

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

FRANCIELE KARINA DA VEIGA DE SALES

Avaliação multicêntrica do *Zincum metallicum* em diferentes modelos
experimentais: Modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*

Maringá
2014

FRANCIELE KARINA DA VEIGA DE SALES

Avaliação multicêntrica do *Zincum metallicum* em diferentes modelos
experimentais: Modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de
Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Fisiopatologia

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia
Aplicadas à Farmácia

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

Maringá
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S163a Sales, Franciele Karina da Veiga de
Avaliação multicêntrica do *Zincum metallicum* em diferentes modelos experimentais : modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi* / Franciele Karina da Veiga de Sales. -- Maringá, 2014.
39 f. : il. color., fig., tabs.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2014.

1. *Trypanosoma cruzi* - Infecção - Tratamento homeopático. 2. *Trypanosoma cruzi* - Modelo Murino. 3. *Zincum metallicum* - Tratamento homeopático. 4. Medicamento dinamizado - *Zincum metallicum*. 5. Homeopatia - Medicamentos. 6. Medicamentos homeopáticos. 7. Homeopatia - *Zincum metallicum*. I. Araújo, Silvana Marques de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. III. Título.

CDD 21.ed. 615.532

AMMA-001857

FOLHA DE APROVAÇÃO

FRANCIELE KARINA DA VEIGA DE SALES

Avaliação multicêntrica do *Zincum metallicum* em diferentes modelos experimentais: Modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

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

Dr^a. Denise Lessa Aleixo
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana
Universidade Estadual de Maringá

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

Aprovada em: 12 de dezembro de 2014.

Local de defesa: Sala 109, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
à minha família.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela iluminação, força e encorajamento desta importante fase de crescimento pessoal e profissional.

A elaboração e conclusão deste trabalho não seriam possíveis se não fossem as pessoas que em algum momento surgiram em meu caminho e colaboraram de alguma maneira. Pessoas essas que me ensinaram muito. Aprendi que de todas as situações sempre se é possível obter resultados positivos. Agradeço a Deus por ter me presenteado sempre com pessoas especiais.

Ao meu amado esposo, Raphael, obrigada pelo amor, paciência e compreensão.

Aos meus queridos pais, Edna e Sebastião, obrigado por acreditarem nos meus sonhos, e por não terem medido esforços para que fosse possível realizá-los.

Meus agradecimentos a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Silvana Marques Araújo, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação, incentivo, confiança, amizade, pelos ensinamentos e exemplo de compromisso com o espírito científico. Muito obrigada.

Em especial, às minhas professoras e amigas Denise Lessa Aleixo e Fabiana Nabarro Ferraz, por colaborar em meu trabalho, pela atenção, confiança, apoio, incentivo, amizade e pela oportunidade de aprender com vocês. Com toda certeza hoje tenho mais que professoras, tenho amigas para toda vida.

À minha amiga e parceira de experimentos, Larissa Ciupa, meu agradecimento especial.

À minhas amigas do Laboratório de Parasitologia: Caroline, Ângela, Patrícia, Gislaine, Nathalia, pelo carinho, paciência, pela ótima convivência, pela oportunidade de aprender com vocês e pela ajuda que sempre me deram.

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

A todos os amigos, estagiários, funcionários e professores do Departamento de Parasitologia Básica e Patologia da Universidade Estadual de Maringá, pela companhia diária no laboratório de pesquisa e por contribuírem para o meu crescimento científico e pessoal.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia pela amizade, pelas orientações, incentivos e ensinamentos a mim dedicados.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES, PROAP, pelo auxílio financeiro para realização desse trabalho.

A todos os colaboradores que participaram deste estudo, pelo apoio, pela contribuição e pela oportunidade de me integrar e adquirir conhecimentos.

“Existem homens que lutam um dia e são bons,
outros que lutam um ano e são melhores.

Porém existem os que lutam toda vida.

Estes são imprescindíveis”

(Bertolt Brechetm)

Avaliação multicêntrica do *Zincum metallicum* em diferentes modelos experimentais: Modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

A utilização da homeopatia na clínica médica tem sido incentivada pelas agências de Saúde do Brasil e do Mundo. A pesquisa homeopática conta com modelos experimentais e metodologias modernas, bem estabelecidas, utilizadas para as mais diferentes áreas da biologia, na avaliação da eficácia dos homeopáticos e na busca de possíveis mecanismos de ação. Em um estudo multicêntrico, o composto *Zincum metallicum*, que é um composto simples foi escolhido para ser utilizado em diferentes modelos experimentais. O zinco é um elemento traço essencial no organismo, sendo que uma de suas funções é a modulação de resposta imune contra infecções. **Objetivo:** Avaliar o efeito de diferentes dinamizações de *Zincum metallicum* na infecção experimental por *T. cruzi*. **Material e Métodos:** Em ensaio cego, controlado e randomizado por sorteio, foram utilizados 136 camundongos suíços, machos, com 8 semanas, divididos nos grupos (n=17): 5cHZn – tratado com Zinco 5cH, 6cHZn – tratado com Zinco 6cH, 30cHZn – tratado com Zinco 30cH, 5cHLac – controle tratado com lactose 5cH, 6cHLac – controle tratado com lactose 6cH, 30cHLac – controle tratado com lactose 30cH, CI – controle infecção; CNI – controle não infectado. Os medicamentos e seus controles foram preparados de acordo com a Farmacopeia Homeopática Brasileira e fornecidos *ad libitum*, diluídos em água (1mL/100mL) por 16 horas consecutivas. Foram administrados 48 horas antes e depois da infecção. Posteriormente, os animais foram tratados de 56/56 horas até 9º dia de infecção. Os camundongos foram inoculados com 1.400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. Foram avaliados: 1) *Parâmetros parasitológicos*: curva de parasitemia, período pré-patente, período patente, parasitemia total, pico de parasitemia. 2) *Parâmetros clínicos*: peso, temperatura, consumo de ração, água, e tempo de sobrevivência 3) *Dosagem de citocinas*: GM-CSF, IFN- γ , IL-5, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α foram dosadas em soro. Os dados foram comparados usando ANOVA e LSD, 5% de significância. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – UEM - parecer nº091/2013. **Resultados:** Os medicamentos produzidos com *Zincum metallicum* apresentaram efeito sobre a infecção murina por *T. cruzi* em todas as dinamizações ensaiadas. O medicamento 5cHLac apresentou o melhor efeito protetor observado no presente estudo, aumentando significativamente a sobrevivência e período pré-patente dos animais infectados, com melhor desempenho clínico, mesmo com o aumento da carga parasitária. O melhor desempenho da dinamização 5cH, mais especificamente do grupo 5cHLac, relacionou-se com diminuição das citocinas IL-1 β , IFN- γ (pró-inflamatória), IL-4, IL-5 (anti-inflamatória) e GM-CSF (estimulador de macrófagos). Da mesma forma o desempenho negativo dos grupos 6cHZn e 30cHZn relacionou-se com variações significativas de aumento ou redução de IL-6, dependendo do período da dosagem, em relação ao grupo CI. **Conclusão:** *Zincum metallicum* e lactose altamente diluídos modularam a resposta imunológica.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Modelo murinho. *Zincum metallicum*. Medicamento dinamizado.

Multicenter evaluation of the *Zincum metallicum* in different experimental models: Infection model by *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Introduction: The use of homeopathy in medical practice has been encouraged by health agencies of the Brazil and the world. The homeopathic research can count on experimental models and well-established modern methodologies, used in different areas of biology, to evaluate the effectiveness of homeopathic medications and discovery of possible action mechanisms. In a multicenter study, the compound *Zincum metallicum* which is simple composed was chosen to be used in different experimental models. Zinc is an essential trace element in the body and one of its functions is the modulation of immune response against infection. **Objective:** Evaluate the effect of different dynamizations of *Zincum metallicum* in the experimental infection by *T. cruzi*. **Material and Methods:** We conducted a blind, controlled randomized trial, were used 136 Swiss male mice, 8 weeks of age and divided in groups (n = 17): 5cHZn- treated with zinc 5CH, 6cHZn - treated with zinc 6cH, 30cHZn - treated with 30cH Zinc, 5cHLac - treated control with 5ch lactose, 6cHLac- treated control with lactose 6cH, 30cHLac - treated control with lactose 30cH, IC - infection control, CNI - control uninfected. The medications and their controls were prepared according to the Homeopathic Pharmacopoeia Brazilian and provided ad libitum, diluted with water (1 mL / 100 mL) for 16 consecutive hours. Were administered 48 hours before and after infection. Subsequently, the animals were treated for 56/56 hours until 9th day of infection. Mice were inoculated with 1,400 blood trypomastigotes of *T. cruzi*-Y strain. Were evaluated: 1) Parasitological parameters: parasitemia curve, pre-patent period, patent period, total parasitemia and parasitemia peak. 2) Clinical parameters: weight, temperature, feed intake, water, and survival time 3) Determination of cytokine levels: GM-CSF, IFN- γ , IL-5, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL -6, IL-10, IL-12 and TNF- α were measured in serum. Data were compared using ANOVA and LSD, 5% significance level. The project was approved by the Committee on Animal Bioethics – UEM – 091/2013. **Results:** Medicaments produced with *Zincum metallicum* showed effect on murine infection by *T. cruzi* in all tested dynamizations. The 5cHLac showed the best protective effect, significantly increasing the survival and pre-patent period of infected animals, with a better clinical performance, even with increased parasite load. The best performance of 5CH dynamization, specifically the 5cHLac group, was related to a decrease of cytokines: IL-1b, IFN- γ (pro-inflammatory), IL4, IL5 (anti-inflammatory) and GM-CSF (macrophage stimulator). The poor performance of 6cHZn and 30cHZn groups was related to significant variations of increase or reduction in IL-6, depending on the period of dosage, compared to the IC group. **Conclusion:** *Zincum metallicum* and lactose highly diluted modulate the immune response.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Murine model. *Zincum metallicum*. Dynamized medications.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1.** Valores de média e desvio padrão dos parâmetros clínicos avaliados em camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos..... 25
- Tabela 2.** Valores de média e desvio padrão dos parâmetros parasitológicos avaliados em camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos..... 27
- Tabela 3.** Valores da comparação do tempo de vida estimada (dias) de camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos..... 29
- Tabela 4.** Probabilidade de sobrevivência e intervalo de confiança até 15 dias após a infecção para camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos..... 30
- Tabela 5.** Comparação da concentração de citocinas considerando dia e evolução clínica de camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos..... 32
- Figura 1.** Curva da análise de camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos..... 29

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): *Homeopathy* (artigo 1) disponível em: <http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623042/authorinstructions

>

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I.....	12
1.1 Estudo multicêntrico.....	12
1.2 Modelo de infecção murino por <i>T. cruzi</i>	13
1.3 Resposta imune e o papel das citocinas.....	14
1.4 Medicamento homeopático.....	15
1.5 <i>Zincum metallicum</i>	16
1.6 Jutificativa.....	16
1.7 Objetivos.....	17
1.8 Referências Bibliográficas.....	18
2 CAPÍTULO II.....	21
2.1 Avaliação multicêntrica do <i>Zincum metallicum</i> em diferentes modelos experimentais: modelo de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
3 CAPÍTULO III.....	39
3.1 Conclusões.....	39
3.2 Perspectivas Futuras.....	39

CAPÍTULO I

ESTUDO MULTICÊNTRICO

O medicamento homeopático *Zincum metallicum* foi eleito por um grupo de pesquisadores para ser avaliado em um estudo multicêntrico. Foi elaborado um projeto multicêntrico com a participação de pesquisadores das universidades: Universidade Estadual de Maringá (UEM), Universidade Paulista (UNIP), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Universidade Estadual Paulista (UNESP) e Università degli Studi di Verona.

A meta principal do estudo foi produzir evidências biológicas do medicamento homeopático *Zincum metallicum* em diferentes laboratórios. Cada instituição testou esta substância em modelos experimentais já estabelecidos por seus pesquisadores. Coube a cada instituição os seguintes protocolos experimentais:

- Efeito do medicamento homeopático *Zincum metallicum* na atividade de linfócitos e fagócitos de fêmeas de camundongos BALB/c e sua prole;
- Efeito do medicamento homeopático *Zincum metallicum* em modelo de cultura de células (MTT test), proliferação celular (*Tripán blue test*), e análise microscópica de morfologia celular;
- Efeito do medicamento homeopático *Zincum metallicum* em macrófagos peritoneais de camundongos em um modelo de co-cultura, analisando perfil de citocinas;
- Efeito do medicamento homeopático *Zincum metallicum* em modelo vegetal utilizando *Raphanussativus* para analisar germinação, área foliar, a dimensão fractal de folhas e raízes, camada de cera nas folhas, clorofila e conteúdo caroten, espectros de UV, espectro visível e IR, hidrofobia;
- Efeito do medicamento homeopático *Zincum metallicum* em camundongos infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, avaliando parâmetros clínicos, parasitológicos, histopatológicos e imunológicos, avaliado por nosso grupo de pesquisa.

O projeto multicêntrico contou com um acordo de Cooperação Internacional entre Brasil-Itália firmada entre as Universidades. Os integrantes do projeto se dispuseram a trabalhar com protocolos de manipulação e utilização do medicamento pré-estabelecidos. Da mesma forma, as dinamizações do medicamento também foram estabelecidas pelo grupo, sendo utilizadas as dinamizações 5cH, 6cH e 30cH do *Zincum metallicum* e seus controles, estipulados como

sendo os veículos de preparação, lactose, seguindo os mesmos protocolos de preparo e as mesmas dinâmizações.

MODELO DE INFECÇÃO MURINA POR *T. cruzi*

O camundongo é o modelo animal mais utilizado para o estudo da infecção experimental por *T. cruzi*. Isso se deve ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, menor custo, fácil domesticação, manutenção e principalmente por apresentar condições patológicas muito semelhantes às humanas, permitindo uma possível extrapolação dos resultados para a espécie humana^{1,2}.

A infecção por *T. cruzi* já foi reproduzida neste modelo em diferentes graus de severidade dependendo da relação parasito-hospedeiro. Já foram reproduzidas também, as fases aguda e crônica da doença, e suas características parasitológicas, imunológicas e histopatológicas³. A avaliação clínica incorpora características adicionais e eficientes para seguir a evolução da infecção neste modelo, além de auxiliar na avaliação de intervenções medicamentosas. Alguns parâmetros foram já estabelecidos em protocolos de pesquisa, tais como avaliação do consumo de água, produção de excretas, características das fezes, peso, movimentação, temperatura corporal, pilo ereção, atividade motora e exploratória. Esses parâmetros permitem diferenciar camundongos infectados ou não por *T. cruzi* e o efeito de intervenções^{4,5}. O camundongo albino suíço não isogênico é o modelo mais utilizado³. Eles são extremamente sensíveis às diversas cepas do parasito e apresentam diferença na resistência quanto ao sexo⁶. O modelo murino 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 por *T. cruzi*⁷. A cepa Y de *T. cruzi* é considerada uma cepa de referência, sendo uma das mais citadas na literatura. Esta cepa apresenta predominantemente formas tripomastigotas sanguíneas delgadas, alta virulência e patogenicidade para camundongos suíços, assim como um determinado grau de resistência a quimioterápicos⁸⁻¹⁰. O curso da infecção por esta cepa, em modelo murino, 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 deles¹¹. Apresenta intenso parasitismo no baço e células fagocíticas do fígado nos primeiros estágios de infecção e mitotropismo nos estágios mais tardios. A cepa Y é considerada também reticulotrópica, apresentando tropismo preferencial para células fagocitárias do baço, fígado e medula óssea sendo denominadas macrofagotrópicas^{7,10,11}. O *T. cruzi* pode ser mantido em laboratório por sucessivas passagens, em animais, na fase aguda da infecção, sem mostrar

alterações de seus parâmetros de infecção, que se mantêm estáveis, mesmo após longos períodos de manutenção em camundongos ou cultura acelular, como sugerido por vários autores^{3,8}.

RESPOSTA IMUNE E O PAPEL DAS CITOCINAS

A infecção por *T. cruzi*, mobiliza diversos mecanismos efetores do sistema imune, havendo a ativação de fatores relacionados à imunidade inata e à imunidade adquirida¹². Conseqüentemente, o parasito passa a ser continuamente combatido, e tem sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro. No entanto, a persistência indefinida do parasito, leva a uma atividade prolongada do sistema imune, culminando no aparecimento de lesões teciduais e, eventualmente de alterações funcionais musculares e nervosas, características da infecção. As células e mecanismos efetores do sistema imune são responsáveis, tanto pelo controle da multiplicação do parasito nos tecidos como pelas lesões locais resultantes da atividade antiparasitária^{3,13}.

Articulando a resposta imune inata e adquirida encontram-se as citocinas, que podem ser organizadas em classes funcionalmente distintas: TNF- α (fator de necrose tumoral), TGF- β (fator de transformação do crescimento β), IL-1 (interleucina-1), IL-6 (interleucina-6) e IL-8 (interleucina-8) que são consideradas a resposta de fase aguda e INF- γ (interferon- γ), IL-2 (interleucina-2), IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13 e IL-15, que são as citocinas ditas reguladoras da função imune adquirida³.

Na infecção por *T. cruzi*, macrófagos secretam IL-12, ativando NK (células natural killer) e estimulando a proliferação de linfócitos Th1. A ativação dessas células resulta na produção de INF- γ que atua diretamente em macrófagos, que apresentam atividade microbicida mediada por óxido nítrico (NO)¹⁴. A citocina pró-inflamatória TNF- α , também produzida durante a infecção por *T. cruzi*, em associação com IL-12 e INF- γ participa desta interação¹⁵.

Estudos conduzidos em modelos experimentais relatam a importância das citocinas na resistência e proteção contra o *T. cruzi*. O papel protetor do INF- γ na infecção por *T. cruzi*¹⁶ foi observado em um estudo onde, animais resistentes quando tratados com anticorpos anti-INF- γ , tornavam-se susceptíveis a infecção¹⁷. A proteção do INF- γ está diretamente relacionado à síntese de NO¹⁸ assim como a sua ação sobre a ativação de macrófagos para produção de outras citocinas protetoras como TNF- α ¹⁹.

Pesquisadores observaram que a administração de IL-12 em camundongos infectados com *T. cruzi* resultou em redução na parasitemia²⁰. Além disso, a neutralização de IL-12 endógena resultou em aumento do parasitismo, bem como diminuição dos níveis de INF- γ ,

demonstrando que o efeito protetor da IL-12 é dependente de IFN- γ e TNF- α . A citocina TNF- α tem um papel importante no preparo da reposta imune adquirida²¹. Esta citocina está envolvida na ativação de leucócitos inflamatórios, estimulação de fagócitos mononucleares para produção de citocinas, coestimulação de linfócitos T e potenciação da lise mediada por linfócitos T citotóxicos¹². Além disso, o TNF- α , IL-6 e IL-1 modulam a expressão de moléculas de adesão, que participam no recrutamento de linfócitos para os sítios de inflamação²². Além do importante papel das citocinas na proteção contra o parasito, seu papel na mortalidade de animais infectados também é relevante. A mortalidade de animais infectados com *T. cruzi* experimentalmente é consequência da ação do parasito, assim como da resposta imune do hospedeiro³. A multiplicação descontrolada do parasito pode levar a morte de animais susceptíveis, porém esse efeito é evitado por citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α , IFN- γ . No entanto, em hospedeiros resistentes, a mortalidade é prevenida por uma associação dos efeitos antiparasitários de citocinas Th1 com efeitos antagônicos de citocinas antiinflamatórias Th2 como IL-10, TGF- β , IL-4 exercidos sobre as primeiras. Isto ocorre devido ao fato de as citocinas pró-inflamatórias serem necessárias para controlar o parasitismo, mas quando produzidas em excesso, exercem efeitos tóxicos, letais aos animais²³. Neste contexto, o balanço das citocinas é responsável pela direção da evolução da infecção por *T. cruzi*³.

MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO

A homeopatia é uma especialidade médica e farmacêutica que consiste em ministrar, ao doente, doses mínimas de medicamento para estimular a reação orgânica²⁴. O Ministério da Saúde, em maio de 2006, publicou a portaria nº 971 que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. Esta política aponta para uma série de diretrizes, dentre as quais, a necessidade do desenvolvimento de estudos clínicos e de pesquisa básica envolvendo a homeopatia, os quais precisam ser incentivados no âmbito federal, estadual e municipal²⁵.

Os medicamentos diluídos têm mostrado ser efetivos em diversas infecções experimentais. Muitas pesquisas básicas e clínicas têm sido conduzidas para comprovar os efeitos dos medicamentos homeopáticos, assim como, para elucidar os possíveis mecanismos de ação desta terapêutica²⁶⁻²⁸. Neste sentido, vários modelos experimentais e metodologias modernas têm sido utilizados na avaliação da eficácia de medicamentos homeopáticos, sendo utilizados nestas avaliações parâmetros parasitológicos, moleculares, hematológicos, imunológicos entre outros²⁹⁻³¹. Como resultados destes estudos na infecção murina experimental com *T. cruzi*

temos que os medicamentos homeopáticos afetam o equilíbrio imunológico do hospedeiro. Variáveis como frequência de administração, a dinamização da medicação, a escolha do medicamento, e suas combinações podem interferir no efeito dos medicamentos homeopáticos²⁷⁻³¹.

Zincum metallicum

O zinco é um elemento essencial, que atua em diversos mecanismos fisiológicos, imunológicos e bioquímicos do organismo³². O composto atua como co-fator de mais de 300 enzimas necessárias para o crescimento e desenvolvimento normais de células, síntese de DNA, funções neurosensoriais e ação antioxidante, entre outros^{33,34}. O zinco destaca-se devido os seus efeitos sobre as funções imunológicas e regulatórias, resistência a doenças e melhoria da saúde^{33,35,36}. Na homeopatia o zinco recebe o nome de *Zincum metallicum*, e é prescrito para os distúrbios do sistema nervoso³⁷.

JUSTIFICATIVAS

Considerando que o presente estudo está inserido em um projeto multicêntrico com objetivo de produzir evidências biológicas do medicamento homeopático *Zincum metallicum* em diferentes laboratórios.

Considerando que o modelo de avaliação adotado em nosso estudo é o modelo murino de infecção experimental por *T. cruzi*, modelo bem conhecido e largamente utilizado na avaliação de intervenções medicamentosas³.

Considerando que a literatura conta com vários estudos que mostram a utilização de medicamentos homeopáticos em infecções parasitárias, inclusive na infecção pelo *T. cruzi*. E demonstram que tanto a dinamização, o esquema de tratamento quanto o insumo ativo utilizado podem interferir no efeito dos medicamentos homeopáticos²⁷⁻³¹.

No anseio de entender melhor os efeitos dos medicamentos homeopáticos dentro do estudo multicêntrico, utilizamos o modelo de infecção murina por *T. cruzi* para avaliar o efeito do medicamento *Zincum metallicum* nas dinamizações 5cH, 6cH e 30cH.

OBJETIVO

GERAL

Como parte de um estudo multicêntrico, este trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito do medicamento *Zincum metallicum*, sobre os aspectos, clínicos, parasitológicos e imunológicos na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do *Zincum metallicum* nas dinamizações 5cH, 6cH e 30 cH, na evolução da infecção aguda experimental de camundongos por *T. cruzi*;

Avaliar o efeito da lactose (veículo de preparação do Zn) nas mesmas diluições 5cH, 6cH e 30cH na evolução da infecção aguda experimental de camundongos por *T. cruzi*;

Avaliar parâmetros clínicos de animais infectados por *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com *Zincum metallicum* e lactose;

Avaliar parâmetros parasitológicos de animais infectados por *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com *Zincum metallicum* e lactose;

Avaliar o balanço de citocinas na imunomodulação da fase aguda de camundongos infectados por *T. cruzi* e tratados com *Zincum metallicum* e lactose.

Referências Bibliográficas:

1. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: Critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta CirBras*2004; 19: 59-65.
2. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: O camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007; 28: 11-23.
3. Araújo-Jorge TC. Modelos experimentais para o estudo in vivo da doença de Chagas: Camundongo. In: Araújo-Jorge TC, Castro SL. (Eds.) *Doença de Chagas: Manual de experimentação animal*. Fiocruz Inc 2000; 133-139.
4. Falkowski GJS, Braga CF, Aleixo DL, Sandri PF, Araújo SM. 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; 1: 1-1. Disponível em: <http://homeopatia.itarget.com.br/Acesso em: 30 de novembro de 2014>.
5. 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* 2012; 107(2): 211-216.
6. Soares RCO, Soares CS, Franzói-de-Moraes SM, Batista MR, Kwabara HN, Souza AMR, *et al.* Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. *Ver Bras Med Esporte* 2012; 18(1): 51-57.
7. Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *Parasitol* 1978; 64(3): 475-482.
8. Pinto PLS, Takami R, Nune EV, Guilherme CS, Oliveira OC, Gama-Rodrigues J, *et al.* Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. *Rev Hosp Clin* 1999; 54(5): 141-146.
9. 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* 1952; 16: 3-12.
10. Silva LHP, Nussenweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clín Biol* 1953; 20: 91-207.
11. 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 2010; 277-305.
12. Abbas KA, Litchman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
13. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 2002; 18(6): 262-265.

14. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibited by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2501-2506.
15. Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a co stimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(18): 8676-8680.
16. Antúnez MI, Cardoni RL. Early IFN- γ production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* 2001; 79(3): 189-196.
17. Torrico F, Heremans H, Rivera T, Van Marck E.; Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 1991; 146(10): 3626-3632.
18. Lieke T, Steeg C, Graefe SE, Fleischer B, Jacobs T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2006; 145(2): 357-364.
19. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25(12): 677-686.
20. Hunter CA, Slifer T, Araujo F. Interleukin-12 mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun* 1996; 64(7): 2381-2386.
21. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258): 50-54.
22. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 1996; 64(6): 1961-1967.
23. Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH, Vassalli P, Minoprio P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 1997; 65(2): 457-465.
24. Farmacopéia Homeopática Brasileira. 3ª edição. Ministério da Saúde, 2011. Brasília. DF. Brasil.
25. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 04 de maio de 2006. Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php?Id=22773&word=Política Nacional de Medicina Natural e Práticas complementares>. Acesso em: março de 2009.

26. Queiroz AO, Xavier SCC, Faria KG, Bernardo RR, Leitão TCA. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: Um Estudo *In Vivo*. *Cultura Homeopática* 2006; 17: 9-13.
27. Aleixo DL, Ferraz FN, Ferreira EC, Lana M, Gomes ML, Filho BAA, Araújo SM. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. *BMC Research Notes* 2012; 5(352): 1-8.
28. Ferraz FN, Simoni GK, Nascimento A, Melo CS, Aleixo DL, Gomes ML, *et al.* Different forms of administration of biotherapy 7dh in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. *Homeopathy* 2011; 100(4): 237-243.
29. Billotti C, Ferraz FN, Spack M, Nascimento Júnior AD, Panza S, Alvares AA, *et al.* Parâmetros hematológicos em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com bioterápicos. *Brazilian Homeopathic Journal* 2009; 11: 9-10.
30. 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*. *Int J High Dilution Res* 2011; 10(36): 125-127.
31. Ferraz FN, Gonçalves VA, Aleixo DL, Mizutani AS, Araújo SM. Evaluation of biotherapies *T. cruzi* 15x, 16x, 17x and “potency chords” in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Int J High Dilution Res* 2011; 10(36): 130-133.
32. Dardene M. Zinc and immune function. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:20–23.
33. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(2): 447- 463.
34. Wood RJ. Assessment of marginal zinc status in humans. *J Nutr* 2000; 130(5):1350–1354.
35. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med* 2000; 34(4):246-51.
36. Cordova A, Alvarez-mon M. Behaviour of zinc in physical exercise: A special reference to immunity and fatigue. *Neurosci Biobehav Rev* 1995; 19(3): 439-45.
37. LATHOUD. *Matéria Médica Homeopática*. Buenos Aires, Editorial Albatroz, 1980; 868.

CAPÍTULO II

Artigo: “AVALIAÇÃO MULTICÊNTRICA DO *Zincum metallicum* EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS: MODELO DE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*.”

INTRODUÇÃO

A homeopatia é uma especialidade médica e farmacêutica que consiste em ministrar, ao doente, doses mínimas do medicamento para estimular a reação orgânica¹, e tem se mostrado uma alternativa segura e de baixo custo para diversas patologias²⁻⁴. Dada sua importância e crescimento na utilização, a homeopatia, juntamente com outras práticas integrativas de saúde, tem recebido apoio de organizações de saúde nacionais e internacionais que estabelecem normativas que apoiam seu uso. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde que apresenta uma série de diretrizes apoiando o desenvolvimento de estudos clínicos e de pesquisa básica envolvendo a homeopatia^{5,6}.

Na pesquisa experimental básica e clínica, modelos e metodologias diversos têm sido utilizados na avaliação da eficácia de medicamentos homeopáticos. Têm sido avaliados parâmetros clínicos, parasitológicos, moleculares, hematológicos, imunológicos entre outros⁷⁻¹⁵. Este trabalho faz parte de um Projeto multicêntrico internacional para estudo de efeitos e mecanismos de medicamentos altamente diluídos em, que o medicamento *Zincum metallicum*, que é uma substância pura e apresenta capacidade de modular resposta imune¹³, foi escolhido para ser avaliado em diferentes modelos experimentais, em cinco diferentes grupos de instituições de pesquisa brasileira e europeia.

O modelo experimental de infecção com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, utilizando camundongos suíços, não isogênicos, foi eleito por nosso grupo^{7-9,12}. Este modelo é bem conhecido e possui um grande número de dados publicados, que podem contribuir para o entendimento da ação de novas drogas. Além disso, permite a avaliação de uma variedade de parâmetros que são também observados na infecção humana¹⁶. A utilização deste modelo mostrou, em diversos estudos que, a dinamização, o esquema de tratamento e o insumo ativo utilizados podem interferir no efeito dos medicamentos dinamizados^{7,8}. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar em um estudo multicêntrico o efeito de diversas dinamizações de *Zincum metallicum* comparando o efeito do medicamento preparado com lactose, veículo de diluição do *Zincum metallicum*, considerando o modelo de infecção experimental murina por *T. cruzi*, avaliando parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental: O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado e randomizado, utilizando 136 camundongos machos, suíços, de oito semanas de idade,

provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos no biotério climatizado, sob temperatura controlada ($22,7 \pm 1,2$ °C), ciclos de luz/escuro de 12 horas, água e ração *ad libitum*.

Infecção e grupos experimentais: Os animais foram infectados por via intraperitoneal com 1.400 tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y^{17,18}. Os animais infectados foram divididos em oito grupos (n=17) de acordo com o tratamento: Grupos de animais infectados, tratados com *Zincum metallicum* em diferentes diluições: 5cHZn – *Zincum metallicum*1:10¹⁰; 6cHZn – *Zincum metallicum*1:10¹²; 30cHZn – *Zincum metallicum*1:10⁶⁰. Grupos de animais infectados tratados com o insumo inerte (Lactose) em diferentes diluições: 5cHLac - Lactose 1:10¹⁰, 6cHLac – Lactose 1:10¹², 30cHLac - Lactose 1:10⁶⁰. Grupos controle de animais infectados e não infectados, não submetidos ao tratamento: CI - Controle de infecção; CNI - Controle não infectado.

Preparo das substâncias:

As preparações partiram da dinamização 3cH *Zincum metallicum* e 3cH lactose fornecidos pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) grupo integrante no estudo multicêntrico, juntamente com um protocolo para continuar a manipulação, homogeneizando a origem e preparo do medicamento entre os grupos do projeto multicêntrico. *Zincum metallicum* - foi preparado nas dinamizações 5cH, 6cH e 30cH, segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira¹⁹ para substâncias insolúveis, utilizando o dinamizador mecânico (DENISE® Campinas-SP). **Lactose** - foi preparada nas dinamizações 5cH, 6cH e 30cH, seguindo as mesmas técnica de preparo para o *Zincum metallicum*, sem conter a substância *Zincum metallicum*, constituindo o controle de preparação do *Zincum metallicum*.

Controle de qualidade: As substâncias foram submetidas ao controle de qualidade utilizando testes microbiológicos, e testes físico-químicos (pH, condutividade e detecção de íons) de acordo com os ensaios de pureza descritos na Farmacopeia Homeopática Brasileira para água purificada¹⁹.

Esquema de tratamento: As substâncias foram administradas por via oral, diluídas em água (1mL/100 mL de água), oferecidas *ad libitum*, em bebedouro âmbar, 48 horas antes da infecção, ficando disponível aos animais nas primeiras 16 horas. Após a infecção o medicamento foi administrado de 56 em 56 horas, por 16 horas ininterruptas, até o 9º dia de infecção de acordo com protocolo estabelecido pelo laboratório.

Ética: A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Experimental da Universidade Estadual de Maringá sob a legislação brasileira para o uso de experimentação animal (Lei Federal número 6.638/1979). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA-UEM), parecer 091/2013, respeitando as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que é uma instituição vinculada ao Conselho Internacional para o Laboratório de Ciência Animal.

Parâmetros avaliados:

Parâmetros clínicos: peso medido individualmente expresso em gramas em balança digital; temperatura expressa em graus centígrados, medida individualmente na região anterior da coxa traseira esquerda (menor quantidade de pelos) utilizando termômetro digital; consumo de ração e água expressa em gramas e mililitro, medidos em balança digital e em proveta graduada, respectivamente. Os valores de consumo de ração e água foram avaliados coletivamente, considerando o valor inicial oferecido ao grupo subtraído do valor medido após um dia de consumo. O valor obtido foi dividido pelo número de animais para estimar os valores individuais; A quantidade de excretas foi expressa em gramas, obtida pela pesagem da cama das gaiolas após um dia de uso subtraída do valor da pesagem antes do uso. Foram consideradas fezes e urina conjuntamente. Todos os animais foram avaliados clinicamente durante seis dias antes da infecção, e após a infecção, diariamente, em horário padronizado (entre 7:00 e 8:00 a.m.).

Parâmetros parasitológicos: A parasitemia foi avaliada diariamente, até a morte do animal ou até a negativação do exame por três dias consecutivos, utilizando a técnica de Brener¹⁷. A curva de parasitemia foi traçada utilizando a parasitemia média dos animais inoculados para cada grupo. A partir da curva de parasitemia foram obtidos os dados de período pré-patente (o tempo de infecção para detecção do parasito no sangue), período patente (o período que a parasitemia pode ser detectada no sangue), porcentual de infectividade (porcentagem de animais que se infectam considerando cada grupo experimental), pico de parasitemia (maior parasitemia média observada), parasitemia total (média da soma da parasitemia de cada camundongo ao longo do experimento), taxa de mortalidade (total de animais mortos em relação ao número de infetados, observada por até 30 dias de infecção), tempo de sobrevivência (tempo médio de vida de animais sobreviventes, em dias, após a infecção).

Dosagem de citocinas: As dosagens foram realizadas com soro coletado de três animais por grupo eutanasiados nos tempos 0 (antes da infecção), 8º e 12º dias após a infecção. Foram dosadas as citocinas: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-

CSF), Interferon Gama (IFN- γ), Interleucina-1 alfa (IL-1 α), Interleucina-1 Beta (IL-1 β), Interleucina2 (IL-2), Interleucina4 (IL-4), Interleucina6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina-12 (IL-12) (p40/p70) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) em 50 μ L de soro. Foi utilizado o kit Mouse Cytokine 10-plex panel (Invitrogen®,USA). A reação foi realizada de acordo com orientações do fabricante e a fluorescência lida em leitor Luminex (Luminex ®200™xPONENT). As concentrações das citocinas foram expressas em picogramas/mL. O resultado final foi expresso em média \pm desvio padrão das concentrações obtidas dos animais utilizados para cada grupo.

Análise estatística: Os dados foram analisados estatisticamente no software Statistica 8.0 e R. 3.0.2 e foram expressos em valores de média e desvio padrão. Foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk para analisar a normalidade e Análise de Variância One-Way (ANOVA), seguida do teste post-hoc LSD. Foi realizada análise não paramétrica de sobrevivência pelo estimador de Kaplan-Meier e o teste de Logrank. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros clínicos: Os parâmetros clínicos foram avaliados diariamente para cada animal dos diferentes grupos experimentais e estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Valores de média e desvio padrão dos parâmetros clínicos avaliados em camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos.

Grupo experimental	Água (mL)	Ração (g)	Peso (g)	Excreta (g)	Temperatura (°C)
CI	9.4 \pm 2.3 ^a	7.3 \pm 1.9 ^a	41.9 \pm 4.1 ^a	7.4 \pm 2.1 ^a	32.4 \pm 2.2 ^b
CNI	9.8 \pm 3.4 ^{a,d}	6.4 \pm 1.1 ^a	38.1 \pm 4.2 ^b	5.7 \pm 1.8 ^{b,d}	32.3 \pm 2.1 ^a
5cHZn	7.7 \pm 1.7 ^{b,c,d}	5.9 \pm 1.6 ^b	39.0 \pm 4.4 ^c	5.6 \pm 1.8 ^b	32.0 \pm 2.0 ^d
5cHLac	7.3 \pm 1.7 ^b	5.4 \pm 1.6 ^b	37.6 \pm 5.0 ^b	5.2 \pm 1.4 ^c	31.7 \pm 2.1 ^c
6cHZn	7.4 \pm 2.4 ^{b,d}	6.4 \pm 2.3 ^d	41.3 \pm 3.4 ^a	6.0 \pm 2.1 ^d	31.9 \pm 2.2 ^a
6cHLac	7.4 \pm 2.0 ^b	5.8 \pm 2.0 ^{b,d}	38.6 \pm 5.7 ^b	5.3 \pm 1.6 ^c	31.7 \pm 2.0 ^d
30cHZn	6.8 \pm 2.2 ^b	5.7 \pm 1.9 ^c	39.6 \pm 5.3 ^c	5.3 \pm 1.7 ^c	31.9 \pm 1.9 ^{c,d}
30cHLac	7.4 \pm 2.1 ^{a,c}	5.7 \pm 2.0 ^b	38.2 \pm 4.9 ^b	5.5 \pm 1.9 ^b	32.3 \pm 2.2 ^{c,d}

Parâmetros clínicos: Ingestão de água (mL), Ingestão de ração (g), Peso (g), eliminação de excretas (g), temperatura (°C). Diferentes letras em uma coluna significam diferença estatística ($p \leq 0,05$). Teste p(ANOVA + LSD). Grupos: Controle infectado (CI), 5cHZn (tratado com *Zincum metallicum* 1:10¹⁰), 5cHLac (tratado com

lactose 1:10¹⁰), 6cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10¹²), 6cHLac (tratado com lactose 1:10¹²) 30cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10⁶⁰), 30cHLac (tratado com lactose 1:10⁶⁰).

Na avaliação da ingestão de água, os grupos 5cHZn, 6cHZn e 30cHLac apresentaram valores semelhantes aos observados no grupo CNI ($p < 0,0001$). Mesmo que não tenha sido observada diferença de consumo entre animais sadios e infectados sem tratamento neste experimento, animais infectados consomem menos água que animais sadios⁹ e a aproximação dos resultados observados, nestes grupos, aos valores observados no grupo não infectado sugerem melhor estado natural destes grupos de animais, refletindo em relação parasito-hospedeiro mais equilibrada, com melhor proveito dos benefícios de alguns dos medicamentos utilizados. Para o consumo de ração os grupos tratados mostraram menor ingestão de ração que os observados nos grupos CI e CNI ($p = 0,0092$), no entanto, quando é avaliado o peso dos animais, observa-se que os grupos 5cHLac, 6cHLac e 30cHLac foram semelhantes ao grupo CNI ($p < 0,0001$). Foi possível verificar que o grupo 6cHZn, que apresentou-se mais debilitado, apresentou valores de peso semelhante aos animais do grupo CI, o que aparece na literatura como sendo reflexo do curso do processo de instalação da infecção murina por *T. cruzi*, no qual o animal torna-se debilitado, caquético, com edema generalizado^{9,20}. Na avaliação da quantidade de excretas eliminadas, que informam sobre a fisiologia e metabolismo dos animais, os grupos 5cHZn, 6cHZn e 30cHLac não foram estatisticamente diferentes do grupo não infectado ($p < 0,0001$), mostrando valores mais elevados que os demais grupos tratados. Esta característica pode estar relacionada aos valores de peso que se mantiveram iguais aos observados nos animais não infectados. Estudos mostram que, frente ao dano causado pela infecção murina por *T. cruzi*, o organismo tende a se modificar na busca do reestabelecimento do equilíbrio, em benefício do hospedeiro. A melhor conversão alimentar já foi descrita em outros modelos tratados com medicamentos homeopáticos²¹⁻²³. Em ratos *Wistar* infectados por altos inóculos de *T. cruzi*, a utilização de medicamento dinamizado e diluído promoveu aumento do comprimento do cólon²⁴ com manutenção da população neuronal²⁵, reforçando a ideia de que o organismo se movimenta em direção a um equilíbrio. Considerando a avaliação de temperatura nos animais dos diferentes grupos experimentais foi possível observar que os valores foram bastante aproximados entre os grupos infectados, com pequena queda de temperatura, quando comparados com grupo não infectado ($p < 0,0001$). Embora dados de nosso laboratório mostrem elevação da temperatura neste modelo^{24,26} e outros estudos informem que temperaturas mais elevadas estão ligadas a ativação da resposta imunológica²⁷, neste estudo observou-se modulação positiva do sistema imunológico, com resultado final de benefício para alguns dos grupos tratados (5cHZn,

5cHLac, 6cHZn, 6cHLac, 30cHZn, 30cHLac) sem aumento de temperatura. Estes dados podem estar relacionados a diferentes mecanismos de controle da infecção considerando trabalhos anteriores^{24,26}. No presente trabalho, foi possível observar uma melhora clínica em alguns grupos tratados. Os efeitos observados são indicativos de interferência positiva do tratamento com medicamento diluído no eixo metabólico neuro-psico-imuno-endócrino, um sistema integrado que promove uma resposta biológica do hospedeiro frente ao parasito e favorece a recuperação clínica dos animais regulando a homeostase orgânica²⁸. No sistema integrado que promove uma resposta biológica, a avaliação clínica de modelos murinos experimentais envolve a individualidade de comportamento inerente aos sistemas biológicos complexos podendo ser os resultados muito variáveis e as diferenças observadas sutis nem sempre apresentam diferença estatística entre os grupos para todos os parâmetros avaliados.

Parâmetros parasitológicos: Os parâmetros parasitológicos foram avaliados diariamente para cada animal dos diferentes grupos experimentais. Os valores estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de média e desvio padrão dos parâmetros parasitológicos avaliados em camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos.

Grupo experimental	Curva de parasitemia(x10 ⁵)	P _{total} (x10 ⁵)	Pic dia(x10 ⁵)	8 ^o	PPP (dias)	PP (dias)
CI	6.96±16.76 ^a	85.03±45.26 ^a	40.95±29.51 ^a		4.3±0.7 ^{c,d}	6.4±3.0 ^a
5cHZn	6.48±16.65 ^a	107.82±36.82 ^d	53.50±28.60 ^a		4.5±1.3 ^a	8.4±2.9 ^c
5cHLac	6.85±17.00 ^a	114.20±30.35 ^c	63.60±20.80 ^b		4.3±0.9 ^c	8.8±3.1 ^c
6cHZn	8.48±17.51 ^a	113.65±38.43 ^c	55.90±17.61 ^a		4.2±0.5 ^d	7.1±2.7 ^b
6cHLac	9.48±20.66 ^a	139.29±43.81 ^b	69.90±22.38 ^b		4.4±0.7 ^c	9.7±4.3 ^d
30cHZn	9.10±20.88 ^a	119.41±35.00 ^c	66.75±28.02 ^b		4.3±0.9 ^c	8.4±2.8 ^c
30cHLac	6.12±16.32 ^a	105.08±41.50 ^d	58.75±30.50 ^b		4.0±0.6 ^b	9.8±3.9 ^d

Parâmetros parasitológicos: curva de parasitemia (número de tripomastigotas x 10⁵/mL), P_{total} = soma da média dos níveis de parasitemia diária para cada camundongo; P_{8^o dia} – média da parasitemia no 8^o dia de infecção; PPP= período pré-patente; PP = período patente. Diferentes letras em uma coluna significam diferença estatística (p≤0.05). Teste p(ANOVA + LSD). Grupos: Controle infectado (CI), 5cHZn (tratado com *Zincum metallicum* 1:10¹⁰), 5cHLac (tratado com lactose 1:10¹⁰), 6cHZn (tratado com *Zincum metallicum* 1:10¹²), 6cHLac (tratado com lactose 1:10¹²) 30cHZn (tratado com *Zincum metallicum* 1:10⁶⁰), 30cHLac (tratado com lactose 1:10⁶⁰).

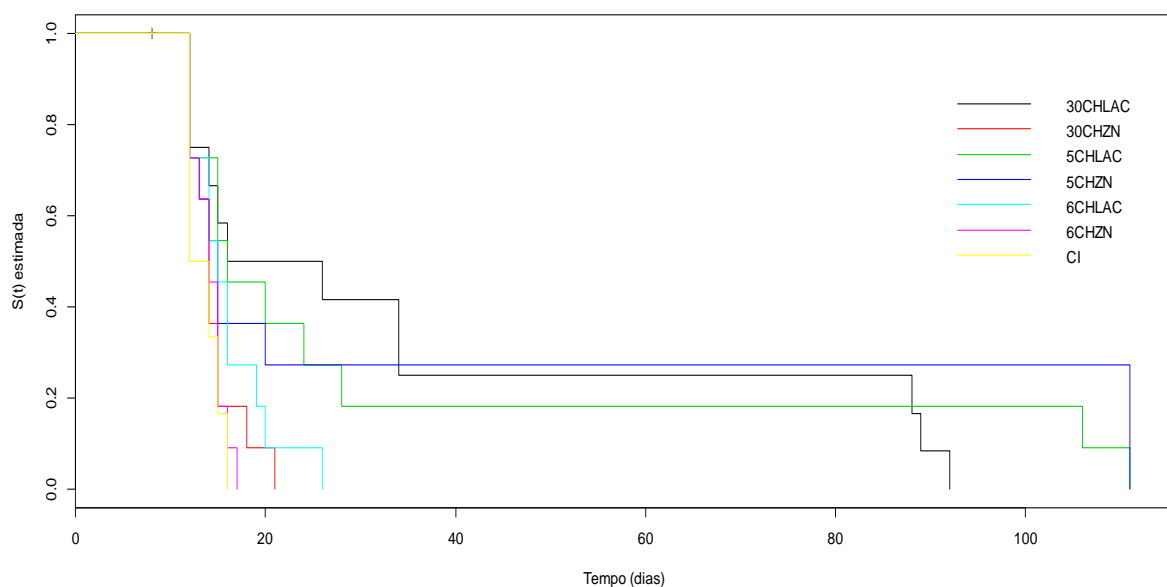
Foi possível observar que não houve variação significativa na curva de parasitemia entre os grupos. Os grupos tratados apresentaram maior parasitemia total que os grupos não tratados (p<0,0001). Na infecção murina por *T. cruzi*, a morbidade está ligada a parasitemia²⁹. Entretanto, a relação parasito hospedeiro é fundamental para a evolução da infecção que é

mais letal quando o equilíbrio desta relação está comprometido^{30,31}. Estudos realizados por nosso grupo relatam a possibilidade de aumento na parasitemia quando animais com maior suscetibilidade ao *T. cruzi*, como camundongos suíços, são submetidos ao tratamento com medicamento dinamizado^{7,32}, mostrando uma relação indireta entre parasitemia e morbidade nestes animais. Outros modelos de infecção mostram também uma relação indireta entre carga parasitária e morbidade quando utilizado medicamento diluído, parecendo esta ser uma característica destes tratamentos³³, sendo que o sucesso do tratamento vai depender de um conjunto de fatores que envolvem o medicamento^{25,32}, esquema de tratamento^{7,8} e o maior equilíbrio da relação parasito-hospedeiro. A análise da parasitemia total mostrou linearidade de resposta para o tratamento com *Zincum metallicum* e lactose considerando as dinamizações 5cH e 6cH. Este resultado está de acordo com o princípio da linearidade de resposta em farmacologia, de forma inversa, uma vez que apesar de nas dinamizações 5cH e 6cH ainda serem encontradas moléculas nas preparações medicamentosas³⁴, na dinamização 6cH a concentração de Zn ou lactose é cem vezes menor que nas preparações 5cH, significando que quando se diminui a quantidade de moléculas dinamizadas oferecidas aos animais infectados, a parasitemia total aumenta, impondo ao organismo necessidades de mobilização de respostas diferentes. Avaliando o PP verifica-se valores mais elevados nos grupos tratados comparados ao grupo CI ($p < 0,0001$) que é compatível com o aumento significativo da parasitemia total nestes grupos sugerindo que a ação do medicamento passa por provocar condição de doença mais grave que se controlada pelo organismo promoverá resultantes positivas dependendo da capacidade do organismo em equilibrar o desconforto gerado. A melhor adequação de medicamento e esquema terapêutico é a discussão deste dado que deve ser aprofundada considerando os achados de outros autores^{7,8,25,32}. No parâmetro PPP, o grupo 5cHZn apresentou valores estatisticamente maiores que os demais grupos, inclusive o grupo CI ($p < 0,0001$). Aleixo e colaboradores⁸ mostraram que o aumento do PPP está diretamente relacionado a um aumento da sobrevivência dos animais, sugerindo melhor prognóstico neste modelo experimental, refletindo benefício do tratamento com 5cHZn.

Análise de sobrevivência dos animais: A figura 1 e as tabelas 3 e 4 resumem os dados para a sobrevivência. Nos grupos 5cHZn e 5cHLac houve sobrevivência de pelo menos um animal por grupo, por todo o período avaliado (figura 1). Os grupos 5cHLac ($p = 0,0377$) e 30cHLac ($p = 0,0314$), apresentaram aumento significativo do tempo de vida estimado quando comparados ao grupo CI (tabela 3). O grupo 30cHLac apresentou maior tempo de vida estimada em relação ao grupo 30cHZn ($p = 0,0167$) (tabela 3). As comparações entre as

potências, tanto para os grupos tratados com *Zincum metallicum* quanto para os grupos tratados com Lactose não apresentaram diferença significativa. A análise da tabela 2 explica a pior evolução do grupo 5cHZn em relação ao grupo 5cHLac, embora o tempo estimado de vida esteja muito próximo. A probabilidade dos animais do grupo 5cHZn sobreviver até o 15º dia de infecção é 0.364 enquanto para o grupo 5cHLac é 0.5455. Este dado mostra superioridade de efeito positivo do grupo 5cHLac, uma vez que a literatura relata mortalidade da totalidade dos animais infectados por esta cepa, neste modelo experimental¹⁸.

Figura 1: Curva da análise de camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos.



Grupos: Controle infectado (CI), 5cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10¹⁰), 5cHLac (tratado com lactose 1:10¹⁰), 6cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10¹²), 6cHLac (tratado com lactose 1:10¹²), 30cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10⁶⁰), 30cHLac (tratado com lactose 1:10⁶⁰). *Foi observado 100% de sobrevivência para o grupo CNI, não incluído neste gráfico.

Tabela 3: Valores da comparação do tempo de vida estimada (dias) de camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos.

Comparação entre grupos (tempo de vida *P* estimada em dias)

CI (3.35) versus 5cHZn (15.71)	0.1530
CI (3.35) versus 6cHZn (7.09)	0.5490
CI (3.35) versus 30cHZn (7.21)	0.4800
CI (3.35) versus 5cHLac (14.59)	0.0377*

CI (3.35) versus 6cHLac (9.29)	0.1430
CI (3.35) versus 30cHLac (15.76)	0.0314*
5cHZn (15.71) versus 5cHLac (14.59)	0.7980
6cHZn (7.09) versus 6cHLac (9.29)	0.1460
30cHZn (7.21) versus 30cHLac (15.76)	0.0167*

*Diferença estatística ($p \leq 0.05$). Grupos: Controle infectado (CI), 5cHZn (tratado com *Zincum metallicum* 1:10¹⁰), 5cHLac (tratado com lactose 1:10¹⁰), 6cHZn (tratado com *Zincum metallicum* 1:10¹²), 6cHLac (tratado com lactose 1:10¹²), 30cHZn (tratado com *Zincum metallicum* 1:10⁶⁰), 30cHLac (tratado com lactose 1:10⁶⁰). *Foi observado 100% de sobrevivência para o grupo CNI, não incluído nesta tabela.

Tabela 4: Probabilidade de sobrevivência e intervalo de confiança até 15 dias após a infecção para camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos.

Tempo	Ocorrências de mortes	Probabilidade de sobrevivência	IC 95%	
CI				
12	3	0.500	0.2246	1.000
14	1	0.333	0.1075	1.000
15	1	0.167	0.0278	0.997
5cHZn				
12	3	0.727	0.506	1.000
13	1	0.636	0.407	0.995
14	1	0.545	0.318	0.936
15	2	0.364	0.166	0.795
5cHLac				
12	3	0.7273	0.5064	1.000
15	2	0.5455	0.3180	0.936
6cHZn				
12	3	0.7273	0.5064	1.000
13	1	0.6364	0.4071	0.995
14	2	0.4545	0.2379	0.868
15	3	0.1818	0.0519	0.637
6cHLac				
12	3	0.7273	0.5064	1.000
14	2	0.5455	0.3180	0.936
15	1	0.4545	0.2379	0.868
30cHZn				
12	3	0.7273	0.5064	1.000
13	1	0.6364	0.4071	0.995
14	3	0.3636	0.1664	0.795
15	2	0.1818	0.0519	0.637
30cHLac				

12	3	0.7500	0.5410	1.000
14	1	0.6667	0.4468	0.995
15	1	0.5833	0.3616	0.941

Grupos: Controle infectado (CI), 5cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10¹⁰), 5cHLac (tratado com lactose 1:10¹⁰), 6cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10¹²), 6cHLac (tratado com lactose 1:10¹²) 30cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10⁶⁰), 30cHLac (tratado com lactose 1:10⁶⁰). *Foi observado 100% de sobrevivência para o grupo CNI, não incluído nesta tabela.

Dosagem de citocinas: Considerando as diferentes citocinas, os três tempos avaliados e os grupos com melhor (5cHZn e 5cHLac) e pior (6cHZn e 30cHZn) desempenho de evolução da infecção, foram observadas diferenças significativas somente para as citocinas IL-1b, TNF- α , IL-6, IFN- γ (pró-inflamatórias), IL-4, IL-5 (anti-inflamatórias) e GM-CSF (estimuladora de hematopoiese), sendo a maioria no 8º dia de infecção, como resumido na tabela 5. Resumidamente, as citocinas IL-1b, IL4, IL5, IFN- γ e GM-CSF apresentaram menor concentração no grupo 5cHLac comparada ao grupo CI no 8º dia de infecção. No grupo 5cHLac, grupo onde foi observado melhor desempenho do tratamento, houve aumento de parasitemia no 8º dia de infecção, embora com melhor evolução clínica e maior sobrevivência. Estes resultados permitem correlacionar a necessidade de menor concentração das citocinas IL-1b, IL4, IL5, IFN- γ e GM-CSF, ao melhor prognóstico conferido pelo tratamento com 5cHLac no esquema terapêutico estabelecido no presente experimento, mesmo que inicialmente ele provoque aumento de parasitemia³⁵.

Este resultado está coerente com melhor evolução da infecção e maior sobrevivência dos animais que expressaram esta cinética para citocinas pró-inflamatórias, considerando que a infecção por *T. cruzi* é um fenômeno inflamatório por excelência¹⁶ e o sucesso do controle da infecção parece depender de uma modulação negativa destas citocinas. O equilíbrio de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias é outro ponto a ser considerado e já foi discutido por outros autores^{12,35}. A citocina TNF- α tem um papel importante no preparo da resposta imune adquirida³⁶. Esta citocina está envolvida na ativação de leucócitos inflamatórios, estimulação de fagócitos mononucleares para produção de citocinas, co-estimulação de linfócitos T e potenciação da lise mediada por linfócitos T citotóxicos³⁷. Além disso, o TNF- α , IL-6 e IL-1 modulam a expressão de moléculas de adesão, que participam no recrutamento de linfócitos para os sítios de inflamação³⁸. Além do importante papel das citocinas na proteção contra o parasito, seu papel na mortalidade de animais infectados também é relevante. A mortalidade de animais infectados com *T. cruzi* experimentalmente é consequência da ação do parasito, assim como da resposta imune do hospedeiro¹⁶. A multiplicação descontrolada do parasito

pode levar a morte de animais susceptíveis, porém esse efeito é evitado por citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α , IFN- γ . No entanto, em hospedeiros resistentes, a mortalidade é prevenida por uma associação dos efeitos antiparasitários de citocinas Th1 com efeitos antagônicos de citocinas antiinflamatórias Th2 como IL-10, TGF- β , IL-4 exercidos sobre as primeiras. Isto ocorre devido ao fato de as citocinas pró-inflamatórias serem necessárias para controlar o parasitismo, mas quando produzidas em excesso, exercem efeitos tóxicos, letais aos animais ³⁹. Neste contexto, o balanço das citocinas é responsável pela direção da evolução da infecção por *T. cruzi*¹⁶. Em contraposição, a cinética de IL-6 apresentou-se com maior concentração no tempo 0 e menores concentrações no tempo 12 nos grupos com pior evolução, ou seja, 6cHZn e 30cHZn. Considerando que houve tratamento anterior à infecção, esta cinética de IL-6 pode ser correlacionada a uma modulação negativa para controle da infecção experimental murina por *T. cruzi*. Este resultado está de acordo com o papel exercido pela IL-6 que é uma citocina pleiotrópica que tem influência nas reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação⁴⁰. Vários artigos mostram que outros mecanismos imunomodulatórios podem estar envolvidos no sucesso do controle da infecção murina por *T. cruzi*, seja interferindo na carga parasitária^{7,8} ou no processo inflamatório, por exemplo aumento de apoptose¹², o que levaria a diminuição do dano tecidual e devem ser considerados como perspectivas de aprofundamentos das discussões destes dados aqui apresentados.

Tabela 5: Comparação da concentração de citocinas entre grupos considerando dia da infecção para a dosagem e evolução clínica de camundongos suíços, machos, com oito semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, submetidos a diferentes tratamentos.

Citocina	Dia de dosagem	Comparação entre grupos *	Evolução clínica para o grupo em negrito na comparação
IL-1 β	8 12	5cHLac <CI 5cHLac =CNI	FAVORÁVEL
IL-4	8	5cHLac < CI	FAVORÁVEL
IL-5	8	5cHLac < CI	FAVORÁVEL
IL-6	0 0 0 12 12	30cHZn >CI, 5 e 30cHLac 6cHZn >CI, 5 e 6cHLac 6 e 30cHZn >CI e 5cHLac 6 e 30cHZn <CI e 5cHLac 6cHZn <CI e 6cHLac	DESFAVORÁVEL
IFN- γ	8	5cHLac <CI	FAVORÁVEL

TNF-α	0	5cHLac>CI	FAVORÁVEL
	8	5cHLac>CI	
GM-CSF	0	5cHLac>CI	FAVORÁVEL
	8	5cHLac=CNI 5cHLac<CI	

Grupos: CI(Controle infectado), CNI (controle não infectado), 5cHLac(tratado com lactose 1:10¹⁰), 6cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10¹²), 6cHLac(tratado com lactose 1:10¹²) 30cHZn (tratado com *Zincum metallicum*1:10⁶⁰), 30cHLac(tratado com lactose 1:10⁶⁰). ***Foram considerados apenas os grupos com diferença estatística e que apresentaram o melhor e o pior desempenho em relação ao CI.**

Na avaliação geral de todos os parâmetros, o grupo 5cHLac apresentou melhor efeito. Considerando que a lactose é tida como um princípio inerte para preparações homeopáticas insolúveis¹⁹, neste trabalho não se pode ignorar a possibilidade deste princípio apresentar efeito medicamentoso quando dinamizado isoladamente. Essa possibilidade é reforçada se considerarmos que autores sugerem a mudança de lactose por manitol em formulações de pó e tablete para indivíduos diabéticos ou sensíveis a lactose⁴¹. Outro fator relevante é a possibilidade de contaminação do insumo inerte pelo insumo ativo, durante o preparo de medicamentos altamente diluídos⁴². Entretanto, no presente estudo precauções preventivas foram tomadas para evitar esta contaminação. Considerando o composto estudado como possível intervenção na infecção por *T. cruzi*, os dados deste estudo apresentam o *Zincum metallicum* como um composto pouco promissor neste modelo. Porém, considerando este trabalho como parte de um estudo multicêntrico, cujo objetivo é avaliar, em diferentes modelos, a ação do *Zincum metallicum* que por definição conceitual deve ser preparado utilizando em parte do processo a lactose como diluente, os dados gerados são bastante úteis pois mostram efeito de substâncias altamente diluída, considerando os parâmetros estudados, diferenças de efeito entre as dinamizações, e efeito mediado pela modulação de citocinas. Mais experimentos estão em andamento direcionando e aprofundando os estudos sobre o medicamento *Zincum metallicum*.

5. CONCLUSÃO

Os medicamentos produzidos com *Zincum metallicum* apresentaram efeito sobre a infecção murina por *T. cruzi* em todas as dinamizações ensaiadas (5cH,6cH,30cH); a lactose, veículo utilizado para o preparo do *Zincum metallicum*, apresentou efeito sobre a infecção murina por *T. cruzi*, nas dinamizações 5 e 30cH, sendo que o medicamento 5cHLac apresentou o melhor efeito protetor observado no presente estudo, aumentando significativamente a sobrevivência e período pré-patente dos animais infectados, com melhor desempenho clínico, mesmo com o aumento da carga parasitária. O melhor desempenho da dinamização 5cH, mais

especificamente do grupo 5cHLac, relacionou-se com diminuição das citocinas IL-1b, IFN- γ (pró-inflamatória), IL4, IL5 (anti-inflamatória) e GM-CSF (estimulador de macrófagos). Da mesma forma o desempenho negativo dos grupos 6cHZn e 30cHZn relacionou-se com variações significativas de aumento ou redução de IL-6 em relação ao controle de infecção. *Zincum metallicum* e lactose altamente diluídos modulam a resposta imunológica.

REFERÊNCIAS:

1. Hahnemann S. Doenças crônicas. São Paulo: GEHSP “Benoit Mure”. 1835; 202.
2. Silva AS, Faccio L, Otto MA, Ripoli FL, Monteiro SG, Sharom A. Homeopatia no tratamento de camundongos (*Mus musculus*) naturalmente infectados por *Giardia muris*. Caderno de Pesquisa série Biologia 2007; 20(1): 15-21.
3. Braga CF, Falkowski GJS, Moreira NM, Aleixo DL, Araújo SM. Biotherapeutic 200 DH reduces cerebral parasitism in mice infected with *Toxoplasma gondii*. Int J High Dilution Res 2011; 10(36):158-162.
4. Lira-Salazar G, Marines-Montiel L, Torres-Monzón J, Hernández- Hernández F, Salas-Benito JS. Effects of homeopathic medications *Eupatorium perfoliatum* and *Arsenicum album* on parasitemia of *Plasmodium berghei*-infected mice. Homeopathy 2006; 95(4):223-8.
5. Brasil Ministério da Saúde. Gabinete de ministro. Portaria nº971, de 03 de maio de 2006. Diário Oficial da União, Brasília (DF). 2006; 1(84): 20-25.
6. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005, Ginebra, Organización Mundial de la Salud 2002; 65.
7. Ferraz FN, Simoni GK, Nascimento A, Melo CS, Aleixo DL, Gomes ML, *et al.* Different forms of administration of biotherapy 7dh in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. Homeopathy 2011; 100(4): 237-243.
8. Aleixo DL, Ferraz FN, Ferreira EC, Lana M, Gomes ML, Filho BAA, Araújo SM. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. BMC Research Notes 2012; 5(352): 1-8.
9. Falkowski GJS, Sandri PF, Tiyo R, Aleixo DL, Araújo SM. Parameters for evaluation of clinical trial in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Arq Bras Med Vet Zootec 2012a; 64:1539-1546.
10. Aleixo DL, Ferraz FN, Melo CS, Gomes ML, Toledo MJ, Kaneshima EM, *et al.* Changes of RAPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole. Homeopathy 2008; 97: 59–64.
11. Billotti C, Ferraz FN, Spack M, Nascimento Júnior AD, Panza S, Alvares AA, *et al.* Parâmetros hematológicos em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com bioterápicos. Brazilian Homeopathic Journal 2009; 11: 9-10.
12. Sandri P, Aleixo DL, Falkowski GJS, Nascimento Júnior AD, Gomes ML, Hernandes L, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Biotherapy made from trypomastigote modulates the inflammatory response. Homeopathy 2014; 1-9.

13. Mariani E, Mangialasche F, Feliziani FT, Cecchetti R, Malavolta M, Bastiani P, *et al.* Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. *Exp Gerontol* 2007; 43 (5): 445-51.
14. Santana FR, Coelho CP, Cardoso TN, Laurenti MD, Hurtado ECP, Bonamin LV. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Thymulin 5cH. *Homeopathy* 2014a;103(4): 275–284.
15. Santana FR, Coelho CP, Cardoso TN, Laurenti MD, Hurtado ECP, Bonamin LV. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: *Antimonium crudum* 30cH. *Homeopathy* 2014b; 103: 264-274.
16. Araújo-Jorge TC, Modelos experimentais para o estudo in vivo da doença de Chagas: Camundongo, In: Araújo-Jorge TC, Castro SL (Eds.), *Doença de Chagas: Manual de experimentação animal*. Fiocruz Inc., 2000; 133-139.
17. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop* 1962; 4:389-96.
18. Silva LHP, Nussenweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clín Biol* 1953; 20: 191-207.
19. Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ªed, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf>.
20. Truyens C, Torrico F, Lucas R, Baetelier P, Buurman WA, Carlier Y. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun* 1999; 67:5579-5586.
21. Monteiro da Silva SL, Arcanjo AHM, Pinto LDR, Rosa GP, Souza GH. Gain of mass between two profiles of treatments to pigs with Self-Organizing Factors. *Int J High Dilution Res* 2011; 10: 271-282.
22. Soto FR, Vuaden ER, Melville PA, Moreno AM, Bonamin L.V. *et al.* Evaluation of homeopathic and biotherapeutic treatments in a swine farm to control *Escherichia coli* infection: a long term study. *Int J High Dilution Res* 2012; 11: 136-137.
23. Lira AD, Medeiros SC. A homeopatia no controle de parasitoses de peixes. The homeopathy in the control of fish parasites. Available: <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/610.pdf> Accessed: 20 October 2014.
24. Massini PF. (2013) *Rattus norvegicus* infectados com *Trypanosoma cruzi*: efeitos clínicos do tratamento com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* ultradiluídos. Maringá - Paraná: Universidade Estadual de Maringá. 66 p.

25. Brustolin CF. (2014) *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*. Maringá - Paraná: Universidade Estadual de Maringá. 63 p.
26. Benvenuto MJ, Ferraz FN, Veiga FK, Falkowski GJ, Araújo SM. Medicamento homeopático diminui efeitos adversos do tratamento na infecção murina por *T. cruzi*. In: 1 Congresso Médico da Universidade Estadual de Maringá, 2013, Maringá. Anais do 1 Congresso Médico da Universidade Estadual de Maringá, Maringá: Universidade estadual de Maringá, 2013, p.103.
27. Bryant RE, DesPrez RM, VanWay MH, Rogers DE. Studies on human leukocyte motility I. Effects of alterations in pH, electrolyte concentration, and phagocytosis on leukocyte migration, adhesiveness, and aggregation. *J Exp Med* 1966; 124: 483-499.
28. Teixeira MZ. Possíveis contribuições do modelo homeopático à humanização da formação médica. *Revista Brasileira de Educação médica* 2009; 33(3):454-463.
29. 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 2010; 277-305.
30. Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(1):3-24.
31. Higuchi MD. End myocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. São Paulo. *Med J* 1995; 113:821-825.
32. Falkowski GJS, Aleixo DL, Moreira NM, Veiga FK, Araújo SM. Medicamento altamente diluído reduz temporariamente parasitemia de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. *Uningá Review* 2012b; 12(1): 86-95.
33. Aleixo DL, Bonamin LV, Ferraz FN, Veiga FK, Araújo SM. Homeopathy in parasitic diseases. *Int J High Dilution Res* 2014; 13(46): 13-27.
34. Bonamin LV. A homeopatia sob a ótica dos novos paradigmas de ciência: Revisão bibliográfica. *Revista de Homeopatia* 2001; 66(1):27-32.
35. Ciupa L, Veiga FK, Portocarrero AR, Sandri PF, Aleixo DL, Ferraz FN, Araújo SM. *Zincum metallicum* modula produção de citocinas diminuindo danos da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camudongos. Anais de Simpósios do Programa de Biociências e Fisiopatologia – UEM/ Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. Maringá: UEM/PBF 2014; 1: 129-134.
36. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258): 50-54.
37. Abbas KA, Litchman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

38. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 1996; 64(6): 1961-1967.
39. Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH, Vassalli P, Minoprio P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 1997; 65(2): 457-465.
40. Varella PPV, Forte WCN. Citocinas: revisão. *Revista brasileira de alergologia e imunopatologia*. Disponível em: <http://www.asbai.org.br/revistas/Vol244/citocinas.htm>. Acesso em 12/11/2014.
41. Fernandes A, Aguiar TCAL. Um estudo sobre o uso do manitol como insumo inerte homeopático. *Cultura Homeopática*. 2007; 19: 12-15.
42. Bonamin LV, Endler PC. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review. *Homeopathy* 2010; 99:37-50.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que:

- 1) Tanto os grupos tratados com *Zincum metallicum* e lactose, interferiram na evolução da infecção de camundongos suíços por *T. cruzi*;
- 2) Das dinamizações testadas o melhor desempenho nos parâmetros clínicos e parasitológicos foi observado para a 5cH;
- 3) Dos tratamentos utilizados a lactose 5cHLac apresentou melhor desempenho para os parâmetros avaliados.
- 4) Os medicamentos altamente diluídos testados possuem capacidade de modular a infecção experimental murina por *T. cruzi*, alterando a cinética de citocinas produzidas.
- 5) O balanço das citocinas observado neste estudo pode ser relacionado ao equilíbrio da relação parasito-hospedeiro com maior sobrevida.

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Aprofundamento de estudos com a dinamização 5cH avaliando pelo menos:
2. Avaliação da histopatologia nos diferentes grupos experimentais;
3. Correlacionar a cinética de citocinas com o melhor resultado obtido nos medicamentos utilizados;
4. Comparação do envolvimento de apoptose nos diferentes grupos experimentais;
5. Análise de novos parâmetros em equipamentos que possibilitem informações a respeito do mecanismo de ação destes medicamentos.