>-12</sup> )	bovine (120-210 days)	Mixed with the mineral salt ( <i>ad libitum</i> ) for 30 days.	↓ number of parasites Clinical improvement	Almeida and Pinto, 2002
<i>Trichinella spirallis</i>	<i>Podophyllum TM Cina</i> 30CH (10 <sup>-60</sup> ) <i>Santonin</i> 30CH (10 <sup>-60</sup> )	murine (age not provided)	60mg/kg/day /animal/ V.O from the 7th day of infection for 120 days.	↓ number of larvae	Sukul <i>et al.</i> , 2005
<i>Oesophagostomum sp</i> <i>Haemonchus contortus</i> <i>Trichostrongylus sp</i> <i>Cooperia spp</i>	Complex: Factor VERM (formule not presented)	ovine (540 days)	Mixed with the mineral salt, 1,6g/day/ animal, <i>ad libitum</i> .	No ↓ eggs/g of feces Not clinically evaluated	Rocha <i>et al.</i> , 2006
Nematodes	Complex: <i>Sulphur</i> 30DH (10 <sup>-30</sup> ) <i>Ferrum phosphoricum</i> 6DH (10 <sup>-6</sup> ) <i>Arsenicum album</i> 6DH (10 <sup>-6</sup> ) <i>Mercurus solubilis</i> 6DH (10 <sup>-6</sup> )	ovine (150 days)	10 drops 2 times a day/ diluted in water administered <i>ad libitum</i> .	No ↓ eggs/g of feces ↓ symptoms of intestinal parasitoses	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2007
<i>Giardia muris</i>	<i>Allium sativum</i> <i>Arsenicum album</i> <i>Carduus marianus</i> (potency not presented)	murine (28 days)	100 drops/L diluted in water administered <i>ad libitum</i> for 50 days.	↓ number of parasites ↓ eggs/g of feces	Silva <i>et al.</i> , 2007a
<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Ferrum phosphoricum</i> 6DH (10 <sup>-6</sup> )	ovine (135 days)	Administered in alternate days for 10 days.	↓ number of larvae Improvement of the biochemical aspects Improvement of the immunological aspects	Zacharias <i>et al.</i> , 2008
	<i>Arsenicum album</i> 6DH (10 <sup>-6</sup> )		Administered in alternate days for 10 days.		
	<i>Calcarea carbonica</i> 12DH (10 <sup>-12</sup> )		Administered after 10 days from the beginning of the treatment, for 10 days (2x/day)		
<i>Oesophagostomum sp</i> <i>Haemonchus contortus</i> <i>Trichostrongylus sp</i>	Complex: Factor VERM (formule not presented)	caprine (365 days)	Mixed with the mineral salt, 1,6g/day /animal, <i>ad libitum</i> , for 18 months.	No ↓ eggs/g of feces Not clinically evaluated	Chagas <i>et al.</i> , 2008
Nematodes	Complex: VERM 100 (formule not presented)	ovine (180-1080 days)	Mixed with the mineral salt 10g/ animal/ day, administered <i>ad libitum</i> .	No ↓ eggs/g of feces ↓ symptoms of intestinal parasitoses	Andrade <i>et al.</i> , 2011

Studies involving protozoan parasites in widely known experimental models have provided clues for understanding the way in which homeopathic medication acts, which is responsible for the observed effects. Table 3 summarizes the results of experiments involving infection by protozoan parasites. In laboratory experiments, before they were infected, mice were treated with a *Toxoplasma gondii* biotherapeutic, prepared in high potencies. This group showed a different evolution, with better clinical condition and a few ocular alterations compared with the control group<sup>50</sup>. In human beings, cases of ocular toxoplasmosis treated with homeopathic medications chosen by repertorization of symptoms showed good results, with an improvement in the visual acuity and in the general condition of the patients<sup>51</sup>. In mice and rats naturally infected with coccidia<sup>52</sup>, the use of a homeopathic complex consisting of *Allium sativum*, *Carduus marianus* and *Arsenicum album* eliminated the infection in the mice, and



decreased the number of cysts eliminated by the rats, although the potency used was not reported.

Studies using an experimental infection of mice by *Trypanosoma cruzi* showed that highly diluted medications affected the host's immune balance. Variables such as frequency of administration, medication potency, the choice of medication, and its combinations are of great importance.

The variables studied are many: parasitemia, mortality, survival time, and hematological and immunological parameters<sup>31,53-56</sup>. A detailed study reported an increase in the index of apoptosis and a decrease in the secretion of TGF- $\beta$  measured in serum collected from the group treated with biotherapeutic medication, compared with the control group<sup>55</sup>.

In models where the experimental conditions are carefully controlled, the conclusions follow the same pattern as those observed in the treatment of farm animals, where, even without completely controlled experimental conditions, the clinical result is promising. In both cases, animals treated in a constant and prolonged way show a better result, compared with those treated for a short period of time, receiving a single daily dose.

**Table 3: The utilization of homeopathic medications in protozoosis.**

PARASITE	MEDICATION* (POTENCY)	ANIMAL MODEL (AGE)	TREATMENT REGIMENS	EFFECT	REFERENCE
<i>Leishmania amazonensis</i>	Complex: Canova*	murine (28 days) <i>in vitro</i>	0.2mL/ gavage Subcutaneous administration for 9 days.	↓macrophages infection index . ↑NO	Pereira <i>et al.</i> ,2005
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 30DH (10 <sup>-30</sup> )	murine (28 days)	Treated 8 days before the infection for 7 days, 50 uL/day.  Treated after the infection 50 uL/day for 7 days.	↑survival rate ↑IgG	Queiroz <i>et al.</i> ,2006
<i>Plasmodium berghei</i>	<i>Eupatorium perfoliatum</i> 30CH (10 <sup>-60</sup> ) <i>Arsenicum album</i> 0/6	murine (42-56 days)	8µL/ 200 µL/ every 24 hours for 9 days through gavage	↓schizogony ↓número de schizonts	Lira-Salazar <i>et al.</i> ,2006
<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Crotalus horridus</i> 200CH (10 <sup>-400</sup> )	canine (age not mentioned)	4 pills/ 4x days/ 14 days/ V.O.	↓number of parasites Clinical improvement Improvement of the haematological parameters	Chaudhuri and Varshney, 2007
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Complex: Canova*	murine (28 days)	0.2mL/ day/ 20 days/ gavage	Change in the genetic profile (RAPD) when used in association with Benznidazol	Aleixo <i>et al.</i> ,2008
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Phosphorus</i> 12DH (10 <sup>-12</sup> )	murine (adult)	Administered 3 drops (0,6mL)/ day/ V.O. with a dropper. Treated for 20 days after the infection.	↑PP ↑maximum peak of parasites ↑survival rate	Almeida <i>et al.</i> ,2008
	<i>Biotherapeutic</i> 12DH (10 <sup>-12</sup> )		Administered 3 drops (0,6mL)/ day/ V.O. with a dropper. Treated before the infection for 20 days, with an interval of 10 days. Treated after the infection for 20 days.	↓PP ↓ maximum peak of parasites ↓mortality rate.	
<i>Trypanoso evansi</i>	Complex: CH Coxvit*	murine (60 days)	100drops/ L diluted in water, 30 days before inoculation.  100drops/ L diluted in water from the inoculation onwards.  100 crops/ L diluted in water 20 days after the inoculation.	↑survival rate  ↑ survival rate  There wasn't ↑ survival rate nor a difference in the PP	Silva <i>et al.</i> ,2009
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Biotherapeutic</i> 17DH (10 <sup>-17</sup> )	murine (28 days)  murine (56 days)	0,2mL/ for 20 days through gavage .	parasitaemia and the peak of parasites similar among the treated and control groups  ↑parasitaemia ↑peak of parasites	Sandri <i>et al.</i> ,2009
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Biotherapeutic</i> 7DH(10 <sup>-7</sup> )  <i>Biotherapeutic</i> 17DH (10 <sup>-17</sup> )  <i>Biotherapeutic</i> 12CH (10 <sup>-24</sup> )	murine (28 days)	0,2mL/ for 20 days after infection/ gavage	Similar parasitaemia among the treated and control groups  ↑peak of parasites  ↑parasitaemia	Ferraz <i>et al.</i> ,2009
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Biotherapeutic</i> 7DH (10 <sup>-7</sup> )	murine (28 days)	0,2mL/30 days pré infection/ V.O.	↑PPP ↑peak of parasites ↑ survival rates ↓red blood cell	Billoti <i>et al.</i> ,2009
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Biotherapeutic</i> 17DH (10 <sup>-17</sup> )	murine (28 days)	0.2mL/animal/gava-ge from the 4th day of infection onwards.	↑tissue parasitism and areas of inflammation in the liver similar to the control group.	Sandri <i>et al.</i> ,2010

		murine (56 days)		↓ tissue parasitism and areas of inflammation in the liver.	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 7DH ( $10^{-7}$ )	murine (28 days)	Treatment 3 days before and 3 days after the infection: 10µL/mL administered in water <i>ad libitum</i> .	Better performance of the treatment administered before and after infection with: ↓ parasitaemia ↓ PP ↑ survival rate	Ferraz <i>et al.</i> , 2010
			Treatment 3 days before the infection: 10µL/mL administered in water <i>ad libitum</i> .		
			Treatment 3 days before and after the infection for a long period: 10µL/mL administered in water <i>ad libitum</i>		
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Complex: Canova*	murine (28 days)	0.2mL/ animal/ day/ gavage/ 20 days.	Early mortality ↑ peak of parasites Change in the tissue tropism.	Pupulim <i>et al.</i> , 2010
<i>Toxoplasma gondii</i>	Biotherapeutic 7DH ( $10^{-7}$ )	murine (57-59 days)	Treatment pré infection: 0,1mL/4x day, after 2x/day/ 3 days.	↑ number of brain cysts ↑ ocular alterations ↓ ocular pressure	Braga <i>et al.</i> , 2011b
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 7DH ( $10^{-7}$ )	murine (28 days)	10µL/mL administered in water <i>ad libitum</i> for 20 days after infection.	↓ the area under the parasitemia curve, ↓ parasitemia peak and ↓ total parasitaemia of the infected mice without ↓ mortality rate or ↑ survival period. Only for the group treated 7 days before the infection.	Ferraz <i>et al.</i> , 2011a
			10µL/mL administered in water <i>ad libitum</i> for 7 days before the infection.		
			10µL/mL administered in water <i>ad libitum</i> for 30 days before the infection.		
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 15DH ( $10^{-15}$ )	murine (28 days)	Treatment 3 days before and 3 days after the infection: 10µL/mL administered in water <i>ad libitum</i> . For all groups.	↓ parasitaemia ↓ PP  ↓ mortality rate ↓ parasitaemia ↓ PP  ↓ mortality rate ↓ parasitaemia ↓ PP  ↓ mortality rate	Ferraz <i>et al.</i> , 2011b
	Biotherapeutic 16DH ( $10^{-32}$ )				
	Biotherapeutic 17DH ( $10^{-34}$ )				
	Biotherapeutic Chord: 15DH ( $10^{-15}$ ), 16DH ( $10^{-16}$ ) e 17DH ( $10^{-17}$ )				
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 17DH ( $10^{-17}$ )	murine (28 days)	0.2mL/animal/gava-ge D.U. for 3 days.	↓ mortality rate Clinical improvement in the animals treated for longer periods.	Aleixo <i>et al.</i> , 2011a
			10µL/ mL administered in water <i>ad libitum</i> for 20 days		
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 200DH ( $10^{-200}$ )	murine (28 days)	For all groups: 10µL/ mL administered in water <i>ad libitum</i> for 24 hours	↓ age ↑ parasitaemia (the older has the higher parasitaemia level) ↑ period of treatment ↓ parasitaemia. (the longer the period of treatment, the lower the parasitaemia level)	Aleixo <i>et al.</i> , 2011c
		murine (38 days)	1µL/ mL administered in water <i>ad libitum</i> for long periods		
		murine (56 days)			
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 17DH ( $10^{-17}$ )	murine (28 days)	0.2mL/animal/gava-ge/ 3 days from the 4th day of infection onwards.	↑ apoptosis liver cells.	Sandri <i>et al.</i> , 2011a

<i>Trypanosoma cruzi</i>	Biotherapeutic 17DH (10 <sup>-17</sup> )	murine (28 days)	0.2mL/animal/gava-ge D.U.  10µL/ mL administered in water <i>ad libitum</i>	↓ parasitaemia ↓ mortality rate	Sandri <i>et al.</i> ,2011b
<i>Toxoplasma gondii</i>	Biotherapeutic 200DH (10 <sup>-200</sup> )	murine (56 days)	0.1mL/animal/ D.U day/gavage for 3 days after the infection.	↓ tissue parasitism.	Braga <i>et al.</i> ,2011a
<i>Toxoplasma gondii</i>	Biotherapeutic 200DH (10 <sup>-200</sup> )	murine (56 days)	0.1mL/animal/ D.U day/gavage for 3 days after the infection	↓ brain parasitism	Ferreira <i>et al.</i> ,2011

**Canova®**\*: *Thuya occidentalis* 19DH *Bryonia alba* 18DH, *Aconitum napellus* 11DH, *Arsenicum album* 19DH, *Lachesis muta* 18DH.

**CH Coxvit®**\*: *Allium sativum*, *Carduus marianus*, *Arsenicum album*. (dynamizations not presented)

### Publications and Experimental Design

Accurate methodological description of studies that involve the use of highly diluted medications is an important factor for the credibility, reproducibility of results and the understanding of these medications' action in homeopathic treatment. Factors such as the lack of a blinded design and appropriate statistical analysis may compromise the credibility of these studies. Also, the use of inappropriate control groups may call certain results into question<sup>57</sup>. Several authors<sup>25,57,58</sup> have identified problems with published research using highly diluted medications. In modern research, the reproducibility of the experiments is an essential criterion. In basic research, using highly diluted medications is a challenge<sup>25</sup>. The authors must present their techniques, methods and evaluation of data as completely and in as much detail as possible, so that readers can understand and reproduce these experiments<sup>58</sup>.

A number of criteria have been developed to report basic research on homeopathy<sup>58</sup>, in order to aid authors in planning their experiments and presenting their results, emphasizing the need for methodological rigor in the analysis of data using statistical methods.

Table 4 presents the characteristics of the articles<sup>32,44,53-56,58-71</sup> reviewed here. It can be seen that the methodology of the articles surveyed did not meet the requirements listed in the REHBaR<sup>73</sup>. Several authors have conducted clinical trials using commercial formulas, which do not always provide their composition and/or dynamization, making it difficult for other researchers to reproduce the experiment. The use of commercial formulas in clinical research is extremely valuable, provided that the minimum criteria for methodological description are followed. If we take into consideration that personal communications included in some articles reported that the experiments were repeated at least twice, in some of the articles, this information was not mentioned in the methodology, and is one aspect that should be improved<sup>55</sup>.

In homeopathy, the effect of the medications is still controversial, and the experimental parameters for evaluation must be carefully chosen to avoid isolated analyses of results, considering the animal body as a whole.

Precision and completeness in the description of the methods used allow different laboratories to reproduce the experiments, contributing to the improvement of the debate on the effects of highly diluted medications.

The evolution in the methodology and in its description has occurred naturally, requiring researchers to adapt to it. A clear example of this trend is the papers published in a special issue of the journal Homeopathic Research of the François Lamasson Institute of Homeopathy (IHFL)<sup>74</sup>, dedicated to studies related to infection by *Trypanosoma cruzi* (1994). This issue contains interesting data, but under current standards regarding methodologies and their description, this information cannot be accepted as soundly based from a scientific perspective.

Although in recent years, research on homeopathy has clearly developed, both in the implementation of more consistent methodologies and in the description of the data and published methods, improvement is still required in these matters. The acknowledgment of homeopathy depends on the credibility of the groups researching this topic. Credibility is achieved by the use of generally accepted research methods, as well as by the presentation of these methods and results according to a minimum standard of accuracy and clarity, which initially can be illustrated by the references already mentioned<sup>25</sup>.

**Table 4: Summary of characteristics of articles reviewed.**

COMMENTS	ARTICLES	
There is no information about experiment repetitions.	Almeida & Pinto, 2002; Arenales & Coelho, 2002; Sukul <i>et al.</i> , 2005; Rocha <i>et al.</i> , 2005; Pereira <i>et al.</i> , 2005; Lira-Salazar 2006; Fonseca & Goloubeff, 2006; Queiroz <i>et al.</i> , 2006; Cavalcanti <i>et al.</i> , 2007; Silva <i>et al.</i> , 2007a	Silva <i>et al.</i> , 2008; Zacharias <i>et al.</i> , 2008; Aleixo <i>et al.</i> , 2008; Almeida <i>et al.</i> , 2008; Billotti <i>et al.</i> , 2009; Ferraz <i>et al.</i> , 2009; Silva <i>et al.</i> , 2009; Sandri <i>et al.</i> , 2009; Signoretti <i>et al.</i> , 2010; Pupulin <i>et al.</i> , 2010; Gazim <i>et al.</i> , 2010; Ferraz <i>et al.</i> , 2010; Sandri <i>et al.</i> , 2010; Aleixo <i>et al.</i> , 2011a;
No replication	Pereira <i>et al.</i> , 2005; Lira-Salazar 2006; Fonseca & Goloubeff, 2006; Queiroz <i>et al.</i> , 2006; Cavalcanti <i>et al.</i> , 2007; Silva <i>et al.</i> , 2007a	Signoretti <i>et al.</i> , 2010; Pupulin <i>et al.</i> , 2010; Gazim <i>et al.</i> , 2010; Ferraz <i>et al.</i> , 2010; Sandri <i>et al.</i> , 2010; Aleixo <i>et al.</i> , 2011a;
The articles do not accurately inform the type of tests (blinding, randomisation, blocking, stratification)	Almeida & Pinto, 2002; Arenales & Coelho, 2002; Sukul <i>et al.</i> , 2005; Rocha <i>et al.</i> , 2005; Pereira <i>et al.</i> , 2005; Lira-Salazar 2006; Fonseca & Goloubeff, 2006; Queiroz <i>et al.</i> , 2006;	Chaudhuri & Varshney, 2007; Chagas <i>et al.</i> , 2008; Zacharias <i>et al.</i> , 2008; Aleixo <i>et al.</i> , 2008; Almeida <i>et al.</i> , 2008; Silva <i>et al.</i> , 2008; Ferraz <i>et al.</i> , 2009; Silva <i>et al.</i> , 2009;
There is no explanation about the treatment, nor the medication components, or the potencies used, including commercial formulae.	Almeida & Pinto, 2002; Arenales & Coelho, 2002; Sukul <i>et al.</i> , 2005; Rocha <i>et al.</i> , 2005; Chaudhuri & Varshney, 2007;	Chagas <i>et al.</i> , 2008; Silva <i>et al.</i> , 2009; Signoretti <i>et al.</i> , 2010; Andrade <i>et al.</i> , 2011; Costa-Júnior & Furlong, 2011; Deffune & Oliveira, 2011.
No information about statistical analysis.	Almeida & Pinto, 2002; Deffune & Oliveira, 2011.	
Unclear methodology	Almeida & Pinto, 2002; Deffune & Oliveira, 2011.	

**REHBaR** Reporting experiments in homeopathic basic research (Stock-Schroer *et al.*, 2009).

#### 4. CONCLUSION

Although in recent years, research on homeopathy has clearly developed, both in the implementation of more consistent methodologies and in the description of the data and published methods, improvement are still required in these matters. The acknowledgment of homeopathy depends on the credibility of the groups researching this topic.

In parallel with the tireless search for methodologies that reveal the mechanisms of action of homeopathic remedies, several research groups using the technology are presenting experiments carried out with scientific rigor, demonstrating the actual effects of homeopathic remedies. The use of a common language may allow a rapprochement between the concepts of conventional medicine and homeopathy. More specifically regarding the use of homeopathic preparations in the treatment of parasitic diseases, it is concluded that although important experimental results are observed, there is still a need for better description of the methods, used to allow these results to be reproduced. Precise and detailed descriptions will contribute to advances in the use of homeopathy, so that the wider community can benefit, in practice, from these findings.

## REFERENCES

1. HAHNEMANN, S. Doenças crônicas. São Paulo: GEHSP “Benedito Mure”, 202p. 1835.
2. GODOI F; HASTENPLUG M; BALBÉ TAF; ESTIVALET JÚNIOR CNO; GOUVEA A. Manejo sanitário do rebanho leiteiro na região sudeste do Paraná. *Synergismus scyentifica UTFPR*, Pato Branco, 01 (1): 1-778; 2006.
3. ALMEIDA LR; SILVA FS; FONSECA AH; SOARES JPG; LUCKE I. Tratamento homeopático da infestação por *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr, 1781) (*Diptera: Cuterebridae*) em bovinos sob manejo orgânico. *Comunicado Técnico EMBRAPA*, Seropédica, RJ; 2007.
4. CAVALCANTI, A. S. R.; ALMEIDA, M. A. O.; DIAS, A. V. S Efeito de medicamentos homeopáticos no número de ovos de nematódeos nas fezes (OPG) e no gado de peso em ovinos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 8(3):162 -169, 2007.
5. JACOBS J; FERNANDEZ E A; MERIZALDE B; AVILA-MORAES G A; CROTHERS D. The use of Homeopathy. *Homeopathy*. 96; 22 – 26; 2007.
6. BRACHO G; VARELA E; FERNANDEZ R; ORDAZ B; MARZOA N; MENENDEZ J; GARCIA L; GILLING E; LEYVA R; RUFEN R; TORRE R; SOLIS R L; BATISTA N; BORRERO R; CAMPA C. Large-scale application of highly-diluted bacteria for Leptospirosis epidemic control. *Homeopathy*. 99; 156 -166; 2010.
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005. Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int). Acesso em: 01 dez. 2002.
8. 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.
9. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 1. Saúde animal. 2. Legislação. I. Secretaria de Defesa Agropecuária. II. Departamento de Saúde Animal. III. Título: Programas nacionais de saúde animal do Brasil. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 7, de 17 de março de 2004, (ANEXO III), 440p. 2009.
10. BONATO, CM. Homeopatia na Agricultura. In: I Encontro Brasileiro de Homeopatia na Agricultura, 2009. Disponível em: [http://www.cesaho.com.br/Bibliotecavirtual/arquivos/arquivo\\_406\\_cesaho.pdf](http://www.cesaho.com.br/Bibliotecavirtual/arquivos/arquivo_406_cesaho.pdf).
11. FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, Brasil – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 3ª edição, 2011.
12. CAMPEBELL, A. The concept of constitution in homeopathy. *Homeopathy*, 100(1-2): 79-82. 2011.

13. ALDANA, C.M.F. Nosodes, Isopaticos Y Sarcodes. “ El Simila Etiológico” Homeopatia? *In: Anais do Congresso Nacional de Medicina Homeopatica XXVII Asambles General*, México, 2006.
14. [TEIXEIRA, M.Z. Possíveis contribuições do modelo homeopático á humanização da formação médica. \*Revista Brasileira de Educação Médica\*. 33\(3\):454-463. 2009.](#)
15. BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE,V.; ORTOLANI, R. Immunology and Homeopathy. 1. Historical Background. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2(4):441-452, 2005.
16. BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE,V.; ORTOLANI, R. Immunology and Homeopathy. 2. Cells of the Immune System and Inflammation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(1):13-24. 2006a.
17. BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE,V.; ORTOLANI,R. Immunology and Homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(2): 171-186. 2006b.
18. BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE,V.; ORTOLANI,R. Immunology and Homeopathy. 4. Clinical Studies – Part 1. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(3): 293-301. 2006c.
19. BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE,V.; ORTOLANI,R. Immunology and Homeopathy. 4. Clinical Studies – Part 1. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(4): 397-409. 2006d.
20. BELLAVITE, P.; CONFORTI, A.; PIASERE,V.; ORTOLANI,R. Immunology and Homeopathy. 5. The Rationale of the ‘Simile’. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(2):149-163. 2007.
21. ELIA V; NAPOLI E; GERMANOS R. The “Memory of Water”: an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely diluted aqueous solutions. *Homeopathy*, 96; 163-9. 2007.
22. BONAMIN, LV. *Signals and Images: Contributions and Contradictions about High Dilution Research*. New York: Springer, 2008.
23. BELLAVITE P. Le Prove di Efficacia dell’Omeopatia. In Corso ECM. I fondamenti teorici, la metodologia di applicazione clinica, il meccanismo d’azione e le prove di eficácia dela medicina homeopática. Edizioni Tecniche Nuove, Milano, 2010.
24. BELLAVITE P. Il medicinale homeopático. In Corso ECM. I fondamenti teorici, la metodologia di applicazione clinica, il meccanismo d’azione e le prove di eficácia dela medicina homeopática. Edizioni Tecniche Nuove, Milano, 2010b.



25. ENDLER, P.C.; THIEVES,K.; REICH, R.; MATTHIESSEN, P.F.; BONAMIN,L.; SCHERR, C.; BAUMGARTNER,S. Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10e-23: a bibliometric study. *Homeopathy* 99: 25-36, 2010.
26. FONTES, O.L. Farmácia Homeopática: Teoria e Prática. São Paulo. Ed Manole. 2005.
27. KOSSAK-ROMANACH, A. Homeopatia em 1000 conceitos. São Paulo: Elcid, 1984.
28. EIZAYAGA, F.X. Tratado de medicina homeopática, 3ªed. Buenos Aires. Ed Marecel 1992.
29. ORTEGA, P. S. Introducción a la medicina homeopática: teoria y técnica. México, D.F., 1994.
30. JAHR, G. H. G. Princípios e regras que devem guiar a prática da homeopatia. Rio de Janeiro: Grupo de Estudos James Tyler Kent, 1987.
31. ALEIXO DL; PUPULIN ART; FERRAZ FN; FALKOWSKI GJS; GOMES ML; ARAUJO SM. Bioterápico: diferentes esquemas de tratamento produzem efeitos diversos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO SUL AMERICANO DE FARMÁCIA, 2010, Maringá. *Anais do I Congresso Sul Americano de Farmácia* , Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010.
32. ALEIXO,D.L.; FERREIRA,E.C.; BRAGA,C.F.; LOPES,C.R.; FALKOWSKI, G.J.S.; SANDRI,P.F.; ARAÚJO, S. M. Biotherapeutic *T. cruzi* 17DH when continuously used clinically improves mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of High Dilution Research*; 10(36):134-137. 2011a.
33. ALEIXO,D.L.; FERREIRA,E.C.; BRAGA, C.F.; BRUSTOLIN,C.F.; GOMES,M.L.; PUPULIN,A.R.T.; ARAÚJO, S.M. Higher frequency of administration of biotherapeutic *T. cruzi* 17DH decreases parasitemia and increases survival in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of High Dilution Research*; 10(36):163-166. 2011b.
34. SOTO, FRM; VUADEN, ER; COELHO, CP; BONAMIN, LV; AZEVEDO, SS; BENITES, NR. Efeito da *Avena sativa* CH6 no metabolismo do sêmen diluído de suínos. *Veterinária e Zootecnia*. 16(2): 367-372. 2009.
35. SOTO, FRM; VUADEN, ER; COELHO, CP; BONAMIN, LV; AZEVEDO, SS; BENITES, NR; BARROS, FRO; GOISSIS, MD; ASSUMPÇÃO, MEO; VISITIN, JÁ; MARQUES, MG. Effects of the utilization of homeopathic elements in comercial diluente on swine sperm viability. *In Vitro Cell Development Biology. – Animal* . 47:205-209. 2011.

36. ROSSI F. Fundamentos da Agrohomeopatia. In: I Encontro Brasileiro de Homeopatia na Agricultura. Campo Grande, MS. *Anais do I Encontro Brasileiro de Homeopatia na Agricultura*. 2009.
37. ARENALES, M. C.; COELHO, E.N. Controle Complementar De Carrapatos (*Boophilus microplus*) em Gado Leiteiro (*Bostaurus*) - Holandês (Puro E Cruzado) com a administração do produto homeopático - FATOR C&MCc , na fazenda da "EPAMIG". Brasil. Anais da I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte. 2002.
38. FONSECA, I.G.; GOLOUBEFF, B. Homeopathic Control of *Dermatobia hominis* in milk cattle. *International Journal of High Dilution Research* 5(16). 2006.
- 39.. SILVA, N.L.; MOLETTA, J.L.; MINHO, A.P.; FILIPPSEN, L.F. Use of biotherapeutic in the control of natural infestation by *Boophilus microplus*: pilot study *International Journal of High Dilution Research* 7(22): 36-38. 2008.
40. GAZIM, Z.C.; FERREIRA, F.B.P.; SILVA, A.V.; BOLOGNESE, K.C.; MERLINI, E.; MESSA, V.; JESUS, R.A.; COUTINHO, C.A.; SILVA, L.C.M. Efficiency of tick biotherapeutic on the control of infestation by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Dutch dairy cows. *International Journal of High Dilution Research* 9(33):156-164. 2010.
41. SIGNORETTI, R.D. ; VERÍSSIMO, C.J.; SOUZA, F.H.M.; OLIVEIRA, E.M. DIB, V. Aspectos produtivos e sanitários de vacas mestiças leiteiras tratadas com produtos homeopáticos. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 77(4):625-633. 2010.
42. DEFFUNE, G.; OLIVEIRA, W.C. Sistemas Orgânicos versus Convencionais no Controle de Ectoparasitas em Bovinocultura Leiteira Sustentável. Disponível em: [www.mda.gov.br/o/893437](http://www.mda.gov.br/o/893437). Acesso em: 05 dez, 2011.
43. COSTA - JÚNIOR, L.M. and FURLON, J. Efficiency of sulphur in garlic extract and non-sulphur homeopathy in the control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Medical and Veterinary Entomology* 25:7–11. 2011.
44. ALEIXO, D.L.; BRAGA, C. F.; MOREIRA, N.M.; MASSINI, P.F.; BRUSTOLIN, C.F.; FERRAZ, F.N.; ARAÚJO, S.M. Influence of age and ways of treatment in the parasitemia in mice infected with *Trypanosoma cruzi* treated with high potency biotherapy. *International Journal of High Dilution Research* 10(36):138-141. 2011c.
45. ALMEIDA, B.M; PINTO, L.F. Homeopathic treatment of Oesofagostomosis in Beef in State of Mato Grosso – Brazil. *Homeopat. Bras.*, 8(1):5-8. 2002.
46. ROCHA, R.A.; PACHECO, R.D.L.; AMARANTE, A.F.T. Efficacy of homeopathic treatment against natural infection of sheep by gastrointestinal nematodes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 15(1):23-27. 2006.

47. ZACHARIAS, F.; GUIMARÃES, J.E.; ARAÚJO, R.R.; ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C.; BAVIA, M.E.; MENDONÇA-LIMA, F.W. Effect of homeopathic medicines on helminth parasitism and resistance of *Haemonchus contortus* infected sheep. *Homeopathy*. 97:145–151. 2008.
48. ANDRADE, G.M., MOURA, M.S. e BARBOSA, F.C. Eficácia do produto homeopático Verm 100 no controle da verminose ovina: resultados parciais. *PUBVET*, 5(8). 2011.
49. SUKUL, N.C.; GHOSH, S.; SINHABABU, S.P. Reduction in the number of infective *Trichinella spiralis* Larvae in Mice by use of Homeopathic drugs. *Research in Complementary and Classical Natural Medicine*. 12(4). 2005.
50. BRAGA, CF; GUILHERME ALF; ALEIXO DL; FALKOWSKI GJS; GOIS MB; MOREIRA NM; ARAUJO SM. Screening de potências de Bioterápico de *Toxoplasma gondii* em camundongos tratados pré infecção. In: CONGRESSO SUL AMERICANO DE FARMÁCIA, 2010, Maringá. *Anais do I Congresso Sul Americano de Farmácia*, Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010.
51. MALAGUTTI CE; FREIRE MTA; SALGADO WO; MURAYAMA AG; SALGADO AC; LOBÃO AO. Toxoplasmose: Recuperação da visão pela Homeopatia (descrição de dois casos clínicos), 2008. Disponível em: <<http://www.cesaho.com.br/>>. Acesso em: 01 dez 2010.
52. SILVA, A.S.; FACCIO, L.; OTTO, M.A.; RIPOLI, F.L.; MONTEIRO, S.G.; SHAROM, A. Homeopatia no tratamento de camundongos (*Mus musculus*) naturalmente infectados por *Giardia muris*. *Caderno de Pesquisa série Biologia* 20(1): 15-21. 2007a.
53. ALMEIDA,L.R.; CAMPOS, M.C.O.; HERRERA, H.M.; BONAMIN, L.V.; FONSECA, A.H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Homeopathy*; 97 (2): 57-8; 2008.
54. FERRAZ FN; ALEIXO DL; ARAUJOP SM; GONÇALVES VA. Avaliação preliminar do efeito de bioterápico 7dH em diferentes esquemas terapêuticos sobre a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO SUL AMERICANO DE FARMÁCIA, 2010, Maringá. *Anais do I Congresso Sul Americano de Farmácia* , Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010.
55. 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* 10(36):110-114. 2011a.
56. SANDRI, P.F.; FALKOWSKI, G.J.S.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.D.; SPACK, M.; MOREIRA, N.M.; TOLEDO, M.J.O.; ABREU FILHO,B.; GABRIEL,M.; ARAÚJO, S.M.

- Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17x controlled histopathological alterations in mice infected by this protozoon. *International Journal of High Dilution Research* 10(36): 119-124. 2011b.
57. BONAMIN, LV and ENDLER PC. Animal model of studying homeopathy and high dilutions. *Homeopathy*, 99:37-50. 2010.
58. PEREIRA, W.K.V.; LONARDONI, M.V.C./ GRESPAN,R.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.;CUMAN,R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Infection* 51:157–164. 2005.
59. LIRA-SALAZAR, G.; MARINES-MONTIEL L.; TORRES MONZÓN J.; HERNANDÉZ- HERNANDÉZ F.; SALAS-BENITO J.S. Effects of homeopathic medications *Eupatorium perfoliatum* and *Arsenicum album* on parasitemia of *Plasmodium berghei*-infected mice. *Homeopathy*, 95(4):223-8. 2006.
60. CHAUDHURI,S.AND VARSHNEY, J.P. Clinical management of babesiosis in dogs with homeopathic *Crotalus horridus* 200C *Homeopathy*. 96:90–94. 2007.
61. ALEIXO,D.L.; FERRAZ,F.N.; MELO,C.S.; GOMES M.L.; TOLEDO,M.J.; KANESHIMA, E.N.; BERSANI-AMADO,C.A. ARAÚJO,S.M. Changes of RAPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole. *Homeopathy* 97:59–64. 2008.
62. SILVA, A.S.; OLIVEIRA, C.B.; ZANETTE, R.A.; MONTEIRO, I.G. Homeopathy in the control of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected rats. *Estudos em Biologia*. 31(73/74/75):123-7. 2009.
63. SANDRI, P; MARTINS, N; NASCIMENTO JÚNIOR, A. D.; SPACK, M; GOMES, M. L.; Toledo M. J. O.; ARAÚJO, S. M. Influência da idade sobre o efeito de um bioterápico em infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Homeopathic Journal*, 11(1):7 – 8. 2009.
64. FERRAZ, F. N.; SANDRI, P.; ALEIXO, D. L.; NASCIMENTO JR., A. D.; SPACK, M.; GOMES, M. L.; TOLEDO, M. J. O.; ARAÚJO, S. M. O efeito de diferentes potências de bioterápico de *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental. *Brazilian Homeopathic Journal*, 11(1):5 – 6. 2009.
65. BILLOTTI, C.; FERRAZ, F. N.; NASCIMENTO JÚNIOR, A. D.; SPACK, M.; PANZA, S.; ALVARES, A. A.A.; GOMES, M. L.; TOLEDO, M. J. O. ; MARTINICHEN, J. C.; ARAÚJO, S. M. Parâmetros hematológicos em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com bioterápicos. *Brazilian Homeopathic Journal*, 11(1):9 – 10. 2009.

66. SANDRI PF. *Influência da idade sobre os efeitos do bioterápico 17 dH na infecção de camundongos pelo Trypanosoma cruzi*. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada a Farmácia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2010.
67. [PUPULIN, A.R.](#); [ARAÚJO, S. M.](#); [TOLEDO, M.J.](#); [GOMES M.L.](#); [TAKEJIMA, E.](#); [CUMAN, R.K.](#); [BERSANI-AMADO, C.A.](#) Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*; 126(4):435-40. 2010.
68. BRAGA, C. F.; DROZINO, R. N.; MOREIRA, N. M.; ALEIXO, D. L.; ARAÚJO, S. M. Effect of 7DH biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* in mice infected with the protozoan. *International Journal of High Dilution Research* 10(36):147-151. 2011b.
69. FERRAZ, F. N.; GONÇALVES, V. A.; 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*. *International Journal of High Dilution Research*; 10(36):125-127. 2011a.
70. FERRAZ, F. N.; GONÇALVES, V. A.; ALEIXO, D. L.; MIZUTANI, A.S.; ARAÚJO S. M. Evaluation of biotherapies *T.cruzi* 15x, 16x, 17x and “potency chords” in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of High Dilution Research* 10(36):130-133. 2011b.
71. BRAGA, C.F.; FALKOWSKI, G.J.S.; MOREIRA, N. M.; ALEIXO, D. L.; ARAÚJO, S.M. Biotherapeutic 200 DH reduces cerebral parasitism in mice infected with *Toxoplasma gondii* *International Journal of High Dilution Research* 10(36):158-162. 2011a.
72. FERREIRA, E.C.; BRAGA, C.F.; MASSINI, P.F.; DROZINO, R.N.; MOREIRA, N.M.; ALEIXO, D.L.; GUILHERME, A.L.F.; ARAÚJO, S.M. Homeopathy: statistical significance versus the sample size in experiments with *Toxoplasma gondii*. *International Journal of High Dilution Research* 10(36):115-118. 2011.
73. STOCK-SCHRÖER, B; ALBRECHT, H; BETTI, L; ENDLER, PC; LINDE, K; LÜDTKE, R; MUSIAL, F; WIJK, R; WITT, C; BAUMGARTNER, S. Reporting experiments in homeopathic basic research (REHBaR) – A detailed guideline for authors. *Homeopathy*. 98:287-298. 2009.
74. PESQUISA HOMEOPÁTICA: HOMEOPATIA ESPLORADO. Brasil: Instituto Homeopático François Lamasson. 9(1): 1-25. 1994.

**Artigo 2: HIGHLY DILUTED MEDICATION REDUCES PARASITEMIA AND IMPROVES EXPERIMENTAL INFECTION EVOLUTION BY *Trypanosoma cruzi*.**

Enviado para o periódico BMC Research Notes. ISSN: 1756-0500 Qualis – B2.

Normas de publicação disponíveis em: <<http://www.biomedcentral.com/bmcresnotes/authors/instructions>>.

## Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*.

### Abstract

**Background:** There is no published information about the use of different protocols to administer a highly diluted medication.

**Aim:** Evaluate the effect of different protocols for treatment with biotherapeutic *T. cruzi* 17 dH (BIOT<sub>Tc17dH</sub>) on clinical/parasitological evolution of mice infected with *T. cruzi*-Y strain.

**Methods:** A blind, randomized controlled trial was performed twice, using 60 28-day-old male Swiss mice infected with *T. cruzi*-Y strain, in five treatment groups: CI - treated with a 7% ethanol-water solution, diluted in water (10 µL/mL) *ad libitum*; BIOT<sub>PI</sub> - treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> in water (10 µL/mL) *ad libitum* during a period that started on the day of infection; BIOT<sub>4DI</sub> - treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> in water (10 µL/mL) *ad libitum* beginning on the 4<sup>th</sup> day of infection; BIOT<sub>4-5-6</sub> - treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> by gavage (0.2 mL/ animal/day) on the 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> days after infection; BIOT<sub>7-8-9</sub> - treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> by gavage (0.2 mL/ animal/day) on the 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days after infection. We evaluated: parasitemia; total parasitemia (P<sub>total</sub>); maximum peak of parasites; prepatent period (PPP) - time from infection to detection of the parasite in blood; patent period (PP) - period when the parasitemia can be detected in blood; clinical aspects; and mortality.

**Results:** Parasitological parameters in the BIOT<sub>PI</sub> and mainly in the BIOT<sub>4PI</sub> group showed better evolution of the infection compared to the control group (CI), with lower P<sub>total</sub>, lower maximum peak of parasites, higher PPP, lower PP and longer survival times. These animals showed stable body temperature and higher weight gain and water consumption, with more animals having normal-appearing fur for longer periods. In contrast, groups BIOT<sub>4-5-6</sub> and BIOT<sub>7-8-9</sub> showed worse evolution of the infection compared to the control group, considering both parasitological and clinical parameters. The correlation analysis combined with the other data from this study indicated that the prepatent period is the best parameter to evaluate the effect of a medication in this model.

**Conclusions:** The BIOT<sub>4DI</sub> group showed the best clinical and parasitological evolution, with lower parasitemia and a trend toward lower mortality and a longer survival period. The prepatent period was the best parameter to evaluate the effect of a medication in this model.

**Keywords:** Biotherapy; Mice infection; Parasitological evaluation, Clinical evaluation, Prepatent Period.

## Background

The use of highly diluted medications in the treatment of parasitic diseases has been investigated, but the available information does not allow us to demonstrate details of their effects. One of the hypotheses regarding the therapeutic effect of these drugs is that they modulate the immune system, and understanding the dynamics of this effect depends on the recognition of the information systems involved [1,2]. Bellavite *et al.* (2007) [3] suggested that homeopathic medicine can regulate inflammatory and immunopathological processes as well as the neuroendocrine network and peripheral receptors. Specifically in mice infected with *T. cruzi*, one study reported an increase in the apoptosis rate and a decrease in the secretion of TGF- $\beta$  measured in serum collected from the group treated with biotherapeutic medication, compared with the control group [4].

Although several studies have attempted to explain the clinical results of highly diluted medications, few trials have evaluated the effect of different treatment schemes with these drugs on living organisms [5-7].

Biotherapeutics are highly diluted medications prepared according to homeopathic techniques [8] from biological products, including the etiological agent itself [9]. Although experience in clinical practice using biotherapeutics cannot be ignored, academic research on biotherapeutics has been questioned [10].

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, has been studied for more than a century. However, no effective drug for etiological treatment has been discovered so far [11].

*T. cruzi*-Y is considered a reference strain [12]. Extensively studied in experimental murine models, it shows well-defined characteristics such as high parasitemia, peak of parasites by the 12<sup>th</sup> day of infection, death of all untreated infected animals, and partial resistance to drugs classically used in the treatment of human Chagas disease. Therefore, the murine model is an excellent experimental model for the evaluation of drug interventions [13].

According to the literature, morbidity is related to the presence of the parasite [14,15], and pathogenesis increase is the result of a disruption of the host-parasite relationship [16]. Therefore, using biotherapeutics as an intervention in murine infection with *T. cruzi* is a possible means to understand the effect of these highly diluted medications and to find new candidates to treat Chagas disease.

The present study evaluated *in vivo* the effect of different treatment schemes using the biotherapeutic *Trypanosoma cruzi* 17dH (BIOT<sub>Tc17dH</sub>) in an experimental infection by this protozoan.



## Results and discussion:

As far as we are aware, this is the first study to compare different treatment schemes using a biotherapeutic *T. cruzi* in murine infection by the protozoan. Evaluation of parasitological and clinical parameters showed that the different treatment schemes using this medicine produced different profiles in the evolution of the infection of the Y strain of *T. cruzi* in Swiss mice.

### Parasitological parameters:

The mean and standard deviation of the parasitological parameters for each group are shown in Tables 1 and 2. The evolution of parasitemia in groups of animals treated with biotherapeutics diluted in water *ad libitum* for a long period (BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub>) showed better evolution of the infection compared to the control group (CI).

Compared to the control group, animals treated with BIOT<sub>PI</sub> and mainly BIOT<sub>4PI</sub> showed lower values of area under the curve of daily parasitemia (BIOT<sub>PI</sub>  $p < 0.01$  and BIOT<sub>4PI</sub>  $p < 0.01$ ), lower total parasitemia (BIOT<sub>PI</sub>  $p < 0.01$  and BIOT<sub>4PI</sub>  $p < 0.01$ ), and lower maximum peaks of parasites (BIOT<sub>PI</sub>  $p < 0.01$  and BIOT<sub>4PI</sub>  $p < 0.01$ ) (Table 1). There was no statistical difference in parasitemia on the 8<sup>th</sup> day of infection and in the 2<sup>nd</sup> peak of parasites for the BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub> groups compared to the control, as well as in the percentage of animals that showed the 2<sup>nd</sup> maximum peak of parasites. This second peak occurred earlier in BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub> than in the control group.

**Table 1**

**Parasitological parameters of animals subjected to different treatment schemes using biotherapeutic (BIOT<sub>Tc17dH</sub>).**

GROUP	AUC (x10 <sup>5</sup> )	P <sub>total</sub> (x10 <sup>6</sup> )	P <sub>max</sub> (x10 <sup>6</sup> )	DAY OF P <sub>max</sub>	P <sub>8thDI</sub> (x10 <sup>6</sup> )	2 <sup>nd</sup> P <sub>max</sub> (x10 <sup>4</sup> )	DAY OF 2 <sup>nd</sup> PEAK	2 <sup>nd</sup> PEAK n/N (%)
CI	10.9±8.20	12.5±8.98	5.02±7.07	10.76±3.15	2.82±3.12	11.0±10.2	14.03±2.63	8/12 (66%)
BIOT <sub>4-5-6</sub>	9.23±3.26	9.33±3.25	5.82±2.14**	8.25±0.67**	5.11±2.62	2.10±17.4	12.0±2.0*	4/12 (33%)
BIOT <sub>7-8-9</sub>	8.78±2.34	9.32±2.48	4.05±2.42	8.64±0.71**	3.96±2.51	17.4±0	14.25±1.02	8/12 (66%)
BIOT <sub>PI</sub>	5.95±4.55**	6.63±5.02**	2.25±1.65**	15.46±23.06	1.62±1.69	11.1±13.6	13.67±0.63*	6/12 (50%)
BIOT <sub>4PI</sub>	4.28±2.89**	4.63±3.19**	1.45±1.00**	10.27±2.03	1.01±0.96	7.09±10.2	12.8±0.68*	6/12 (50%)

Statistical significance ( $p < 0.05^*$  and  $p < 0.01^{**}$ ) compared to control group: CI: control group – infected animals treated with 7% ethanol-water solution diluted in water (10µL/mL) offered ad libitum; BIOT<sub>PI</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water (10µL/mL) offered ad libitum from the day of the infection until the death of the animals; BIOT<sub>4PI</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water (10µL/mL) offered ad libitum from the 4<sup>th</sup> day of the infection until the death of the animals; BIOT<sub>4-5-6</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc17dH</sub> by gavage on the 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> day of the infection; BIOT<sub>7-8-9</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc17dH</sub> by gavage on the 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> day of the infection. AUC = area under the curve (parasites/mL); P<sub>total</sub> = total parasitemia (parasites/mL); P<sub>max</sub> = maximum peak of parasites (parasites/mL); Day of P<sub>max</sub> = Day of maximum peak of parasites; P<sub>8thDI</sub> = number of tripomastigotes on 8<sup>th</sup> day of infection (parasites/mL); 2<sup>nd</sup> P<sub>max</sub> = number of tripomastigotes in the 2<sup>nd</sup> peak of parasites (parasites/mL); Day of 2<sup>nd</sup> P<sub>max</sub> = Day of 2<sup>nd</sup> peak of parasites; 2<sup>nd</sup>PEAK n/N = number of animals that showed 2<sup>nd</sup> peak of parasites (n)/ total number of infected animals (N) x 100.

Considering the parameters shown in Table 2, compared to the control group, the BIOT<sub>PI</sub> and mainly BIOT<sub>4PI</sub> groups showed longer prepatent periods (BIOT<sub>4PI</sub>  $p < 0.01$  and BIOT<sub>PI</sub>  $p = 0.13$ ) and shorter patent periods (BIOT<sub>PI</sub>  $p < 0.01$  and BIOT<sub>4PI</sub>  $p < 0.01$ ), longer survival times, significant for the BIOT<sub>4PI</sub> group ( $p < 0.01$ ) and a lower (although not significantly lower) mortality. Together, these results show a better outcome of the infection, since the parasitemia in infection by *T. cruzi* is directly proportional to morbidity [17].

**Table 2 Prepatent period (PPP), patent period (PP), survival and percent mortality of animals subjected to different treatment schemes using biotherapeutic (BIOT<sub>Tc17dH</sub>).**

GROUP	PPP (days)	PP (days)	SURVIVAL (days)	DEATH n/N (%)
CI	6.02±1.85	9.63±2.74	15.33±3.39	12/12 (100%)
BIOT <sub>4-5-6</sub>	3.86±1.36*	7.43±1.99*	12.14±1.25*	12/12 (100%)
BIOT <sub>7-8-9</sub>	4.38±1.32*	8.88±1.62	14±1.5	12/12 (100%)
BIOT <sub>PI</sub>	13.67±33.11	6.61±2.69**	29±42.79	10/12 (83%)
BIOT <sub>4PI</sub>	21.5±42.87**	5.78±1.03**	27.1±40.98**	11/12 (92%)

Statistical significance ( $p < 0.05^*$  and  $p < 0.01^{**}$ ) compared to control group: CI: control group – infected animals treated with 7% ethanol-water solution diluted in water (10 $\mu$ L/mL) offered ad libitum; BIOT<sub>PI</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water (10 $\mu$ L/mL) offered ad libitum from the day of the infection until the death of the animals; BIOT<sub>4PI</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc 17dH</sub> diluted in water (10 $\mu$ L/mL) offered ad libitum from the 4<sup>th</sup> day of the infection until the death of the animals; BIOT<sub>4-5-6</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc 17dH</sub> by gavage on the 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> day of the infection; BIOT<sub>7-8-9</sub>: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc 17dH</sub> by gavage on the 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> day of the infection.

In contrast, the BIOT<sub>4-5-6</sub> and BIOT<sub>7-8-9</sub> groups showed a worse evolution of the infection compared to the control group. The area under the curve of daily parasitemia in these groups did not differ from the value observed for the control group ( $p = 0.99$ ), and similarly for total parasitemia ( $p = 0.99$ ). The BIOT<sub>4-5-6</sub> and BIOT<sub>7-8-9</sub> groups showed a higher maximum peak of parasites, significantly higher in the BIOT<sub>4-5-6</sub> group, as well as a significant advancement of this maximum peak ( $p < 0.01$ ). There was no significant difference in the parasitemia peak on the 8<sup>th</sup> day of infection, the parasitemia of the 2<sup>nd</sup> peak of parasites, nor in the percentage of animals that showed the 2<sup>nd</sup> peak for the BIOT<sub>4-5-6</sub> and BIOT<sub>7-8-9</sub> groups compared to the control group. The prepatent period and survival was lower for these groups compared to the control. Mortality was 100% of the animals, as also observed for the control (Table 2).

Considering the 12 parameters shown in Tables 1 and 2, the BIOT<sub>4PI</sub> group showed the best overall performance.

In this study, the data obtained for the animals treated with highly diluted medications in the more appropriate treatment schemes (BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub>) showed better results than those observed in the control group. Notably, in the BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub> groups (which showed better evolution of the infection) there was a significant individual variation observed among the animals of the same group, as shown by the standard deviations (Tables 1 and 2). This individual variation was also observed in the control group.

These data suggest that some animals naturally evolve with lower parasitemia levels, while other animals evolve with higher parasitemia levels. The more-appropriate treatment schemes using highly diluted medications seemed to favor those animals with a tendency to develop lower parasitemia levels. This phenomenon may have led to the result in which the treatment of the BIOT<sub>4PI</sub> or BIOT<sub>PI</sub> groups produced a decrease in the parasitemia levels and a tendency to a lower mortality level with a longer survival period. This contrasts with the study by Sandri *et al.* (2010) [18], where a different treatment scheme was used in the same experimental conditions.

*Clinical parameters:*

The groups of animals that were given the medication (BIOT<sub>Tc17dH</sub>) in water *ad libitum* for a long period showed better clinical evolution, with a stable body temperature ( $p < 0.05$ ), higher weight gain ( $p < 0.01$ ) and higher water consumption ( $p < 0.05$ ) compared to the control group. The groups treated for a long period (BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub>) contained more animals with 'normal-looking' fur for longer periods during the study, and the BIOT<sub>4PI</sub> group showed the best results of all. In the BIOT<sub>4-5-6</sub> and BIOT<sub>7-8-9</sub> groups, more animals showed bristling hair, with a similar evolution to the control group (CI).

In murine *T. cruzi* infection, the morbidity is linked to parasitemia [17]. However, the host-parasite relationship is essential for the manifestation of the disease, which appears more lethal when the balance of this relationship is jeopardized.

The functional recovery of complex biological systems occurs in an integrated manner (considering the psycho-neuro-immuno-endocrine-metabolic axis), and sometimes the imbalance of one part is necessary to maintain the balance as a whole, with the appearance of new signs and/or exacerbating old symptoms or manifestations [19].

In this context, the host immune response causes many symptoms of the infection [20,21], and may help to explain the discrepancy between virulence and parasite loads [22,23], suggesting new prospects for the advancement of these studies.

*Survival evaluation:*

Three animals survived in the groups that were given the medication (BIOT<sub>Tc17dH</sub>) in water *ad libitum* for a long period. Of these three survivors, two were from the BIOT<sub>PI</sub> group, and only one of them had patent parasitemia. The other had negative PCR (Polymerase Chain Reaction) [24], understood as a protective action of the drug, since the treatment began at the time of the infection. Considering that the *T. cruzi*-Y strain shows 100% infectivity and mortality in Swiss mice [12,25-27] this result shows a patent benefit of the medication.

The surviving animal in the BIOT<sub>4PI</sub> group, although it showed a positive PCR diagnosis, never showed patent parasitemia. This result is consistent with low levels of parasitemia and provides information about the benefit of the treatment scheme used, since survival in the murine model is directly related to parasitemia levels [27].

The better evolution of the infection, considering both parasitological and clinical parameters in BIOT<sub>PI</sub> and mainly in BIOT<sub>4PI</sub> is expressed by the delayed onset of mortality (16<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> day of infection, respectively) as well as the lower mortality compared to the control group. The survival of 3 animals for more than 360 days, with a mean and standard deviation of  $27.1 \pm 40.98$  ( $p < 0.01$ ) and  $29.0 \pm 42.79$  ( $p > 0.05$ ) for the BIOT<sub>4PI</sub> and BIOT<sub>PI</sub> groups (Table 2), respectively, suggests an improved prognosis in a pathogenesis process that shows an irreversible evolution [28].

*Correlation analysis:*

The correlation analysis indicates the relationship between two variables within a group. The relationships between each clinical or parasitological parameter (variable) and survival for the groups CI, BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub> were evaluated separately. This relation is expressed by a number called correlation coefficient ('r'), which can be significant or not. Their values range from +1 to -1, and its size indicates the force of correlation. Correlations up to 0.299 were considered weak, values from 0.300 – 0.499 were considered intermediate, and strong from 0.500 – 0.999. The sign indicates the direction, if the correlation is positive (direct) or negative (inverse).

Considering that in this model, the evolution of the disease is irreversible, culminating in the death of the animals, an increase in the survival period is an indicator of a good treatment scheme. Some clinical and / or parasitological parameters may be more or less related to this increase in survival. The correlation analysis may indicate which are the more important parameters that could be measured. Therefore, we evaluated the correlations between the parasitological/clinical parameters and survival periods for the control group (CI) and the groups treated with the biotherapeutic (BIOT<sub>Tc17dH</sub>) in the treatment schemes that improved the clinical and parasitological evolution (BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub>) (Table 3).

**Table 3 Values of correlation ('r') of parasitological and clinical parameters with survival of animals subjected to different treatment schemes using biotherapeutic (BIOT<sub>Tc17dH</sub>).**

PARAMETERS	'r' FOR CORRELATION	
	CI	BIOTPI
AUC	(-)0.2250	(-)0.1980
P <sub>total</sub>	(-)0.3220	(-)0.4387
P <sub>max</sub>	(-)0.2989	(-)0.3182
Day P <sub>max</sub>	NS	NS
PPP	(+)0.4825	(+)0.6704
PP	(+)0.7901	(-)0.7000
T <sup>a</sup>	NS	NS
WEIGHT	NS	NS
WATER	NS	NS

NS = no significant correlation. 'r' values are presented for significant correlations ( $p < 0.05$ ) between survival and the parameters: AUC = area under the curve (parasites/mL); P<sub>total</sub> = total parasitemia (parasites/ mL); P<sub>max</sub> = maximum peak of parasites (parasites/ mL); Day of P<sub>max</sub>- Day of maximum peak of parasites; PPP = Prepatent period; PP = patent T<sup>a</sup> = Temperature; Weight and Water. Groups: CI: control group – infected animals treated with 7% ethanol-water solution diluted in water (10 $\mu$ L/mL) offered ad libitum; BIOTPI: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water (10 $\mu$ L/mL) offered ad libitum from the day of the infection until the death of the animals; BIOT4PI: infected animals treated with biotherapeutic BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water (10 $\mu$ L/mL) offered ad libitum from the 4<sup>th</sup> day of the infection until the death of the animals.

The prepatent period (PPP), patent period (PP) and total parasitemia (P<sub>total</sub>) showed moderate to strong correlations with the survival period for all groups. For shorter survival periods, the groups showed higher total parasitemia (P<sub>total</sub>). In groups treated for a long period, the P<sub>total</sub> was lower and showed increasing 'r' values (BIOT<sub>4PI</sub> > BIOT<sub>PI</sub> > CI).

The prepatent period (PPP) was best correlated with the survival period. The BIOT<sub>4PI</sub> group showed a strong and positive correlation ( $r = 0.9995$ ), indicating that the survival was closely linked to an increase in the prepatent period (PPP). In the different groups, this parameter

clearly reflected the differences in performance under the different treatments, showing increasing 'r' values for the BIOT<sub>4PI</sub>, BIOT<sub>PI</sub> and CI groups. This result, combined with the set of data obtained in this study, indicated that the PPP was the best parameter to evaluate an intervention in this model.

This finding is important considering that in protocols with highly diluted substances, researchers tend to evaluate an excessive number of parameters in an attempt to include the key change that shows a benefit, since benefits may be perceived but cannot always be measured. In the experimental protocol used in this study, the risk of contamination and the workload involved need to be optimized, and it is imperative to select parameters that show the best effects most clearly.

The other parameters evaluated showed weak correlations with survival, although they also showed peculiarities in the comparison among the experimental groups. The maximum peak of parasites ( $P_{max}$ ) was inversely correlated with the survival period; the relationship was moderate for the CI and BIOT<sub>PI</sub> groups and strong for the BIOT<sub>4PI</sub> group. These results concord with those for the treatment schemes that began after the fourth day of infection, and again indicate the importance of the treatment scheme in determining the degree of morbidity from the infection.

The correlation between the peak day and the survival period had a particular result: the correlation was strong and direct in the CI group, showing that the later the peak of parasites, the longer is the survival time. In the groups treated with the biotherapeutic, the correlation was strong, but negative, with a higher 'r' value for the group that performed best in this study (BIOT<sub>4PI</sub> > BIOT<sub>PI</sub>).

This fact is consistent with what we have observed in previous studies: the biotherapeutic medications seem to anticipate several important biological phenomena in the course of experimental infection with *T. cruzi* [29]. The high standard deviation observed for this parameter in the BIOT<sub>4PI</sub>, BIOT<sub>PI</sub> and CI groups indicates the individuality of behavior for this parameter (Table 2). Sandri *et al.* (2010) [18] has also observed this behavior individuality in both the treated and control group and found out that the animals that were more resistant to infection had a higher sensitivity to the treatment. In the case of Sandri *et al.* (2010) [18] the treatment scheme was inadequate and resulted in increased parasitemia.

These results show that some parameters can work as 'markers' of the performance of an intervention in the infection model used in this study, clearly reflecting the evolution of infection and these parameters can be prioritized in the experimental design, minimizing the work of researchers.

Although in this study in mice, the clinical parameters of temperature, weight and water consumption, as measured, were not effective to clarify the best therapeutic scheme

using BIOT<sub>Tc17dH</sub>, the researcher perceive the difference among the groups. Find better methods to evaluate these parameters is an important perspective.

Considering the groups of animals treated for long periods, the BIOT<sub>4PI</sub> group presented a better performance with an intermediate correlation between weight and survival. These data, besides reflecting more accurately what was observed in the clinical evaluations, also supports a good prognosis for animals treated with this scheme.

*Further discussions:*

The differences observed when comparing the evolution of infection in the groups treated for a long period in water (BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub>), and for a short period of time by gavage (BIOT<sub>4-5-6</sub> and BIOT<sub>7-8-9</sub>) show a better balance for animals treated for longer periods in water. The discussion of these results can also be based on the fact that the medication administered in water for a long period, besides enabling a higher number of stimuli, also causes less stress to the animal compared to the treatment by gavage, for a short period of time. Also in relation to medication administration, diluted in water, the difference in the intake among the animals, although it may be criticized, According to some authors, the concept of medication dose as the amount of medication that a patient must take to modify his state of illness is not applicable to highly diluted medications, because they do not act based on their mass, but rather by their dynamic effect (qualitative), which continues for a shorter or longer period according to the power of reaction or sensitivity of the organism and the stage of the disease [22-23].

Our data concord with the findings of other investigators that the use of highly diluted medications in the acute phase of infection requires a higher frequency of administered doses [23]. In a randomized controlled experiment, the benefit of the treatment using highly diluted medication continuously and for long periods of time, without interruption of the stimulus, promotes balance in acute infections [23].

Considering that the stimulation provided by the highly diluted medication is related to its ability to affect the psycho-neuro-immune-endocrine-metabolic axis, stress may also be a destabilizing factor that should be considered in evaluating the results [15].

*T. cruzi* is an obligate intracellular parasite and its interaction with the host cells is complex, and inflammation is a decisive component of the pathogenesis. In developing resistance to *T. cruzi*, the immune system can act through different routes that function more or less effectively, depending on the conditions imposed by the host-parasite relationship [17].

Sandri *et al.* (2011) [30] demonstrated modulation of the inflammation process in eight-week-old animals infected with *T. cruzi* and treated with a biotherapeutic, with a higher rate of apoptosis and reduced production of the cytokine transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ).

In the present study, assuming that the highly diluted medication BIOT<sub>Tc17dH</sub> modulated the host immune system, the finding that the best therapeutic result was achieved with the

medication administered beginning after 4 days of infection and for long periods (BIOT<sub>4PI</sub>) is consistent with the following hypothesis: In this scheme, the host's immune system, already activated by the parasite and affected by the highly diluted medication, leads the infection to evolve less aggressively, as described by Sandri *et al.* (2011) [30].

### **Conclusion**

The BIOT<sub>4DI</sub> group showed the best clinical and parasitological evolution, with lower parasitemia and a trend toward lower mortality with longer periods of survival. The PPP (prepatent period = time in days from the infection until the first parasite was detected in the blood) proved to be the best parameter to evaluate the effect of a medication in this model.

### **Material and methods:**

*Animals and infection:* The study involved 60, 28-day-old male Swiss mice from the Central Animal Facility of the Universidade Estadual de Maringá. The animals were infected intraperitoneally with 1,400 blood trypomastigotes of *T. cruzi*-Y strain [12].

*Groups according to treatment:* The animals were divided equally into five groups according to the treatment: CI - infected animals treated with 7% ethanol-water solution diluted in water (10 µL/mL) offered *ad libitum* in an amber bottle; BIOT<sub>PI</sub> -infected animals treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water (10 µL/mL) offered *ad libitum* in an amber bottle during a period that started on the day of infection and finished when the animals died; BIOT<sub>4DI</sub> - infected animals treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water (10 µL/mL) offered *ad libitum* in an amber bottle from the 4<sup>th</sup> day of infection to the death of the animals; BIOT<sub>4-5-6</sub> - infected animals treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> administered by gavage (0.2 mL / animal / day) on the 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> days after infection; BIOT<sub>7-8-9</sub> - infected animals treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> administered by gavage (0.2 mL / animal / day) on the 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days after infection.

The different treatment schemes were based on the effect of medication linked to the immunological effect [3,18] and on the specific evolution of *T. cruzi*-Y strain in Swiss mice [12,27]. Thus, BIOT<sub>PI</sub> and BIOT<sub>4PI</sub> simulated a situation where the medication is offered when the immunological system is not in contact with the parasite, and a situation where the medication is offered when the immunological system is already in contact with the parasite, respectively. In BIOT<sub>4-5-6</sub> and BIOT<sub>7-8-9</sub>, the medication was offered to animals just prior to the parasite peak and exactly coincident with the parasite peak, respectively [12,27].

*Experimental design:* The experiment was performed twice as a blind randomized controlled trial. The animals were divided into separate cages so that the mean initial weights of mice in each group were statistically equal. The animals were kept in a climate-controlled vivarium, under controlled temperature (22.7 ± 1.2°C), light/dark cycles of 12 hours, and water and food offered *ad libitum*.

*Biotherapeutic T. cruzi 17 dH (BIOT<sub>Tc17dH</sub>):* The highly diluted medication was produced from the buffy coat of blood collected from the orbital plexus of three mice, containing blood trypomastigotes on the 7th day of infection with *T. cruzi* Y-strain. The BIOT<sub>Tc17dH</sub> was prepared by adding 0.9 mL of *T. cruzi* concentrate ( $4.1 \times 10^7$  trypomastigotes /mL) in 9.1 mL of distilled water in a 30-mL glass bottle. Subsequently, dilutions were made in a 70% ethanol-water solution until the 16dH dynamization. The dynamization used, 17dH (corresponding to a dilution of  $1:10^{17}$  of the initial suspension) was prepared with 7% ethanol-water solution. [8] The microbiological test and the biological risk *in vivo* were negative, according to the regulations of the Brazilian Ministry of Health (RDC No. 67) [31], and the drug was stored in amber glass for better conservation.

*Parameters analyzed:* Parasitological and clinical parameters were evaluated. Parasitemia was evaluated by daily counts of blood trypomastigotes from the day of infection, using the technique of Brener (1962) [32]. For animals that showed negative parasitemia, blood was collected for PCR diagnosis (Polymerase Chain Reaction) [24].

Using the parasitemia curve, the following data were obtained: prepatent period (PPP), which is the time from infection to detection of the parasite in blood; patent period (PP), the period when the parasitemia can be detected; and total parasitemia ( $P_{total}$ ), calculated as the sum of the mean daily parasitemia levels for each mouse in each group. The area under the curve (AUC), defined as the number of parasites/ mL of blood observed at a certain time of infection, was calculated using the software Prism Graph 5. The peak of maximum parasitemia ( $P_{max}$ ), considered the mean of the highest level of parasitemia observed in each animal throughout the experiment, parasitemia on the 8<sup>th</sup> day of infection, the 2<sup>nd</sup> peak of parasites, and the percentage of occurrence of this 2<sup>nd</sup> peak of parasites. The parasitemia was expressed in parasites/ mL and the occurrence of this 2<sup>nd</sup> peak was expressed by the percentage of animals that showed a peak (n) within a group (N). The day on which these peaks occurred was also considered. Mortality was computed during the course of the experiment, resulting in the following parameters: days of survival and percentage of mortality expressed by the number of animals died (n) within a group (N). The animals were clinically evaluated on alternate days from the day of infection until the end of the treatment for body temperature, water consumption, fur appearance, and body weight [33].

*Statistical analysis:* The results were compared statistically using the program Statistica 7.0, and the Kruskal-Wallis test (ANOVA followed by multiple comparisons of mean ranks for all groups) was used since the analyzed parameters did not all show a normal distribution. The correlations were analyzed using the R.2.10 program. Correlations with 'r' value up to 0.299 were considered weak, from 0.300 – 0.499 as intermediate, and from 0.500 – 0.999 as strong. The acceptable level of significance was 5% for all analyses.



*Ethics:* The experiment was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at the Universidade Estadual de Maringá (UEM), under protocol number 030/2008.

### **List of abbreviations:**

BIOT<sub>Tc17dH</sub> – biotherapeutic *T. cruzi* 17 dH

BIOT<sub>DI</sub> – group treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water offered *ad libitum* during a period that started on the day of infection and finished when the animals died

BIOT<sub>4DI</sub> – group treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> diluted in water offered *ad libitum* from the 4<sup>th</sup> day of infection to the death of animals

BIOT<sub>4-5-6</sub> – group treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> administered by gavage on 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> days after infection

BIOT<sub>7-8-9</sub> – group treated with BIOT<sub>Tc17dH</sub> administered by gavage on 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days after infection

CI – control of infection

AUC - area under the curve

P<sub>total</sub> - total parasitemia

P<sub>max</sub> - maximum peak of parasites

Day of P<sub>max</sub> – day of maximum peak of parasites

P<sub>8thDI</sub> – parasitemia of 8<sup>th</sup> day of infection

2<sup>nd</sup> P<sub>max</sub> – second maximum peak of parasites

Day of 2<sup>nd</sup> P<sub>max</sub> – day of 2<sup>nd</sup> maximum peak of parasites

PPP- pre patent period

PP - patent period

### **Author's contributions**

All authors are key members of the research consortium and have made substantial contributions to the conception and the design of the study, and acquisition of the baseline data. They have all been involved in writing the manuscript and have given their approval for the final version.

### **Acknowledgments**

This work was supported by PROAP/ CAPES and Fundação Araucária- Paraná, Brazil.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## Reference

1. Lyrio C: *Nosódios Bioterápicos: Repertório*. Rio de Janeiro: C. Lyrio. 2002.
2. Bonamin LV: **Teorias Interpretativas sobre ultradiluições: Ilustrações Experimentais**. *Cultura Homeopática*. 2006.
3. Bellavite P, Ortolani R, Pontarollo F, Pitari G and Conforti A: **Immunology and Homeopathy. 5. The Rationale of the 'Simile'**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2007; 4(2):149-163.
4. Sandri PF, Falkowski GJS, Nascimento Júnior AD, Spack M, Moreira NM, Toledo MJO, Abreu Filho B, Gabriel M and Araújo SM: **Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17x controlled histopathological alterations in mice infected by this protozoon**. *International Journal of High Dilution Research* 2011, 10(36):119-12.
5. Thompson EA: **Homeopathy and menopause**. *Journal British Menopause Society* 2002, 8(4):151-154.
6. Vetoshkina TV, Fomina TI: **Effects of homeopathic preparations on the liver in rats with acute and chronic toxic hepatitis**. *Bulletin Experimental Biology and Medicine* 2003, 135(1):85-87.
7. Brack A, Strube J, Stoltz P, Decker H: **Effects of ultrahigh dilutions of 3,5-dichlorophenol on the luminescence of the bacterium *Vibrio fischeri***. *Biochemical, Biophysical Acta* 2003, 1621(3):253-260,.
8. Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ª ed. Brasília, DF: Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2011.
9. Almeida L R: **Efeitos de medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em Camundongos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 e *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909**. 68p. Tese Doutorado em Ciências Veterinárias – Instituto de Veterinária/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica; 2007.
10. Bonamin LV, Lagache A, Bastide M: **Research on Ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: The Follow Up**. In: *Signals and Images: Contributions and contradictions about high dilution research*. Ed. Springer, São Paulo: Bonamin LV; 2008.
11. Coura JR, Dias JC: **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009, 104(Suppl. I):31-40.

12. Silva LHP and Nussenzweig V: **Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco.** *Folia Clínica Biologia São Paulo* 1953, 20:191-201.
13. Pinto PLS, Takami R, Nunes EV, Guilherme CS, Oliveira JOC, Gama-Rodrigues J, Okumura M: **Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (y strain) in mice.** *Revista do Hospital das Clínicas* 1999, 54:141-146.
14. Coura JR, Castro SL: **A critical review on Chagas Disease Chemotherapy.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002, 97(1):3-24.
15. Higuchi MD: **Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions.** *São Paulo Medical Journal* 1995, 113:821-825.
16. Tafuri WL: **Patogenia da doença de chagas.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1987, 29(4):194-199.
17. Desquesnes M, 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, 2010.
18. Sandri PF: **Influência da idade sobre os efeitos do bioterápico 17 dH na infecção de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi*.** Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada a Farmácia) – Universidade Estadual de Maringá, 79 p, 2010.
19. Teixeira MZ: **Possíveis contribuições do modelo homeopático à humanização da formação médica.** *Revista Brasileira de Educação Médica* 2009, 33:454-463.
20. Doodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM: **Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria.** *Journal of Infectious Disease* 2002,185(7):971-979.
21. Clark IA, Alleva LM, Mills AC, Cowden WB: **Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions.** *Clinical Microbiology Reviews* 2004, 17(3):509-539.
22. Jones TR, Narum DL, Gozalo AS, Aguiar J, Fuhrmann SR, Liang H, Haynes JD, Moch JK, Lucas C, Luu T: **Protection of Aotus monkeys by *Plasmodium falciparum* EBA-175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen.** *Journal of Infectious Disease.* 2001, 183(2):303-312.
23. Wickramasinghe SN, Abdalla SH: **Blood and bone marrow changes in malaria.** *Baillieres Best Practice and Research Clinical Haematology* 2000, 13(2):277-299.

24. Claudia TM, Mônica LG, Aline VM, Silvana MA, Maria TB, Olindo AM, Marta L, Max JOT: **Usefulness of the polymerase chain reaction for monitoring cure of mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes following treatment with benznidazole.** *Experimental Parasitology*, 2008, 120(1):45-49.
25. Telleria J, Tibayrenc M, (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: one hundred year of research.* Elsevier Inc., London. 2010.
26. Araújo-Jorge TC: **Modelos experimentais para o estudo *in vivo* da doença de Chagas: Camundongo,** In: *Doença de Chagas: Manual de experimentação animal.* Fiocruz, 2000.
27. 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.
28. Carvalheiro JR, Collares EF: **Estudos sobre o comportamento em camundongos de uma amostra altamente virulenta de *Trypanosoma cruzi* (Amostra Y), após passagem em triatomíneos, ratos e culturas.** *Revista Brasileira de Biologia.* 1965, 25:169-75.
29. Billotti C, Ferraz FN, Spack M, Nascimento Júnior AD, Panza S, Alvares AA, Gomes ML, Toledo MJ, Martinichen JC, Araújo SM: **Parâmetros hematológicos em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com bioterápicos.** *Brazilian Homeopathic Journal* 2009, 11:9-10.
30. [Sandri PE](#), Falkowski GJS, Hernandez L, [Dalalio MO](#), [Aleixo DL](#), [Gomes ML](#), Anélio DN, [Molitero RA](#), Araujo SM: 2011. **Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17d increases apoptosis in experimentally infected mice.** In: *Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH on International Journal of High Dilution Research* 2011:119-124.
31. BRASIL Ministério da Saúde. 2007. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 67. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*. 8 de outubro de 2007.
32. Brener Z: **Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1962, 4:189-196.
33. Silva DR, Castro SL, Alves MCS, Batista WS, Oliveira GM: **Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilizes non-invasive**

**measurements of disease parameters.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012, 107(2):211-216.

**Artigo 3: BENZNIDAZOL ALTAMENTE DILUÍDO DIMINUI EFEITOS ADVERSOS EM ANIMAIS INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi* E TRATADOS COM BENZNIDAZOL EM DOSE PONDERAL.**

A ser enviado para o periódico Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. ISSN: 0035-9203 Qualis – B1.

Normas de publicação disponíveis em: < [http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.print/681019/gfa\\_printerversion?avoidEmail=true&printHome=cws\\_home](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.print/681019/gfa_printerversion?avoidEmail=true&printHome=cws_home)>.

**Benznidazol altamente diluído diminui efeitos adversos em animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com benznidazol em dose ponderal.**

*Departamento de Ciências Básicas da Saúde – Setor de Parasitologia  
Universidade Estadual de Maringá.*

**RESUMO**

A infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* afeta milhões de pessoas em todo o mundo e o benznidazol é o único medicamento disponível para o tratamento etiológico, apresentando efeitos adversos que dificultam a adesão ao tratamento. Aproveitar o efeito antiparasitário do benznidazol e minimizar os seus efeitos adversos sem incorporar novos incômodos ao paciente seria um avanço importante na melhoria do atendimento ao indivíduo infectado pelo *T. cruzi*. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes esquemas de tratamento utilizando benznidazol diluído e ponderal, associados ou não, na infecção murina pelo *T. cruzi*. Foram utilizados 120 camundongos suíços machos, com oito semanas de idade, infectados com 1.400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, divididos em grupos segundo o tratamento recebido: Controle (CI) – animais infectados tratados com solução hidroalcoólica 7% (veículo de preparação do medicamento ultradiluído) ( $N=20$ );  $BZ_p$  - animais infectados tratados com BZ em dose ponderal (100 mg/kg de peso) a partir da constatação da infecção ( $N=20$ );  $BZ_u$  - animais infectados tratados com BZ ultradiluído (diluição  $1:10^{30}$ ) a partir da constatação da infecção ( $N=20$ );  $BZ_{p+uTT}$  - animais infectados tratados com a associação de BZ ultradiluído (diluição  $1:10^{30}$ ) + BZ ponderal (100 mg/kg de peso), a partir da constatação da infecção ( $N=20$ );  $BZ_{p+uT4A}$  - animais infectados tratados com a associação de BZ ponderal (100 mg/kg de peso) a partir da constatação da infecção + BZ ultradiluído (diluição  $1:10^{30}$ ) administrado 4 dias após o início do tratamento com  $BZ_p$  ( $N=20$ ), Controle não infectado (CNI) - animais não infectados e não submetidos a tratamento (CNI) ( $N=20$ ), foi utilizado como controle não infectado na avaliação dos parâmetros clínicos. Foram avaliados parâmetros parasitológicos e clínicos. Foi observado diminuição de efeitos adversos com melhora clínica de animais tratados com a associação BZ ponderal mais BZ ultradiluído administrado 4 dias após ( $BZ_{p+uT4A}$ ) ou concomitantemente ( $BZ_{p+uTT}$ ) ao início do tratamento com medicamento benznidazol em dose ponderal (BZ). Pela diminuição de efeitos colaterais, melhor evolução clínica e não comprometimento do efeito parasiticida, a associação do medicamento benznidazol em dose ponderal e ultradiluída deve ser melhor explorada.

*Palavras-chave:* Benznidazol, tautopatia, efeitos adversos, melhora clínica.

## INTRODUÇÃO

A infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas afeta aproximadamente 10~12 milhões de pessoas em toda a América Latina (WHO, 2002; Moncayo, 2003; Jannin & Salvatella, 2006). No Brasil, em torno de 1,7 milhões de pessoas estão infectadas (OPS, 2004), e o benznidazol (BZ), é o único medicamento disponível para o tratamento etiológico. Este medicamento apresenta melhor efeito na fase aguda, mas uma ação limitada na fase crônica. O efeito do BZ é dose-dependente. Protocolos de tratamento mais longos propiciam maior sucesso terapêutico, embora sejam relatados efeitos adversos importantes, que interferem no estado geral de saúde do indivíduo e dificultam a adesão ao tratamento. Entre os efeitos adversos descritos para o BZ em humanos está a anorexia e perda de peso (Filardi e Brener, 1987; Coura e Castro, 2002; Cançado, 2002; Guedes *et al.*, 2011).

O modelo de infecção experimental pelo *T. cruzi* utilizando o camundongo suíço, não isogênico, permite o estudo de uma grande variedade de parâmetros que refletem sinais e sintomas que são observados também na infecção humana (Araújo-Jorge, 2000). Este modelo – infecção de camundongos suíços pelo *T. cruzi* - conta com um número importante de dados acumulados na literatura que podem contribuir sobremaneira para a pesquisa de protocolos de tratamento que propõem melhorar a abordagem e manejo terapêutico de pacientes infectados pelo *T. cruzi* (Desquesnes e Lana, 2010). Falkowski e colaboradores (2010) testaram a eficiência de alguns parâmetros clínicos em diferenciar camundongos infectados ou não pelo *T. cruzi*, entre eles a ingestão de água e ração, discutindo a utilização destes parâmetros para auxiliar na avaliação do estudo de novos compostos contra este protozoário.

A infecção humana pelo *T. cruzi* é considerada doença negligenciada, e a perspectiva de investimento na busca de novas drogas para o seu tratamento é pequena frente ao sofrimento da população infectada (Maya *et al.*, 2010). Muitos compostos já foram estudados, porém, até o momento, não estão disponíveis para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*. (Coura, 2002; Guedes *et al.*, 2011). Alternativas viáveis de medicação efetiva com melhor perspectiva de sucesso, envolvem a modificação da resposta imunológica do hospedeiro e/ou o incremento da atividade antiparasitária de drogas já disponíveis (Maya *et al.*, 2010).

A tautopatia (do grego *tautos*, que significa o mesmo), também conhecida como heteroisopatia, é um método terapêutico utilizado para tratar intoxicações e consiste em usar doses diluídas da própria substância que intoxicou o organismo, evitando efeitos adversos (Barbosa-Neto, 2006). Alves (2011) mostra que substâncias utilizadas em dose ponderal, onde o princípio ativo pode ser mensurado, podem em alguns casos apresentar um grau de



toxicidade capaz de aumentar ou diminuir a agressão ao organismo do paciente. Estas substâncias submetidas a diluições sucessivas, onde a concentração do princípio ativo diminui, podendo ser não mensuráveis podem anular os efeitos indesejáveis, enquanto a ação terapêutica se mantém. Não existem trabalhos avaliando o efeito do BZ diluído, administrado isoladamente ou em associação com o BZ ponderal. Aproveitar o efeito antiparasitário do BZ e minimizar os seus efeitos adversos sem incorporar novos incômodos ao paciente seria um avanço importante na melhoria do atendimento ao indivíduo infectado pelo *T. cruzi*. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes esquemas de tratamento utilizando benznidazol altamente diluído e ponderal, associados ou não, na infecção murina experimental pelo *T. cruzi*, para controlar efeitos adversos.-

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados 120 camundongos suíços machos, com oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram infectados com 1.400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* (Silva e Nussenzweig, 1953), por via intraperitoneal.

Os animais infectados foram divididos aleatoriamente, de forma que os grupos tivessem a mesma média inicial de peso, nos seguintes grupos: Controle (CI) – animais infectados tratados com solução hidroalcolica 7% (veículo de preparação do medicamento ultradiluído) ( $N=20$ );  $BZ_p$  - animais infectados tratados com BZ em dose ponderal (100 mg/kg de peso) a partir da constatação da infecção por 20 dias consecutivos ( $N=20$ );  $BZ_u$  - animais infectados tratados com BZ ultradiluído (diluição  $1:10^{30}$ ) a partir da constatação da infecção ( $N=20$ );  $BZ_{p+uTT}$  - animais infectados tratados com a associação de BZ ultradiluído (diluição  $1:10^{30}$ ) + BZ ponderal (100 mg/kg de peso), a partir da constatação da infecção ( $N=20$ );  $BZ_{p+uT4A}$  - animais infectados tratados com a associação de BZ ponderal (100 mg/kg de peso) a partir da constatação da infecção + BZ ultradiluído (diluição  $1:10^{30}$ ) administrado 4 dias após o início do tratamento com  $BZ_p$  ( $N=20$ ), Controle não infectado (CNI) - animais não infectados e não submetidos a tratamento (CNI) ( $N=20$ ), foram utilizados como controle não infectado na avaliação dos parâmetros clínicos.

O experimento foi conduzido como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio, repetido duas vezes. Os animais foram mantidos em biotério climatizado (temperatura  $\pm 22^\circ\text{C}$ ) com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração oferecido *ad libitum*.

**Medicamentos:** *Benznidazol ponderal:* foi utilizado o *N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamide*, produzido pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco). Para a dissolução dos comprimidos foi utilizada goma arábica e água destilada. O medicamento foi

administrado na concentração de 100 mg/kg de peso/animal/dia, em um volume de 0,2 mL/dia/animal por gavagem.

*Benznidazol ultradiluído e dinamizado:* A diluição do medicamento seguiu o protocolo preconizado pela Farmacopéia Homeopática Brasileira (2011) para drogas insolúveis. Foi utilizado o comprimido de benznidazol como dispensado na formulação comercial, triturado em lactose, obedecendo à escala decimal (1 parte de insumo ativo para 9 partes de insumo inerte), até a potência 6DH (diluição 1:10<sup>6</sup>), quando então, foi solubilizado até a dinamização a ser utilizada (30DH ~ diluição 1:10<sup>30</sup>), utilizando dinamizador (AUTIC – Modelo Denise 10-50). Foi administrado 0,2 mL/dia/animal por gavagem.

**Esquema de tratamento:** O tratamento foi iniciado após a constatação da infecção para todos os grupos, exceto para o grupo BZ<sub>p+uT4A</sub>, onde o medicamento ultradiluído (BZ<sub>u</sub>) foi administrado 4 dias após o início do tratamento com medicamento ponderal (BZ<sub>p</sub>). A duração do tratamento foi de 20 dias consecutivos.

**Avaliação da infecção:** *Parâmetros parasitológicos:* Parasitemia - avaliada pela técnica de exame de sangue a fresco entre lâmina e lamínula (Brenner, 1962), com contagem de parasitos realizada diariamente, até a morte do animal, ou até 30 dias após a infecção nos sobreviventes. A curva de parasitemia foi definida utilizando a parasitemia média diária dos animais inoculados para cada grupo.

*Parâmetros clínicos:* Foram avaliados a cada dois dias. A temperatura corporal foi medida na região anterior da coxa traseira esquerda (menor quantidade de pêlos) (Termômetro Icel, modelo TD-920.0387). O consumo de ração e água foi medido para cada grupo, e dividido pelo número total de animais por grupo, expresso por grama (g) ou mililitro (mL) por animal, respectivamente. A mortalidade foi computada ao longo do período de infecção. A sobrevivência dos animais foi avaliada até o 120º dia após a infecção. O aspecto do pêlo foi determinado considerando avaliação visual, e classificado como: sem eriçamento ou eriçado. O peso corporal foi medido com balança semi-analítica (Balança BEL®).

**Análise estatística:** Foi utilizado o software Statistica 8.0. Os dados foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações.

**Aspectos éticos:** O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade Integrado de Campo Mourão (Brasil), sob o parecer 059/08.

### 3. RESULTADOS

A avaliação da infecção experimental murina pelo *T. cruzi*, em camundongos suíços machos, de oito semanas de idade, submetidos a diferentes esquemas de tratamento utilizando BZ em

dose ponderal e ultradiluído mostrou diferentes resultados dependendo do esquema de tratamento utilizado.

#### *Parâmetros parasitológicos*

A tabela 1 resume os resultados para os parâmetros parasitológicos avaliados. A parasitemia total ( $P_{total}$ ) e a área sob a curva da parasitemia média (AUC) para os animais dos grupos  $BZ_p$  e  $BZ_{p+uTT}$ , foram significativamente menores que o observado para o grupo CI ( $p < 0,0000$ ). O grupo  $BZ_{p+uT4A}$ , não apresentou diferença estatística em relação ao CI ( $p > 1,0000$ ), assim como em relação ao  $BZ_p$  ( $p > 1,0000$ ). O grupo  $BZ_u$ , da mesma forma, não apresentou diferença estatística em relação ao grupo CI ( $p > 1,0000$ ), e ao grupo  $BZ_p$  ( $p > 1,0000$ ).

A sobrevivência foi significativamente maior nos grupos  $BZ_p$  ( $p = 0,0001$ ),  $BZ_{p+uTT}$  ( $p < 0,0000$ ) e  $BZ_{p+uT4A}$  ( $p < 0,0000$ ) em relação ao grupo CI. O grupo  $BZ_u$  não apresentou diferença estatística em relação ao grupo CI ( $p > 1,0000$ ).

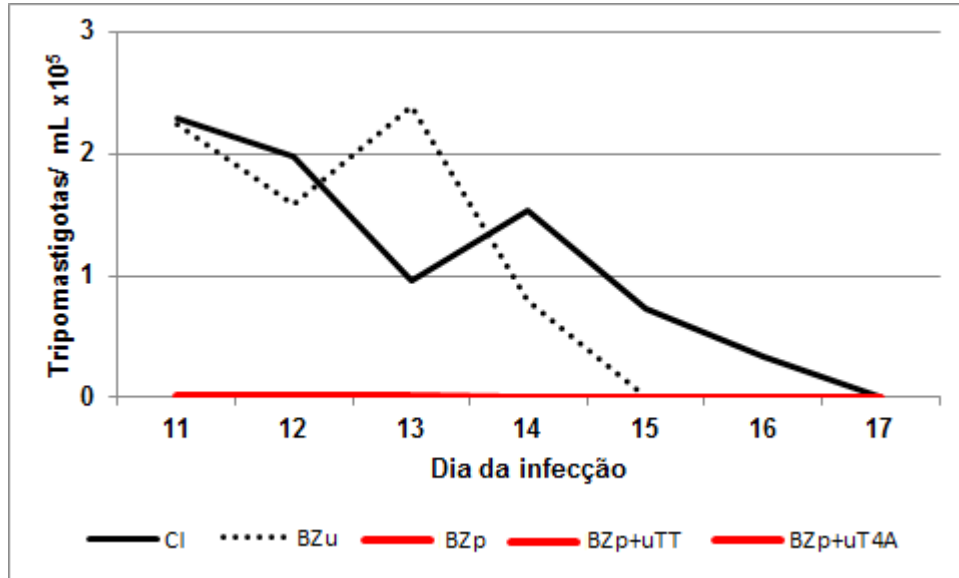
**Tabela 1:** Média e desvio padrão dos parâmetros parasitológicos de camundongos, infectados com 1400 formas tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*, IP, submetidos ao tratamento com o medicamento benznidazol ponderal ou ultradiluído em diferentes esquemas. Comparação estatística realizada entre valores na coluna.

	<b><math>P_{total}</math> (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>AUC (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>Sobrevivência (dias)</b>
<b>CI</b>	6.14 $\pm$ 3.97 <sup>a</sup>	6.03 $\pm$ 3.91 <sup>a</sup>	16.00 $\pm$ 1.73 <sup>a</sup>
<b><math>BZ_u</math></b>	4.78 $\pm$ 3.62	4.62 $\pm$ 3.71	14.36 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>
<b><math>BZ_p</math></b>	2.48 $\pm$ 2.59 <sup>b</sup>	2.47 $\pm$ 2.58 <sup>b</sup>	120.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
<b><math>BZ_{p+uTT}</math></b>	2.75 $\pm$ 3.48 <sup>b</sup>	2.73 $\pm$ 3.49 <sup>b</sup>	120.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
<b><math>BZ_{p+uT4A}</math></b>	4.91 $\pm$ 2.71	4.89 $\pm$ 2.71	120.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparado ao grupo CI; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao grupo  $BZ_p$ .

A partir do 11º dia de infecção pode ser observada maior diferenciação parasitológica e clínica entre os diferentes grupos experimentais avaliados ( $p < 0.0000$ ). A evolução da curva de parasitemia média dos animais infectados pelo *T. cruzi* submetidos aos diferentes esquemas de tratamento, a partir do 11º dia de infecção, está mostrada na figura 1.

Neste período, os grupos tratados com BZ em dose ponderal, associado ou não ao BZ ultradiluído ( $BZ_p$ ,  $BZ_{p+uTT}$ ,  $BZ_{p+uT4A}$ ), apresentaram remissão da parasitemia, com ausência de mortalidade, diferentemente do observado no grupo CI. Nestes grupos, independente do esquema de tratamento utilizado ( $BZ_{p+uTT}$ ,  $BZ_{p+uT4A}$ ), a associação do BZ ponderal com o BZ ultradiluído não alterou significativamente o efeito supressor da parasitemia observado em animais tratados com o BZ em dose ponderal ( $p > 1,0000$ ).

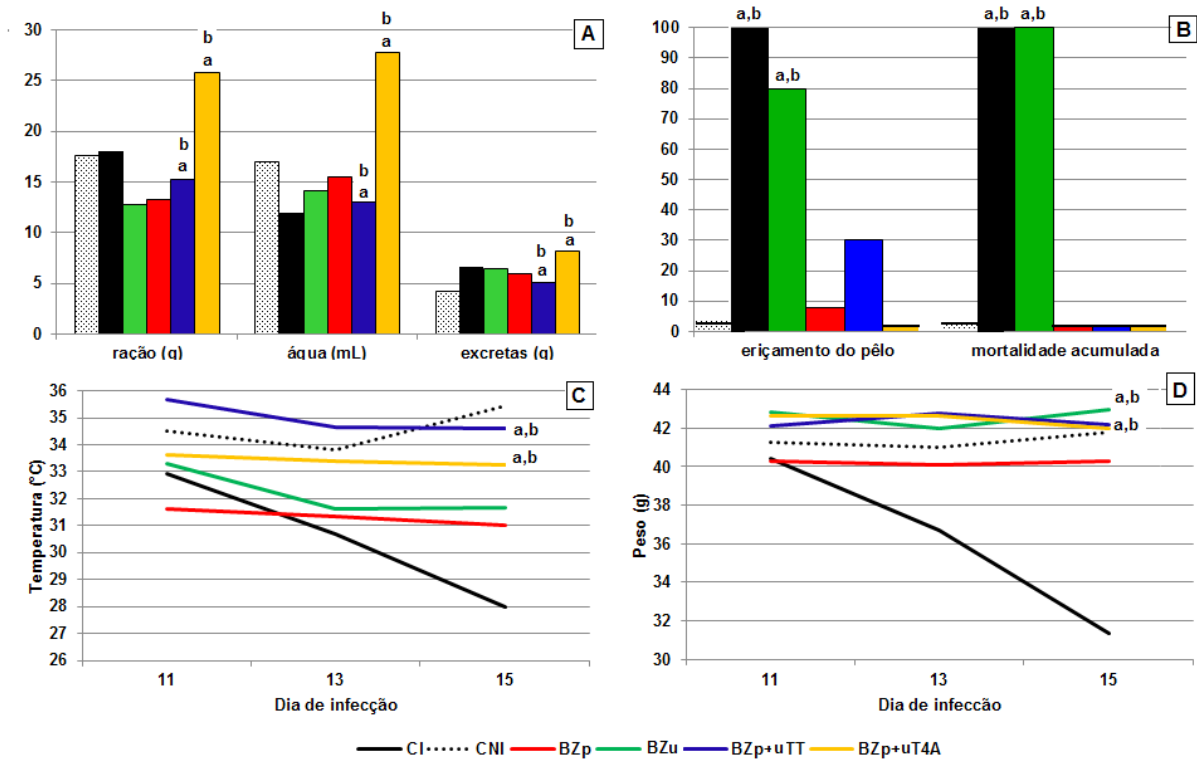


**Figura 1:** Curva de parasitemia média obtida a partir do 11º dia de infecção, de camundongos suíços, machos, de 8 semanas de idade, infectados com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, IP. Grupos: CI – animais infectados tratados com solução hidroalcoólica 7%; BZ<sub>p</sub> – animais infectados tratados com benznidazol ponderal, BZ<sub>u</sub> – animais infectados tratados com benznidazol diluído, BZ<sub>p+uTT</sub> – animais infectados tratados com a associação de benznidazol ponderal e ultradiluído a partir da constatação da infecção; BZ<sub>p+uT4A</sub> – tratados com benznidazol ponderal a partir da constatação da infecção e benznidazol ultradiluído 4 dias após. No grupo tratado somente com o BZ ultradiluído (BZ<sub>u</sub>) a parasitemia manteve-se elevada, culminando com a morte de todos os animais dentro de um período de até 20 dias, da mesma forma como observado no grupo CI.

#### Parâmetros clínicos

A análise dos parâmetros clínicos avaliados para os animais submetidos a diferentes esquemas de tratamento utilizando o BZ em dose ponderal e o BZ ultradiluído, associados ou não, está apresentada na figura 2.

Animais do grupo BZ<sub>p+uT4A</sub> apresentaram evolução clínica mais favorável, com aumento na ingestão de ração ( $p < 0,0000$ ) e água ( $p < 0,0000$ ), comparado aos grupos BZ<sub>p</sub>, CI e CNI (fig. 2A). Da mesma forma, este grupo apresentou quantidade de excretas significativamente maior que BZ<sub>p</sub> ( $p < 0,0000$ ), CI ( $p < 0,0000$ ) e CNI ( $p < 0,0000$ ). No grupo BZ<sub>p+uT4A</sub> não foi observado em nenhum momento eriçamento de pelo em qualquer dos animais avaliados (fig. 2B). A avaliação visual destes animais ao longo do experimento mostrou melhor condição clínica, não sendo observada nenhuma mortalidade. No grupo BZ<sub>p</sub> houve 8% de animais com eriçamento e sobrevivência de todos os animais do grupo. Estes resultados contrastam com os 100% de eriçamento e mortalidade observados no grupo CI e 80% de eriçamento e 100% de mortalidade observada no grupo BZ<sub>u</sub> (fig. 2B).



**Figura 2:** Aspectos clínicos de camundongos suíços, machos, de 8 semanas de idade, infectados com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, IP, submetidos a diferentes esquemas de tratamento. Grupos: CI – animais infectados tratados com solução hidroalcoólica 7%; BZ<sub>p</sub> – animais infectados tratados com benznidazol ponderal; BZ<sub>u</sub> – animais infectados tratados com benznidazol ultradiluído; BZ<sub>p+uTT</sub> – animais infectados tratados com a associação de benznidazol ponderal e ultradiluído a partir da constatação da infecção dos animais; BZ<sub>p+uT4A</sub> – tratados com benznidazol ponderal a partir da constatação da infecção dos animais e benznidazol ultradiluído 4 dias após; CNI – animais não infectados e não tratados. \*  $p < 0,05$ . Fig. 2A – Ingestão de água e ração e eliminação de excretas; Fig. 2B – Porcentagem de animais que apresentaram eriçamento de pelo e morte; Fig. 2C – Curva de temperatura (°C), Fig. 2D – Evolução de peso (g), durante o período avaliado (120 dias). <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo CNI; <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo BZ<sub>p</sub>.

Animais do grupo BZ<sub>p+uTT</sub> apresentaram boa evolução clínica com aumento significativo na ingestão de ração ( $p < 0,0000$ ) em relação ao grupo BZ<sub>p</sub> e diminuição em relação aos grupos CNI ( $p < 0,0000$ ) e CI ( $p < 0,0000$ ) (fig. 2A). Quanto ao consumo de água, o grupo BZ<sub>p+uTT</sub> ingeriu menos que o grupo BZ<sub>p</sub> ( $p < 0,0000$ ) e o CNI ( $p = 0,0015$ ), sem diferença estatística em relação ao grupo CI ( $p = 0,0797$ ) (fig. 2A). A produção de excretas pelo grupo BZ<sub>p+uTT</sub> seguiu a mesma tendência de resultados observados para a ingestão de água sendo significativamente menor que os valores observados para os grupos BZ<sub>p</sub> ( $p < 0,0000$ ) e CI ( $p < 0,0000$ ) (fig. 2A). Quanto ao eriçamento de pelo e mortalidade acumulada, o grupo BZ<sub>p+uTT</sub> apresentou 30% de animais com eriçamento de pelo e nenhuma mortalidade ao longo do experimento (fig. 2B). A

ingesta de ração e água, assim como a eliminação de excretas no grupo  $BZ_u$ , não apresentou evidência de benefício para os animais que receberam este tratamento (fig. 2A).

A partir do 11º dia de infecção a diferença clínica acentua-se entre os grupos experimentais ( $p < 0,000$ ). Na evolução da curva de temperatura (fig. 2C) o grupo  $BZ_{p+uT4A}$  foi estável com temperaturas significativamente mais próximos da normalidade que o  $BZ_p$  ( $p < 0,0000$ ) não apresentando a hipotermia que precede a morte observada no grupo CI. Não foi verificada diferença estatística nos valores de temperatura do grupo  $BZ_{p+uT4A}$  comparado ao grupo CNI ( $p = 0,0690$ ) (fig. 2C). Com relação à evolução do peso (fig. 2B), os animais do grupo  $BZ_{p+uT4A}$  apresentam maiores valores que os animais dos grupos  $BZ_p$  ( $p < 0,0000$ ) e CNI ( $p < 0,0000$ ). O mesmo resultado pode ser observado para os animais do grupo  $BZ_{p+uTT}$ . Para o grupo  $BZ_u$  a evolução da temperatura é mais próxima da observada no grupo  $BZ_p$  ( $p < 0,0000$ ) que a observada nos grupos tratados com as associações ( $p < 0,0000$ ) e CNI ( $p < 0,0000$ ) (fig. 2C). Com relação ao peso corporal, os animais deste grupo comportam-se como os animais tratados com as associações ( $BZ_{p+uT4A}$  e  $BZ_{p+uTT}$ ) ( $p < 0,0000$ ) (fig. 2D).

## DISCUSSÃO

Este artigo descreve diferenças nos parâmetros parasitológicos e clínicos de animais infectados pelo *T. cruzi*, submetidos a diferentes esquemas de tratamento utilizando os medicamentos BZ ponderal ou ultradiluído, associados ou não. Foram observados diminuição de efeitos adversos e melhora clínica de animais tratados com a associação BZ ponderal mais BZ ultradiluído administrado quatro dias após ( $BZ_{p+uT4A}$ ) ou concomitantemente ( $BZ_{p+uTT}$ ) ao início do tratamento com medicamento benznidazol em dose ponderal (BZ).

Os grupos  $BZ_{p+uT4A}$  e  $BZ_{p+uTT}$  não apresentaram diferenças significativas nos valores de  $P_{total}$  e AUC comparados ao grupo  $BZ_p$ , o que comprova que o efeito parasiticida do BZ foi mantido. Este dado é relevante uma vez que o BZ é o único medicamento para tratamento etiológico da doença de Chagas disponível no Brasil, com estudos que mostram seu efeito na melhora do prognóstico e aumento de sobrevida em pacientes tratados a despeito dos importantes efeitos adversos observados durante sua utilização (Cançado, 2002; Coura e Castro, 2002; Viotti *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2010; Hasslocher-Moreno *et al.*, 2012).

A tendência de aumento da  $P_{total}$  e AUC no grupo  $BZ_{p+uT4A}$  deve ser considerada dentro da grande variação observada individualmente para as medidas de parasitemia na infecção murina pelo *T. cruzi* e, no contexto clínico geral observado para este grupo (Desquesnes e Lana, 2010). Esta tendência pode ainda refletir desequilíbrio passageiro na relação entre o parasito e o hospedeiro, que foi reestabelecido, haja visto que houve redução total da parasitemia com sobrevida de todos os animais deste grupo. De maneira geral, é bem aceito

na literatura a relação direta entre parasitemia e morbidade na infecção experimental pelo *T. cruzi*. No entanto, existem dados que discutem esta relação direta (Desquesnes e Lana, 2010). No presente trabalho, utilizando o modelo murino de infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, esta relação não foi constatada já que a menor morbidade foi observada no grupo que apresentou tendência a maior  $P_{total}$  e AUC ( $BZ_{p+dT4A}$ ), mesmo que sem diferença estatística.

Os benefícios do tratamento nos grupos onde houve a associação do BZ ponderal e ultradiluído podem ser confirmados quando se analisa os dados de sobrevivência, onde nos grupos  $BZ_{p+dT4A}$  e  $BZ_{p+dTT}$  todos os animais sobreviveram mantendo o efeito do BZ ponderal. Ressalta-se que a utilização da associação com o BZ ponderal é primordial para obtenção do efeito parasiticida e de sobrevivência dos animais com melhora clínica uma vez que os resultados observados no grupo  $BZ_u$  são insatisfatórios, sem supressão da parasitemia e com mortalidade de todos os animais, assim como observado no grupo CI.

O benznidazol tem ação tripanocida para todas as formas parasitárias do *T. cruzi* (Urbina, 2009; Maya *et al.*, 1997). Sua ação depende do sistema imunológico assim como a patogênica da infecção pelo *T. cruzi* (Guedes *et al.*, 2011; Girones e Fresno, 2003). Seu mecanismo de ação envolve estresse oxidativo com interações de nitroredução entre componentes do parasito (Guedes *et al.*, 2011; Urbina & Do Campo, 2003). Além do medicamento não ser completamente eficaz, pode causar toxicidade sistêmica e efeitos adversos importantes dependentes da dose administrada, levando ao abandono do tratamento (Guedes *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2006; Viotti *et al.*, 2009). Considerando que o melhor efeito do benznidazol vem com maior tempo de tratamento e que seus efeitos adversos tóxicos também são cumulativos/dose dependente (Guedes *et al.*, 2011), o encontro de alternativas para a diminuição destes efeitos adversos contribui para seu melhor desempenho já que o uso prolongado aumenta sua eficácia.

Os efeitos dos diferentes esquemas de tratamento sobre a clínica ficam mais evidentes a partir do 11º dia de infecção. A partir deste período temos situações bem definidas: animais do grupo  $BZ_p$  mostram supressão da parasitemia com início dos efeitos adversos como diminuição de peso e variação de temperatura com menor ingestão de alimentos e eliminação de excretas; animais do grupo  $BZ_{p+uTT}$  mostram supressão da parasitemia com aumento de temperatura, aumento de ingestão de ração e diminuição da ingestão de água e eliminação de excretas com certo percentual de animais apresentando eriçamento de pelo; animais do grupo  $BZ_{p+dT4A}$  mostram supressão da parasitemia, com temperatura mais estável sem apresentar a hipotermia característica que precede a morte em animais infectados com o *T. cruzi*, melhor

condição de peso corporal, melhores resultados para ingesta de ração, água e eliminação de excretas, sem apresentar eriçamento de pelo.

Se até o 11º dia de infecção os efeitos sobre os parâmetros parasitológicos podem ser atribuídos exclusivamente ao BZ ponderal, a partir deste período as associações respondem pela diferenciação clínica. Fica bastante claro o melhor desempenho do grupo  $BZ_{p+dT4A}$  em relação ao grupo  $BZ_{p+dTT}$ . Estes dados confirmam a necessidade de um intervalo entre a utilização do medicamento em dose ponderal e o medicamento ultradiluído destinado a tratar os efeitos tóxicos ou adversos do medicamento ponderal (Lacerda, 1996).

Neste trabalho conseguimos mostrar que os efeitos tóxicos ou adversos de medicação ponderal podem ser minimizados pela utilização da substância ponderal associada a ela mesma na forma ultradiluída num esquema de tratamento que respeite um intervalo entre o início dos tratamentos, começando pela administração do medicamento ponderal. Aleixo *et al.* (2011) e Ferraz *et al.* (2011) demonstraram que o esquema de administração do medicamento ultradiluído influencia na resposta ao tratamento. Os resultados obtidos nos animais tratados com a associação dos medicamentos no grupo  $BZ_{p+dT4A}$ , onde a clínica foi mais satisfatória sem prejuízo da sobrevivência, mostram efeito patente e inquestionável de que esta associação deve ser mais bem explorada. A utilização deste esquema de tratamento deve ser melhor investigada para a aplicação mais disseminada na clínica em humanos contribuindo para a melhor qualidade de vida em indivíduos submetidos a tratamentos prolongados utilizando medicamentos com toxicidade ou efeitos adversos em qualquer patologia (Sundar e Chakravarty, 2010; Sayed-Ahmed, 2010; Guedes *et al.*, 2011; Brito, 2011).

Deve ainda ser ressaltado que é fato que as condições experimentais refletem em *stress* para o animal (Silva *et al.*, 2012), e a administração da associação  $BZ_{p+dT4A}$  parece controlar inclusive estas alterações, uma vez que os resultados obtidos neste grupo são significativamente melhores que os observados no grupo CNI. Neste grupo, embora os animais estejam infectados, numa condição desfavorável, a utilização da medicação ultradiluída conseguiu proporcionar maior bem estar expresso pelos parâmetros clínicos avaliados.

## CONCLUSÕES

Pela diminuição de efeitos colaterais, melhor evolução clínica e não comprometimento do efeito parasiticida, a associação do medicamento benznidazol em dose ponderal e ultradiluído deve ser melhor explorada não só em infecções experimentais, mas também na abordagem do indivíduo infectado pelo *T. cruzi*, ainda sem sintomatologia, podendo aumentar-se o tempo de tratamento e conseqüentemente melhorar seu prognóstico. Estes resultados mostram que a utilização do princípio da tautopatía/heteroisopatía proporciona uma perspectiva de melhoria



da abordagem do tratamento de doenças negligenciadas, em que a descoberta de novas drogas está comprometida e as drogas existentes não são satisfatórias. Esta possibilidade pode constituir alternativa para a diminuição dos efeitos adversos causados por drogas alopáticas, tóxicas, usadas em tratamentos prolongados. Neste sentido estas preparações em que drogas alopáticas são ultradiluídas e associadas ao tratamento convencional devem ser mais bem exploradas. Da mesma forma, esta possibilidade deve ser também avaliada em outras condições clínicas em que as poucas drogas disponíveis apresentam efeitos adversos que comprometem o tratamento.

## **REFERÊNCIAS**

World Health Organization (WHO). Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva. WHO Tech Rep Series 905, 109 p. 2002.

Moncayo, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98(5): 577–591. 2003.

Jannin, J, Salvatella, R. Quantitative Estimates of Chagas Disease in the Americas [OPS/HDM/CD/425-06] 1–28 Pan American Health Organization, 2006.

OPS (Organizacion Panamericana de la Salud). XIII Reunion de La comisi n Intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupci n de la tripanosomiasis Americana por transfusion. pp 29–31. 2004.

Filardi, LS; Brener, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used in Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 755-759. 1987.

Coura, JR e Castro, SL. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . 97(1): 3-24. 2002.

Cançado, JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas' disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44:29-37. 2002.

Guedes, PM; Silva, GK; Gutierrez, FR; Silva, JS. Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 9(5):609-20. 2011.

Araújo-Jorge, TC. Modelos experimentais para o estudo *in vivo* da doença de Chagas: Camundongo, In: Araújo-Jorge, TC, Castro, SL. (Eds.), Doença de Chagas: Manual de experimenta o animal. Fiocruz Inc., pp.133-139, 2000.

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, pp. 277-305. 2010.

Falkowiski, GJS; Braga, CF; [Aleixo, DL](#); [Sandri, PF](#); Araujo, SM. Parâmetros para avalia o clínica de camundongos em experimenta o. In: XXX Congresso de Homeopatia - Uma abordagem sist mica do ser, 2010, Recife. Disponível no site <http://homeopatia.itarget.com.br/>, 1:1-1. 2010.

Maya, JD; Orellana, M; Ferreira, J; Kemmerling, U; López-Muñoz R; Morello, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res* 43(3): 323-331. 2010.

Barbosa-Neto, RM. Bases da Homeopatia. Liga da Homeopatia – Medicina UNICAMP. 2006.

Alves, JM. Princípios da Homeopatia, 2011. Disponível em: [http://www.homeoesp.org/art\\_homeo\\_0030.html](http://www.homeoesp.org/art_homeo_0030.html). Acessado em 05/12/2011.

Silva, LHP, Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clínica Biol. São Paulo*, v.20, pp.191-201. 1953.

Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ª ed. Brasília, DF: Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2011.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.4, pp.189-196. 1962.

Viotti, R; Vigliano, C, Lococo, B; Alvarez, MG; Petti, M; Bertocchi, G, Armenti, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 157-163. 2009.

Hasslocher-Moreno, AM; Brasil, PEAA; Souza, AS; Xavier, SS; Chambela, MC; Silva, GMS. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother* 6:234-241. 2012.

Urbina, JA. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Relence, Current Limmitations and New Approaches. *Acta Trop.* 7: 198-213. 2009.

Maya, JD; Repetto, Y; Agosín, M; Ojeda, JM; Tellez, R; Gaule, C; Morello, A. Effects of nifurtimox and benznidazol upon glutathione and trypanothione contente in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 86:101-6. 1997.

Girones, N; Fresno, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.* 19(1):19–22. 2003.

Urbina, JA; do Campo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501, 2003.

Castro, JÁ; de Mecca, MM; Bartel, LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American tripanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 25:471-479, 2006.

Lacerda, P. Manual prático de Homotoxicologia em Homeopatia. 1ª edição. Ed. Pancast, 1996.

Aleixo, DL; Ferreira, EC; Braga, CF; Lopes, CR; Falkowski, GJS; Sandri PF; Araujo, SM. Biotherapeutic *T. cruzi* 17DH when continuously used clinically improves mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J High Dilution Res*; 10:134-137, 2011.

Ferraz, FN; Gonçalves, VA; Aleixo, DL; Mizutani, AS; Araújo, SM. Effect of biotherapy *T. cruzi* 7x in several therapeutic schemes on experimental infection by *Trypanosoma cruzi*, in Anais do VIII Congresso Brasileiro de Farmácia Homeopática e XXV Simpósio do GIRI, 2011.

Sundar, S; Chakravarty, J. Antimony Toxicity. [International Journal of Environmental Research and Public Health](#). 7:4267-4277. 2010.

Sayed-Ahmed, MM. Role of carnitine in câncer chemotherapy-induced multiple organ toxicity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18:195-206, 2010.

Brito, MA. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina Rev Ciênc Farm Básica Apl. 32(2):159-168. 2011.

Silva, DR.; Castro, SL.; Alves, MCS; Batista, WS; Oliveira, GM. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 107(2): 211-216, 2012.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

1. Medicamentos ultradiluídos mostram benefícios no tratamento de doenças infecciosas. O aperfeiçoamento das técnicas e disseminação do conhecimento sobre medicamentos ultradiluídos constitui alternativa viável para o tratamento de infecções parasitárias. O reconhecimento da homeopatia depende da credibilidade dos grupos de pesquisa. Descrições precisas e detalhadas das metodologias empregadas nos artigos científicos contribuem para o avanço no uso da homeopatia.
2. A utilização do bioterápico *T. cruzi* 17DH, em uso prolongado, administrado 4 dias após a infecção, mostrou melhor desempenho com redução da parasitemia e tendência a menor mortalidade com maiores períodos de sobrevivência.
3. A associação do benznidazol ultradiluído, administrado quatro dias após ou concomitantemente ao início do tratamento com o medicamento em dose ponderal, diminuiu efeitos adversos e melhora a evolução clínica de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, sem comprometer o efeito parasiticida da medicação convencional.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Elaborar um artigo científico descrevendo detalhadamente a *praxis* para realização de experimentos envolvendo medicação ultradiluída, considerando o máximo possível a eliminação do viés incorporado pelo executor dos experimentos. Trabalho em grupo, experimento cego, randomizados, controlados com análises estatísticas adequadas, incorporando sempre que possível metodologia automatizada, procurando aprimorar insumos e equipamentos de biotério.
2. Elaboração de um artigo avaliando o efeito do bioterápico *T. cruzi* 200 DH na infecção murina pelo protozoário, com dados já obtidos.
3. Avaliação detalhada do perfil de citocinas tanto nos experimentos onde se testou os diferentes bioterápicos de *T. cruzi*, quanto no experimento em que se testou o efeito do Benznidazol ultradiluído associado ao benznidazol ponderal.
4. Avaliação detalhada da histopatologia tanto nos experimentos onde se testou os diferentes bioterápicos de *T. cruzi*, quanto no experimento em que se testou o efeito do benznidazol ultradiluído associado ao benznidazol ponderal.
5. Considerar a possibilidade de pesquisa clínica em humanos infectados pelo *T. cruzi* e que interromperam o tratamento, avaliando a utilização da associação benznidazol ultradiluído e benznidazol ponderal.

## **ANEXOS**