



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

ÉRIKA CRISTINA FERREIRA

Avaliação do efeito dos medicamentos homeopáticos *Phosphorus* e bioterápico de soro de galinha (*Gallus gallus domesticus*) na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

Maringá
2018

ÉRIKA CRISTINA FERREIRA

Avaliação do efeito dos medicamentos homeopáticos *Phosphorus* e bioterápico de soro de galinha (*Gallus gallus domesticus*) na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, 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: Prof.^a Dr.^a Silvana Marques de Araújo

Maringá
2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

ÉRIKA CRISTINA FERREIRA

Avaliação do efeito dos medicamentos homeopáticos *Phosphorus* e bioterápico de soro de galinha (*Gallus gallus domesticus*) na infecção experimental por *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 pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)- DBS/UEM

Prof^a. Dr^a. Denise Lessa Aleixo
Centro Universitário de Maringá- UNICESUMAR

Prof^a. Dr^a. Fabiana Nabarro Ferraz
Universidade Estadual de Maringá - Lepac/UEM

Prof^a. Dr^a. Mônica Lúcia Gomes
Universidade Estadual de Maringá- DBS/UEM

Prof^a. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo
Universidade Estadual de Maringá - DBS/UEM

Defesa: 9 de Julho de 2018 as 14:00hs.

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização direta ou indiretamente.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá - UEM, que por meio de seu Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, também, as professoras Dr^a. Denise Lessa Aleixo, Dr^a. Fabiana Nabarro Ferraz, Dr^a. Mônica Lúcia Gomes e Dr^o. Max Jean Ornelas Toledo que aceitaram participar da minha banca de defesa.

A todos os professores que transmitiram seu valioso conhecimento ao longo da conclusão das disciplinas, em especial, a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Silvana Marques de Araújo, que me fez crescer muito cientificamente, intelectualmente e como pessoa, tanto durante o mestrado quanto ao longo do doutorado e, principalmente, pela sua dedicação, paciência e a maneira amorosa que transmite conhecimento adquirido ao longo dos anos.

Aos amigos da parasitologia: Ariella Andrade Marchioro, Renata Coltro, Daniela d'Arce Mota, Caroline Felício Braga, Angela Rigo Portocarrero, Patrícia Sandri.

Agradecimento de forma especial à amiga Larissa Ciupa que mesmo passando por momentos difíceis em 2017, teve muita paciência durante o doutorado e me propiciou momentos de muito conhecimento, amor e paixão pela pesquisa. Esta tese, sem dúvida, não poderia ser concluída sem seus conhecimentos, inteligência, dedicação e sincera amizade.

Aos funcionários do biotério de parasitologia básica (bloco I-90), pela sua contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus que sempre está ao meu lado e que não me deixa desistir!

EPÍGRAFE

O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.

Dalai Lama

Avaliação do efeito dos medicamentos homeopáticos *Phosphorus* e bioterápico de soro de galinha (*Gallus gallus domesticus*) na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO

A doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana é resultante da infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descrita, por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1909). Limitada, primariamente ao continente americano, em virtude da distribuição de mais de 150 espécies do inseto vetor, atualmente é diagnosticada em quase todos os continentes devido aos movimentos migratórios. Embora seja um problema de saúde global, é classificada pelo Ministério da Saúde brasileiro como “Negligenciada”, não despertando interesse da indústria farmacêutica. No momento, o Brasil dispõe somente do benznidazol para o tratamento etiológico desta infecção. Contudo, este medicamento pode provocar efeitos colaterais importantes e possui baixa eficácia na fase crônica da doença. Assim, a procura de um tratamento etiológico complementar/alternativo tem sido o objetivo de muitos pesquisadores. Nesse contexto, a homeopatia surge como uma opção para enfrentamento da infecção, com redução de efeitos colaterais e de toxicidade proporcionada pelo tratamento alopático com o benznidazol. Alguns trabalhos já demonstraram, experimentalmente, a diminuição da parasitemia e de efeitos colaterais, com evolução clínica mais favorável devido ao tratamento com uma associação de benznidazol com uma composição do mesmo medicamento ultradiluído associada à redução de efeitos colaterais e com evolução clínica mais favorável. O efeito de medicamentos altamente diluídos vem sendo demonstrado em diversos experimentos usando a infecção por *T. cruzi* como modelo ou outras infecções, por vários grupos de pesquisa. Na homeopatia, podem ser utilizados medicamentos repertorizados segundo a teoria de *Hahnemann* ou bioterápicos feitos a partir de material biológico. Aqueles preparados a partir de soro de animal sadio tem efeito significativamente melhor que o efeito de preparados a partir de soro de animal infectado por *T. cruzi*. Da mesma forma, medicamento preparado a partir de soro de espécie mais resistente ao *T. cruzi*, tem melhor efeito que aquele preparado a partir de soro de espécie mais suscetível. A hipótese que surge é que o organismo tratado usa o medicamento como modelo de atuação. A cepa Y de *T. cruzi* tem o curso de infecção bem conhecido. Essa cepa apresenta alta virulência e patogenicidade para camundongos *Swiss* observando-se, invariavelmente morte da grande maioria dos animais não tratados mesmo com inóculo baixo. Por conseguinte, o percentual de sobrevivência pode constituir-se em importante marcador para o direcionamento de novos experimentos. Outros roedores como os ratos (*Rattus norvegicus*) também têm sido bastante utilizados em pesquisas com o *T. cruzi* por possuírem características genéticas e fisiológicas semelhantes aos humanos, permitindo a avaliação de vários parâmetros que facilitam a interpretação do desenvolvimento de doença nos seres humanos. A resposta inflamatória, principal evento da patogênese da infecção por *T. cruzi*, é desencadeada por uma série de eventos nos quais estão envolvidos macrófagos, óxido nítrico, citocinas pró e anti-inflamatórias que atuam sinergicamente para modular a resposta imune no hospedeiro que, se equilibrada pode induzir a sobrevivência à infecção. Nesse sentido, a presente tese tem o objetivo de avaliar *in vivo* o efeito de medicamentos homeopáticos em roedores (*Rattus norvegicus* e *Mus musculus*) experimentalmente infectados por *Trypanosoma cruzi*, considerando parâmetros clínicos, imunológicos e parasitológicos. No primeiro

artigo, foi testado o medicamento *Phosphorus* 13cH em ratos. Observou-se que o tratamento com *Phosphorus* provoca aumento significativo da produção de citocinas pró-inflamatórias INF- γ e TNF- α durante o curso da infecção em relação ao controle. O grupo tratado com *Phosphorus* apresentou 52,5% menos focos inflamatórios no coração do que o controle. O aumento de citocinas pró-inflamatórias no grupo *Phosphorus* está relacionado à diminuição significativa do número de focos inflamatórios. No segundo artigo foi testado o efeito do soro de galinha (*Gallus gallus domesticus*) na dinamização 13cH em camundongos infetados com o protozoário. Foi selecionada a espécie *Gallus gallus domesticus* porque aves são refratárias à infecção por *T. cruzi*, oferecendo modelo de resistência para os camundongos infetados a serem tratados. Maior percentual, 42,31% (n=11) dos animais tratados com bioterápico soro de galinha 13cH que no controle (CI) 23,08% (n=3) sobreviveram mais de 2 semanas. O tempo médio de vida (47,3 \pm 63,5) dias foi maior (p=0,0069) no grupo 13cH do que no CI (13,0 \pm 3,0). A estimativa de sobrevida do 13cH foi de 60,1 dias, enquanto que o CI apresentou menor sobrevida média de 13,9 dias (p=0,0088). A parasitemia e a temperatura sofreram efeito benéfico da medicação utilizada para os animais tratados, sendo estatisticamente diferentes (p=0,0023 e p=0,0285) entre 13cH e CI. A maioria das avaliações clínicas no grupo tratado 13cH apresentaram comportamento próximo ao grupo de animais não infectados (CNI) o que sugere maior equilíbrio do organismo frente à infecção no animal tratado com bioterápico que o observado no grupo CI. A infecção promove aumento das citocinas IFN- γ e IL-6. Em CI elas apresentaram níveis aumentados em relação ao 13cH. Este aumento diferenciado sugere que o tratamento ativa o sistema imunológico do animal, porém de forma equilibrada, reduzindo a inflamação e conseqüentemente os danos teciduais. Embora no 13cH exista aumento de TNF- α entre os tempos avaliados, no grupo tratado não foi observado aumento significativo dessas citocinas quando comparado ao CI, mostrando que o 13cH ativou o sistema imune mas impediu aumento exagerado dos níveis desta citocina no momento de pico de parasitos. Assim, houve estímulo na produção de NO sem, contudo, haver aumento drástico deste reagente (p>0,05) evitando danos teciduais. Esse equilíbrio não foi observado nos animais do grupo CI que apresentou aumento significativo e prejudicial de NO, causando morte mais precoce. Ficou evidenciado comportamento correlacionado no grupo 13cH entre NO e IFN- γ no 8º dpi, bem como no 12º dpi quando IFN- γ aumentou diretamente proporcional ao TNF- α . Em conclusão, os resultados demonstram: 1) O tratamento com *Phosphorus*13cH promove efeitos benéficos na infecção por *T. cruzi* em ratos *Wistar*, modulando a secreção de IFN- γ e TNF- α com redução da inflamação no tecido cardíaco; 2) O tratamento da infecção murina por *T. cruzi* com soro ultradiluído de animal refratário a esta infecção apresentou modulação diferenciada do sistema imunológico com alteração do curso da infecção e secreção de TNF- α , INF- γ , IL6 e NO, promovendo aumento de sobrevida e tempo de vida estimado.

Palavras-chave: Homeopatia; Citocinas; Doença de Chagas; Soro; Animais de laboratório.

Evaluation of the effect of *Phosphorus* homeopathic medicines and bioterapy of chicken serum (*Gallus gallus domesticus*) in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis caused by *Trypanosoma cruzi*, was described by Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1909). It is primarily limited to the American continent, due to the distribution of more than 150 species of the insect vector. Currently is diagnosed in almost all continents due to migratory movements. Despite being a global health problem, the Brazilian Ministry of Health classifies this disease as “Neglected”, meaning that it does not arouse the interest of pharmaceutical industry. Until now, Brazil has only benznidazole for its etiologic treatment. However, this drug can cause significant side effects and has low efficacy mainly on chronic phase. Thus, searching for etiologic complementary/alternative treatment has been the aim of many researchers. In this context, homeopathy emerges as an option to manage the infection, decreasing side effects and toxicity of benznidazole allopathic treatment. Some studies have already experimentally demonstrated the decrease of parasitemia due to the combination of benznidazole with a composition of the same highly diluted medication associated with the reduction of side effects and with a more favorable clinical evolution. The effect of highly diluted medications has been demonstrated in several experiments using *T. cruzi* infection or other infections as model, for several research groups. We can use repertorized medication, according *Hahnemann* theory or biotherapeutic produced from biological material. The compounds prepared with serum from healthy animal have significantly better effects than the effects of the ones prepared with serum from animal infected with *T. cruzi*. Similarly, a medication prepared with serum from *T. cruzi*-resistant species has a better effect than the medication prepared with serum from susceptible species. The suggestion is that the organism treated uses the medication as a model of action. The *T. cruzi* has a well-known course of infection. This strain has high virulence and pathogenicity for *Swiss* mice, invariably causing the death of most untreated animals even if infected with small inoculum. Therefore, the survival percentage may be an important marker for guiding new experiments. Other rodents, such as rats (*Rattus norvegicus*), have also been widely used in *T. cruzi* works due to their genetic and physiological characteristics similar to humans. These features allows the evaluation of several parameters that facilitate the interpretation of disease development in humans. Inflammatory response, the main event of the pathogenesis of *T. cruzi* infection, is triggered by a series of reactions involving macrophages, nitric oxide, pro and anti-inflammatory cytokines that act synergistically in order to modulate the immune response in the host. If those reactions are balanced, they may induce survival to infection. In this sense, the present work aims to evaluate *in vivo* effects of homeopathic dilutions in hosts (*Rattus norvegicus* and *Mus musculus*) experimentally infected with *T. cruzi*, considering clinical, immunological and parasitological parameters. The highly diluted repertorized medication ***Phosphorus*** 13cH was tested in rats. It was observed that treatment with ***Phosphorus*** causes a significant increase in the production of pro inflammatory cytokines INF- γ and TNF- α during the course of infection when compared with the control (p<0.05). The group treated with ***Phosphorus*** had 52.5% fewer inflammatory foci in the heart than the control group (p<0.05). The increase of pro inflammatory cytokines in

Phosphorus group is related to the significant decrease in the number of inflammatory foci. The effects of a biotherapy produced by chicken serum (*Gallus gallus domesticus*) at 13cH dilution were tested in mice infected with the protozoan *T. cruzi*. *Gallus gallus domesticus* was selected because birds are refractory to *T. cruzi* infection, being a model of resistance for the infected mice to be treated. In the group treated with 13cH (13cH) chicken serum, 42.31% (n=11) of the animals evaluated survived for more than 2 weeks, whereas in the control group (CI), 25.0% (n=3). The average lifetime (47.3 ± 63.5) days was higher in the 13cH group ($p=0.0069$) than in the CI group (13.0 ± 3.0). The estimated survival of 13cH was 60.1 days, while CI had a lower average survival of 13.9 days ($p=0.0088$). Parasitemia and temperature were beneficially affected by the medication for the treated animals, being statistically different ($p=0.0023$ and $p=0.0285$) between 13cH and CI (Control). Most of the evaluations in the treated group 13cH presented a behavior closer to the uninfected animals group (CNI), which suggests a better balance of the organism against the infection in the animals treated with highly diluted medication than the observed in the CI group. The infection promotes increase of the cytokines IFN- γ and IL-6. In IC they presented increased levels in relation to 13cH. This differential increase suggests that the treatment activates the animal's immune system, but in a balanced way, reducing inflammation and consequently tissue damage. Although 13cH has increased TNF- α among the evaluated times, the treated group presented lower levels compared with CI, promoting activation of the immune system but preventing, however, an exaggerated increase in the levels of this cytokine at the moment of the parasite peak. Thus, there is stimulation in NO production without, however, occurring a drastic increase of this reagent ($p>0.05$), avoiding tissue damages. This balance was not observed in animals in the CI group, which presented significant and damaging increase of NO, causing earlier death. Correlated behavior between NO and IFN- γ on the 8th day after infection ($p<0.05$) as well as on the 12th day after infection, when IFN- γ increased directly proportional to TNF- α , was evidenced in the 13cH group. In conclusion, the results demonstrate: 1) Treatment with **Phosphorus** 13cH promotes beneficial effects on *T. cruzi* infection in *Wistar* rats, modulating the secretion of IFN- γ and TNF- α with decreased inflammation in cardiac tissue; 2) Treatment of *T. cruzi* murine infection with highly diluted serum of an animal refractory to this infection presented differentiated modulation of the immune system with alteration of the course of infection and secretion of TNF- α , INF- γ , IL6 and NO, providing increased survival and estimated lifetime.

Keywords: Homeopathy; Cytokines; Chagas disease; Serum; Laboratory animal.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): ***Cytokines* (artigo 1)** disponível em:

<<https://www.elsevier.com/journals/cytokine/1043-4666/guide-for-authors>> e

***Microbial Pathogenesis* (artigo 2)** disponível em:
<<https://www.elsevier.com/journals/microbial-pathogenesis/0882-4010/guide-for-authors>>

SUMÁRIO

CAPITULO I.....	17
A doença de Chagas e os aspectos epidemiológicos.....	17
Formas clínicas da doença de Chagas.....	18
Tratamento etiológico convencional da doença de Chagas e homeopatia.....	19
Experimentos de laboratório para estudo da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Animais de experimentação.....	22
1) Roedores.....	22
2) <i>Gallus gallus domesticus</i> (Galinha) - espécie refratária ao <i>T. cruzi</i>	22
Produção de citocinas e processo inflamatório de tecidos na doença de Chagas.....	22
JUSTIFICATIVA.....	24
OBJETIVOS.....	25
OBJETIVOGERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO II.....	30
Artigo 1 - “ <i>Phosphorus</i> PROTECTS CARDIAC TISSUE BY MODIFYING THE IMMUNE RESPONSE IN RATS INFECTED BY <i>Trypanosoma cruzi</i> ”.....	30
ABSTRACT.....	31
Keywords.....	31
Highlights.....	31
1. Introduction.....	32
2. Materials and methods.....	33
Collection of blood samples.....	33
Medication and treatment regimen.....	34
Parameters evaluated.....	34
3. Results.....	35
<i>Immunological analysis</i>	35
<i>Histological analysis</i>	35

<i>Citokines vs inflammatory foci</i>	36
4. Discussion	37
5. Conclusion.....	39
Artigo 2 - “Medicamento ultradiluído produzido a partir de soro de animal refratário ao <i>Trypanosoma cruzi</i> aumenta a sobrevida e interfere na imunomodulação de citocinas em camundongos experimentalmente infectados”	43
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1. <i>Ética animal</i>	46
2.2. <i>Animais e infecção experimental</i>	46
2.3. <i>Delineamento experimental e regime de tratamento</i>	47
2.4. <i>Preparo dos medicamentos</i>	47
2.5. <i>Parâmetros avaliados</i>	48
2.5.1. Parâmetros parasitológicos:.....	48
2.5.2. Dosagem de citocinas:.....	48
2.5.3. Determinação dos níveis de nitrito:.....	48
2.5.4. Parâmetros clínicos:	49
2.5.5. Sacrifício dos animais:	49
2.5.6. Análise de sobrevida:	49
2.6. <i>Análise estatística</i>	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1. <i>Análise de sobrevida animal e parasitemia</i>	50
3.2. <i>Análise clínica</i>	53
3.3. <i>Análise imunológica</i>	54
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPÍTULO III.....	61
CONCLUSÕES.....	61
PERSPECTIVAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figure 1.	36
Graph 1-2. Concentration of cytokines in serum in <i>Rattus norvegicus</i> infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> (Y strain). Concentration of each group at different times: 0, 5 th , 10 th and 24 th days after infection. Groups: Control – infected and untreated animals; <i>Phosphorus</i> – infected animals, treated with <i>Phosphorus</i> 13cH. Statistics: *Corresponds to a significant difference between the groups at the same time of infection –Mann-Whitney Test (p <0.05). Different letters correspond to a significant difference between times in the same groups – <i>Mann-Whitney Test</i> (p<0.05).	36
Graph 3. Inflammatory foci in <i>Rattus norvegicus</i> infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> (Y strain) evaluation at different times: 5 th , 10 th and 24 th days after infection. Groups: Control –infected and untreated animals; <i>Phosphorus</i> – infected animals, treated with <i>Phosphorus</i> 13cH. Statistics: *Corresponds to a significant difference between the groups at the same time of infection – <i>Friedman ANOVA Test</i> (p <0.05). Different letters correspond to a significant difference between times or groups – <i>Mann-WhitneyTest</i> (p<0.05).....	36
Photo 4. Inflammatory foci in heart of <i>Rattus norvegicus</i> rat infected with the Y strain of <i>T. cruzi</i> . Groups: (A) Control– Greater inflammatory process and (B) <i>Phosphorus</i> – Without the presence of inflammatory foci (400x, HE).→ (Arrow) - Indicates example of area with inflammation.	36
Figure 2.	37
Relationship between the concentration of cytokines no serum in pg/mL (IFN- γ and TNF- α) on the 5 th day of infection and the number of inflammatory foci in the heart on the 10 th day of infection, in <i>Rattus norvegicus</i> infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> (Y strain).....	37
Groups: Control - infected and untreated animals; <i>Phosphorus</i> –infected animals, treated with <i>Phosphorus</i> 13cH.A:Significant difference between the groups regarding concentration of cytokines no serum IFN- γ (rho=-0,89) or TNF- α (rho=0,90) onthe 5 th day after infection – p<0.05;*Significant difference between the groups regarding the number of inflammatory foci on the 10th day after infection p<0.05.	37
A. Figura 1. Curva de sobrevida segundo os grupos experimentais pelo estimador de <i>Kaplain Meier</i> seguido do teste de Log Rank. CI: Controle infectado e não tratado, 13cH: Bioterápico de soro de galinha na diluição 13cH. Todos s animais de CNI (controle não infetado) sobreviveram por todo o período experimental.....	53
B. Figura 2. Comparação da produção de citocinas e NO nos 0, 8° dpi e 12° dpi para os grupos 13cH e CI; 13cH: Grupo tratado com soro de galinha na diluição 13cH e CI: Controle infetado e não tratado. Estatística: *corresponde a uma diferença significativa entre os grupos no mesmo momento da	

infecção - Teste de t não pareado ($p < 0,05$). Letras diferentes correspondem a uma diferença significativa entre os tempos nos mesmos grupos - Teste ANOVA para medidas repetidas ($p < 0,05$). 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da sobrevivência, parasitemia do 7º dpi, 8º dpi e estimativa de sobrevivência	52
Tabela 2. Comparação da temperatura, consumo de água, consumo de ração e peso e segundo os grupos experimentais avaliados entre a infecção e o pico e após o pico.....	54

CAPITULO I

A doença de Chagas e os aspectos epidemiológicos

A doença de Chagas é resultante da infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e por esse motivo é também chamada de tripanossomíase americana. Foi descrita, por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1909), limitada primariamente ao continente americano, em virtude da distribuição de mais de 150 espécies do inseto vetor. Embora seja uma doença classificada pelo Ministério da Saúde Brasileiro como "Negligenciada", trata-se de um problema de saúde global^{1,2}.

A transmissão vetorial do parasito para o ser humano ocorre por intermédio de seus hospedeiros invertebrados, cujo inseto é conhecido popularmente como barbeiro². Durante o processo de transmissão para o hospedeiro vertebrado, o inseto ingere os tripomastigotas de *T. cruzi* que se transformam em epimastigotas e se multiplicam no intestino do triatomíneo¹⁻³. Já no intestino, os parasitos se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes¹. Já no hospedeiro vertebrado como, por exemplo, no homem a transmissão ocorre pela contaminação de mucosas ou lesões cutâneas por fezes/urina do triatomíneo durante o repasso sanguíneo do mamífero¹⁻³. Outras formas de transmissão também descritas podem ser: por transfusão sanguínea, transplacentária e a oral que ocorre devido ao consumo de alimentos (cana de alimentos açúcar e açaí) contaminados com o vetor¹⁻³.

Devido à grande migração da população, o risco de transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue e transplante de órgãos aumenta, em diversos outros países, fora da América Latina^{1,2,4}. Esse aumento do risco da transmissão da doença envolve novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais ou políticos, além dos já relacionados à saúde pública em regiões endêmicas^{1,2,4}.

Entre 2005 e 2013, no Brasil, foram notificados 1570 casos da forma aguda da doença, com predominância no norte do país, correspondendo a quase 90% das notificações⁵. Esta região apresenta vários fatores biológicos e sociais que facilitam a transmissão entre eles, diversidade de reservatórios para *T. cruzi* e, conseqüentemente intenso ciclo de transmissão, atividades laborais que facilitam o contato com o vetor e consumo de alimentos *in natura* contaminados, que em muitos casos pode levar a infecção aguda por via oral⁶.

Segundo dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN – Dados de 2000 a 2013) no Brasil identificou-se que a forma de transmissão oral foi a mais frequente em

todos os anos (1.081, 68,9%), seguida pela transmissão vetorial em 100 casos (6,4%)². Segundo a OMS, como base em dados de 2010, estima-se que um total de 46 casos de doença de Chagas por ano no Brasil são originários de transmissão vetorial, o que pode reforçar uma provável subestimativa dos casos relativos a esta forma de transmissão com âmbito nacional e internacional⁶. Em 372 (23,7%) casos notificados não foi identificada a forma de transmissão, sendo 93,0% (306 casos) destes somente do Estado do Pará. Foram notificados ainda 11 (0,7%) casos por outras formas de transmissão (transfusional ou acidental), e 6 (0,4%) casos por transmissão vertical².

Em inquérito realizado em doadores de sangue no estado do Piauí no período de 2004 a 2013, Santana e colaboradores⁷ avaliaram a sorologia para doença de Chagas em 170.148 doadores de sangue que fizeram uma ou mais doações de sangue. Durante o período avaliado, 98,2% dos municípios do estado foram contemplados nesse estudo⁷. Em São Raimundo Nonato, 2,4% e em Oeiras 2,0% apresentaram sorologia reagente para doença de Chagas e os anos que apresentaram maiores prevalências foram em 2007 com 1,11% e em 2013 com 1,15%⁷. No Brasil a portaria 1376/93 reforçada pela resolução nº 343 MS/2001 determina a realização de testes de triagem sorológica nos serviços de hemoterapia para sífilis, doença de Chagas, hepatite B e C, HIV, HTLV e malária⁸.

Embora tenha havido diminuição da transmissão via vetorial e transfusional com o passar dos anos, outras maneiras de transmissão tornam-se mais comuns, como a via oral que tornou-se atualmente a forma de transmissão mais importante e prevalente no Brasil^{4,9,10}.

Formas clínicas da doença de Chagas

A infecção por *T. cruzi* apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda nem sempre é aparente e corresponde ao período inicial da infecção¹¹. Essa fase é detectável por exames parasitológicos de sangue, em que se apresenta alto parasitismo tecidual e parasitemia patente. Possui curta duração, normalmente de 4 a 12 semanas^{4,11}. Já na fase crônica, a parasitemia tende a diminuir devido à resposta imune do hospedeiro^{4,11}. Sintomas podem estar ou não presentes nesta fase e ocorre redução dos níveis de IgM e, consequente aumento do IgG entre 60 a 90 dias, marcando a evolução desta fase^{11,12}.

Quando a fase aguda apresenta-se sintomática, os pacientes infectados por *T. cruzi* podem apresentar febre, sonolência, mialgia, diarreia, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), edema e taquicardia e, em alguns casos extremos

pode levar à morte^{12,13}. 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. Isso pode ocorrer porque na maioria dos casos agudos o prognóstico da doença é benigno, com remissão completa de sinais, com ou sem intervenção medicamentosa^{12,13}.

Após o término da fase aguda, o paciente passa para a fase crônica¹⁴, nessa fase as manifestações podem ocorrer nas formas cardíaca, digestiva ou mista (as duas formas associadas) ou na forma indeterminada (forma assistomática da fase crônica)¹⁴, a doença de Chagas é assintomática na maioria dos casos⁹. Nos casos sintomáticos os sintomas mais frequentes na envolvem desordens na motilidade do trato digestório que afetam o esôfago e cólon, com diminuição do trânsito e dificuldade de esvaziamento intestinal, resultante das alterações histológicas e nervosas que ocorrem nestes tecidos, caracterizando a forma digestiva da doença (megaesôfago e megacólon)^{11,12}. Pode ocorrer ainda uma manifestação mais grave, conhecida como cardiopatia chagásica, onde um processo inflamatório pode resultar em miocardite fibrosante, caracterizando a a forma cardíaca da doença, nesta forma as alterações teciduais e nervosas que comprometem a função cardíaca^{11,12}.

A cardiomiopatia na doença de Chagas continua tendo prevalência significativa no Brasil¹⁵. O comprometimento do músculo cardíaco nessa doença é complexo, envolve resposta autoimune do hospedeiro, comprometimento do miocárdio e aumento do processo inflamatório¹⁵. Ao comparar a evolução dos pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica com a de outras etiologias, sabe-se que o prognóstico dos chagásicos em casos sintomáticos é mais prejudicial ao indivíduo¹⁵.

A variação de sintomatologia relacionada à infecção depende de maneira geral da cepa, virulência do parasito, do tropismo tecidual do *T. cruzi* e também a resposta imune do hospedeiro¹⁶.

Tratamento etiológico convencional da doença de Chagas e homeopatia

Por ser negligenciada a doença de Chagas não desperta muito interesse da indústria farmacêutica, até o momento, o Brasil dispõe somente do benznidazol para o tratamento etiológico desta infecção. Contudo, este medicamento pode provocar efeitos colaterais importantes, além de possuir baixa eficácia na fase crônica da doença. Assim, a procura de um novo tratamento tem sido o objetivo de muitos pesquisadores com a finalidade de

diminuir ou eliminar a infecção e de melhorar a qualidade de vida do indivíduo infectado por *T. cruzi*¹⁴

Nesse contexto, a homeopatia surge como uma opção para redução dos efeitos colaterais e toxicidade do tratamento que envolve o benznidazol. Inclusive, alguns trabalhos já demonstraram, experimentalmente, a diminuição da parasitemia devido à associação de benznidazol com uma composição do mesmo medicamento ultradiluído¹⁷ culminando na redução de efeitos colaterais possibilitando aumento da dose do tratamento etiológico e uma evolução clínica mais favorável^{14,18}.

A homeopatia foi proposta por Hahnemann em 1779, e tem como princípio a “Lei da Similitude” que visa administrar substâncias experimentadas previamente em indivíduos saudáveis, cujos sintomas são semelhantes aos sintomas tratados em indivíduos enfermos¹⁹. Hahnemann (1835) afirmou que medicamentos homeopáticos despertariam propriedades medicinais latentes em substâncias no seu estado bruto, conservando uma condição curativa contra doenças¹⁹.

Em outras palavras, espera-se que essa abordagem terapêutica, quando adequada, fortaleça a ação defensiva do indivíduo, promovendo imunomodulação e, conseqüentemente, aumento na eficácia do processo de cura e estabilização do organismo do indivíduo.

O efeito de medicações altamente diluídas vem sendo demonstrado em diversos experimentos por vários grupos de pesquisa^{3,13,20,21}. Especificamente, o estudo do efeito de diferentes esquemas de tratamento, utilizando substâncias ultradiluídas está se tornando mais frequente na literatura^{14,21}. Alguns autores consideram irrelevante a dose administrada, justificando que a ação do medicamento ultradiluído dá-se qualitativamente²². Outros enfatizam a importância dos esquemas de tratamento e da frequência de administração da substância ultradiluída para o sucesso do tratamento^{14,21}.

Os medicamentos altamente diluídos podem ser derivados de plantas, animais ou minerais²³. Bioterápico é um exemplo de medicamento altamente diluído que é uma preparação medicamentosa obtida a partir de produtos biológicos, quimicamente indefinidos: secreções, excreções, órgãos, tecidos, produtos de origem microbiana e alérgenos. Essas preparações podem ser de origem patológica ou não patológica²³. Já os organoterápicos são medicamentos altamente diluídos obtidos de órgãos ou glândulas endócrinas de animais

saudáveis, baseado no princípio da “identidade biológica” em que uma função prejudicada é reestabelecida com a administração do seu homólogo sadio²⁴

Para o preparo de um medicamento na diluição 13cH, por exemplo, utiliza-se a escala centesimal até a dinamização 13cH, para atingir a diluição final são necessárias 13 diluições sucessivas de 1:100 feitas após cada diluição, em cada um desses processos deve ser realizadas agitações mecânicas utilizando dinamizador mecânico ou manualmente de acordo com as padronizações da Farmacopeia Homeopática Brasileira²³. Os medicamentos homeopáticos apresentados em diluições acima de 12cH (centesimal hahnemanniano) quando comparado a diluições menores de 12cH têm demonstrado excelentes resultados com diminuição da parasitemia, aumento de sobrevivência e balanço favorável das citocinas^{25,26}, mesmo ultrapassado o limiar de dispersão da matéria, em que não há presença de substância original, denominado de constante de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$)²⁷.

O estudo de novos compostos e a avaliação do impacto do tratamento na prevenção da morbidade em indivíduos infectados continuam a ser desafios essenciais na busca do controle de doenças e promoção da saúde⁹. Neste contexto, estudos com substâncias altamente diluídas estão sendo realizados^{14,25,26,28} e além de demonstrar benefícios no tratamento da infecção experimental por *T. cruzi*, provam que essas substâncias contribuem para reduzir a toxicidade e os efeitos adversos dos medicamentos disponíveis, promovendo assim a melhoria da qualidade de vida em indivíduos infectados e tratados^{14,29}.

Ferraz e colaboradores³⁰ observaram que o grupo tratado com bioterápico de soro de coelho não infectado apresentou diminuição das concentrações de IL-4, sem alterações no TNF- α e IFN- γ , associada à diminuição da IL-17 quando comparado ao controle. Ferraz e colaboradores³⁰ evidenciaram ainda que o grupo tratado com bioterápico de coelho infectado não exibiu alterações na parasitemia, aumento na concentração de IL-4, sem alterações no TNF- α e IFN- γ , associado à diminuição da IL-17 em relação ao grupo controle.

Experimentos de laboratório para estudo da infecção por *Trypanosoma cruzi*

A cepa Y de *T. cruzi* tem o curso de infecção bem conhecido e descrito por Nussenzweig & Silva³¹. Essa cepa apresenta alta virulência e patogenicidade e, em camundongos *Swiss*, observa-se invariavelmente morte da maioria dos animais não tratados mesmo com inóculo baixo para essa infecção^{14,29,32}. Por conseguinte, o percentual de sobrevivência pode constituir-se em importante marcador para o direcionamento de novos experimentos^{14,29}. A cepa Y apresenta pico máximo de parasitos entre o 7º e 12º e tende a

apresentar período pré-patente entre 3 e 5 dias de infecção e estes parâmetros também funcionam como marcadores nas intervenções medicamentosas. A infecção de camundongos com a cepa Y é amplamente utilizada em estudos de laboratório, contando com número significativo de dados publicados, sendo considerado um bom modelo experimental para avaliação de intervenções medicamentosas^{11,33}.

Animais de experimentação

1) Roedores

Os roedores por possuírem características genéticas e fisiológicas semelhantes aos humanos têm sido bastante utilizados em centros de pesquisa que estudam *T. cruzi*, permitindo a avaliação de vários parâmetros que facilitam a interpretação do desenvolvimento de doença nos seres humanos^{14,21} Quando se trata de infecção por *T. cruzi*, ratos mostram-se resistentes enquanto nos camundongos, a infecção pode ser altamente virulenta para os animais infectados e não tratados etiologicamente^{14,25,29}.

2) *Gallus gallus domesticus* (Galinha) - espécie refratária ao *T. cruzi*

Segundo Guimarães, *T. cruzi* injetado na pele de aves é eliminado no ponto de inoculação e aparentemente não atinge a corrente sanguínea. A refratariedade das aves pode ser considerada uma resistência natural ao *T. cruzi*³⁴

Em 1959, Warren e Borsos³⁵ atribuíram a refratariedade das aves à presença de fatores no soro das galinhas capazes de lisar *T. cruzi*, como um anticorpo aglutinante e o sistema complemento. *Gallus gallus domesticus*, a galinha, é um animal refratário e possui essa característica mesmo antes do nascimento³⁴. Ovos de galinhas embrionados infectados com formas sanguíneas de *T. cruzi* apresentam-se parasitêmicos apenas alguns dias após o período embrionário e, 32 dias após o nascimento, os pintos originados apresentam-se ausentes de infecção³⁵. Guimarães em 1952³⁴ descreveu também a resistência natural de pombos ao parasito.

Produção de citocinas e processo inflamatório de tecidos na doença de Chagas

A infecção por *T. cruzi* manifesta-se diferentemente em cada indivíduo. A fisiopatologia da doença não é totalmente compreendida, no entanto, o envolvimento de resposta imune equilibrada é essencial para determinar o curso mais favorável da infecção³⁶. A patogênese da infecção causa processo inflamatório e o coração é o principal órgão-alvo³⁷.

Sabe-se que, via de regra, o parasito induz inflamação e desencadeia no organismo resposta imune que, finalmente, visa tentar controlar a replicação parasitária, possíveis danos teciduais, bem como a evolução clínica da doença. Neste processo estão envolvidos monócitos, macrófagos, neutrófilos, entre outras células do sistema fagocítico mononuclear³⁸.

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* induzem a secreção de citocinas no hospedeiro infectado que atuam sinergicamente na produção de NO (óxido nítrico) para promover a atividade tripanocida^{39,40}. Em vista desta resposta, as citocinas imunoreguladoras são secretadas para evitar resposta exacerbada com danos nos tecidos^{39,40}.

A resposta inflamatória é desencadeada por uma série de eventos nos quais o macrófago é a principal célula, atua contra o parasito, por meio da produção de NO estimulado pela citocina pró-inflamatória IFN- γ , produzida, inicialmente, por células *Natural Killer*³⁸. As citocinas IFN- γ e TNF- α desempenham papéis importantes na infecção por *T. cruzi* e atuam sinergicamente para modular a resposta imune no hospedeiro, induzindo resistência à infecção⁴¹. O TNF- α , por sua vez, é secretado por macrófagos e é capaz de recrutar leucócitos inflamatórios, tais como fagócitos e monócitos, no local da infecção e potencializar a lise mediada por linfócitos T citotóxicos. Esta citocina também parece mediar a sua função tripanocida por meio de uma via autócrina⁴¹.

Apesar dos efeitos benéficos das citocinas pró-inflamatórias na tentativa de eliminar o parasito, vários estudos evidenciaram que citocinas e quimiocitocinas, como IFN- γ , TNF- α e NO, estão relacionadas à inflamação e à progressão da doença quando a relação parasito-hospedeiro é desequilibrada^{38,40-42}. Além das citocinas IFN- γ e TNF- α , alguns trabalhos demonstraram que as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 apresentaram variação significativa em resposta à administração de medicamentos homeopáticos, alterando o equilíbrio da resposta Th1 e Th2 na infecção experimental de camundongos por *T. cruzi*, o que pode levar a resultados benéficos ou não^{16,42,43}. Pavanelli³⁸ descreveu que citocinas do padrão Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-6) atuam comitadamente com intuito de para induzir a ativação de macrófago e a produção de óxido nítrico com objetivo de eliminar o parasito. Já citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) bloqueiam as citocinas do padrão Th1, permitindo a persistência do *T. cruzi* no tecido³⁸.

Em nosso grupo de pesquisa já foram testados vários medicamentos dentre eles *Phosphorus*²⁵ testado nesse trabalho, *Lycopodium clavatum*⁴⁴, bioterápico de soro de coelho³⁰ bioterápico de soro de galinha (testado nesse trabalho), dentre outros.

JUSTIFICATIVA

A falta de medicamento eficaz para tratamento etiológico da doença de Chagas constitui-se da primeira e mais evidente justificativa. O crescente aumento do interesse pela utilização de medicamentos homeopáticos/ultradiluídos pela população mundial vem na sequência.

O modelo de infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi* é bem conhecido, podendo constituir uma excelente ferramenta para o estudo de intervenções medicamentosas^{16 25}^{14,21}. A utilização de animais de laboratório como modelo experimental, com ensaios randomizados e controlados, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de efeitos destes medicamentos em humanos^{14,25,32}, além de contribuir com novas alternativas de tratamento na infecção por *T. cruzi*.

A utilização de medicamentos homeopáticos vem aumentando^{14,21,25,32}. Pela importância da doença de Chagas, como problema de saúde pública, associado às limitações na eficácia e efeitos adversos do tratamento alopático (benznidazol), único medicamento disponível no Brasil, diversos pesquisadores estão em busca de medidas alternativas para o tratamento da doença^{14,25,32}. O objetivo principal nestes estudos, foi encontrar medidas que venham a contribuir para o seguimento do tratamento medicamentoso e, consequentemente numa possível melhoria de qualidade de vida dos indivíduos infectados por *T. cruzi*^{14,21,25,32,45}.

A análise e conclusões obtidas a partir de dados produzidos com experimentações, utilizando medicamentos homeopáticos não seguem padrões da farmacologia clássica e a experiência nesta análise é fator importante na produção de conclusões. Nosso grupo trabalha há mais de dez anos nesta linha de pesquisa e resultados importantes têm sido alcançados, levando a proposição de perspectivas de novos objetivos, dos quais este trabalho faz parte, justificando assim sua execução.

OBJETIVOS

OBJETIVOGERAL

Avaliar o efeito de medicamentos homeopáticos *Phosphorus* 13cH e bioterápico de soro de galinha 13cH em roedores experimentalmente infectados por *Trypanosoma cruzi*, considerando parâmetros clínicos, imunológicos e parasitológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar o efeito de *Phosphorus*13cH, em preparação homeopática, na inflamação do coração e na produção de citocinas em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente com *T. cruzi*.

-Correlacionar à inflamação do coração e a produção de citocinas em *R. norvegicus* infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratadas com *Phosphorus*13cH.

-Avaliar o efeito do bioterápico produzido a partir de soro de *Gallus gallus domesticus* (galinha) sobre parâmetros parasitológicos, clínicos e imunológicos em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi*.

-Correlacionar a evolução das citocinas e do óxido nítrico no 8º e 12º dpi em camundongos *swiss* experimentalmente com *T. cruzi* e tratados com bioterápico de soro de galinha na diluição 13cH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil, **Ministério da Saúde, Doença de Chagas** (2017), portal: portalms.saude.gov.br.
2. PÉREZ-MOLINA, J. A., MOLINA, I, Chagas disease, **Lancet**. V.391, p.82–94, 2018.
3. VEIGA, F. K. et al. Uso de bioterápicos na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*: Revisão bibliográfica. **Master Editora – Revista Uningá Review**, v. 18, p. 5-11, 2014.
4. DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, 2016.
5. SAÚDE, 2015. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Secretária de Vigilância em Saúde - Ministério Da Saúde**, v. 46, p. 1-9, 2015.
6. WHO, 2010. Sixty-Third World Health Assembly, Geneva. **World Hepatitis Alliance - WHA63/2010/REC/1**, p. 37-42, 2010.
7. SANTANA M. P., SOUZA-SANTOS R., ALMEIDA A.S. De, Prevalência da doença de Chagas entre doadores de sangue do Estado do Piauí, Brasil, no período de 2004 a 2013, **Cadernos de Saúde Pública**. v.34, p. 1–15, 2018.
8. CARRAZZONE, Cristina F. V.; BRITO, Ana Maria De; GOMES, Yara M.. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 2, p. 93-98, 2004.
9. COURA, J R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.
10. BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 19, p. 1-21, mai./2015
11. PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Disease**, v. 1, p. 92-100, 2001.
12. DIAS, J. C. P. et al. Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. 30 ed. **Fiocruz**, 1997.
13. DIAS, J C P. Acute Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 85-91, 1984.
14. ALEIXO, D L; ARAÚJO, S M De. Utilização de medicamento homeopático em infecções parasitárias: Modelo *Trypanosoma cruzi*. **Tese - Universidade Estadual de Maringá**, 2012.
15. MATSUDA, CN et al. **Doença de Chagas. RBM - Revista Brasileira de Medicina**, v. 71, n. 10, p. 347-353, 2013.
16. ALMEIDA, L. R. D. et al. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with

Trypanosoma cruzi. **Homeopathy**, v. 97, p. 65-69, 2008.

17. ALEIXO, D. L. et al. The association of ponderal benznidazole with its ultra-high diluted formula reduces the toxic effects and allows increasing of dose in dose-dependent protocol in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of High Dilution Research**, v. 14, p. 10-19, 2015.

18. FALKOWSKI-TEMPORINI, G. J. et al. Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*. **Cytokine**, v. 88, p. 57-61, 2016.

19. TEIXEIRA, M Z. Evidências científicas da episteme homeopática. **Revista de homeopatia**, v. 74, p. 33-56, 2011.

20. VETOSHKINA, T V; FOMINA, T I. Effects of Homeopathic Preparations on the Liver in Rats with Acute and Chronic Toxic Hepatitis. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, p. 85-87, 2003.

21. FERRAZ, F. N. et al. Effect of biotherapy *T. cruzi* 7x in several therapeutic schemes on experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of High Dilution Research**, v. 10, p. 125-127, 2011.

22. EIZAYAGA, F X. Tratado de medicina homeopática. 3 ed. **Marecel**, 1992.

23. FARMACOPÉIA, 2010 . **Farmacopeia homeopática brasileira**. 5 ed. 2010.

24. FONTES, O L. **Farmácia homeopática: teoria e prática**. 5 ed., 2010.

25. FERREIRA, E. C. et al. *Phosphorus* protects cardiac tissue by modifying the immune response in rats infected by *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine**, v. 102, p. 102-106, 2018.

26. SANDRI, P. et al. *Trypanosoma cruzi*: Biotherapy made from trypomastigote modulates the inflammatory response. **Homeopathy**, v. 104, p. 48-56, 2015.

27. REGER, D. et al. **Química - princípios e aplicações**. 1 ed. Lisboa, 1997.

28. MASSINI, P F; ARAÚJO, S M De. *Rattus norvegicus* infectados com *Trypanosoma cruzi*: Efeitos clínicos do tratamento com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* ultradiluídos. **Dissertação - Universidade Estadual de Maringá**, 2013.

29. FERRAZ, F. N. et al. Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy**, v. 100, p. 237-243, 2011.

30. FERRAZ, F. N. et al. Biotherapies of rabbit serum modulate the immune response and decrease parasite load in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of applied biomedicine**, v. 82, p. 1-11, 2015.

31. SILVA, H P; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente

- virulenta para o camundongo branco. **Folia clinica et biologica**, v. 20, p. 191-201, 1953.
32. SANDRI, P. F. et al. Dynamized ethyl alcohol improves immune response and behavior in murine infection with *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine**, v. 99, p. 240–248, 2017.
33. PINTO, P. L. S. et al. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. **Rev. Do Hosp. Das Clin. Fac. Med. São Paulo**, v. 54, p. 141-146, 1999.
34. NERY-GUIMARÃES, F; ISMÉLIA, V; GRYNBERG, N. Refratariedade das galinhas ao “*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*” III - Dissociação dos fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 131-136, 1952.
35. WARREN, L; BORSOS, T. Studies on Immune Factors Occurring in Sera of Chickens Against the Crithidia Stage of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 82, p. 585-590, 1959.
36. ALEIXO, D. L. et al. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of High Dilution Research**, v. 12, p. 93-94, 2013.
37. LOPES, C. R. et al. Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, p. 1-8, 2015.
38. PAVANELLI, W R. Citocinas e óxido nítrico na doença de Chagas. **Biosaúde - Londrina**, v. 10, p. 147–155, 2008.
39. TEIXEIRA, A R L; NASCIMENTO, R J; STURM, N R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 463-491, 2006.
40. FICHERA, L. E. et al. Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi* in Cardiac Myocytes Is Inhibited by Cytokine-Induced Nitric Oxide Release. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 359–363, 2004.
41. ALIBERTI, J. C. S. et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor- α deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **American journal of pathology**, v. 158, p. 1433-1440, 2001.
42. SILVA, J. S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4862–4867, 1995.
43. BELLAVITE, P. S. et al. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. **Homeopathy**, v. 104, p. 139-160, 2015.
44. BRUSTOLIN, C F; ARAÚJO, S M De. *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* modulam a

resposta de citocinas, protegem neurônios mientéricos e diminuem a inflamação em ratos *Wistar* infectados pelo *T. cruzi*. **Dissertação - Universidade Estadual de Maringá**, 2014.

45. MOREIRA, N. M. et al. Moderate physical exercise reduces parasitemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, p. 426-435, 2013.

CAPÍTULO II

Artigo 1 - “*Phosphorus* PROTECTS CARDIAC TISSUE BY MODIFYING THE IMMUNE RESPONSE IN RATS INFECTED BY *Trypanosoma cruzi*”

Artigo publicado em Agosto/2017 na revista *Cytokines*

ISSN:1043-4666

Qualis Medicina II: B1

Érika Cristina Ferreira¹, Larissa Ciupa², Angela Rigo Portocarrero³, Camila Fernanda Brustolin³, Paula Fernanda Massini⁴, Denise Lessa Aleixo⁵, Silvana Marques de Araújo⁶

¹Doctoral Student in Health Sciences at the State University of Maringá.

²Doctoral Student in Biosciences and Pathophysiology at the State University of Maringá.

³Master of Health Sciences at the State University of Maringá.

⁴Doctoral Student in Animal Sciences at the State University of Maringá.

⁵Ph.D. Professor in the center for Biological and Health Sciences.

⁶Ph.D. Professor in the Postgraduate Program in Health Sciences at the State University of Maringá.

Abbreviations: TNF- α , tumor necrosis factor alpha; INF- γ , Interferon gamma

Corresponding authorat: Department of Health Sciences, Laboratory of Parasitology,
block I90, Av. Colombo 5790, CEP: 87020-900 Maringá, PR, Brazil.

E-mail addresses: erikaestatistica@gmail.com (É.C Ferreira),

ciupalarissa@gmail.com (L. Ciupa),

angelarigo@gmail.com (A.R. Portocarrero),

brustolincamilaf@gmail.com(C.F. Brustolin),

paulavet_massini@hotmail.com (P.F. Massini),

denise.aleixo@unicesumar.edu.br (D. L. Aleixo)

smaraujo@uem.br (S.M. de Araújo).

ABSTRACT

Aim: This study evaluates and correlates the number of myocarditis foci and production of cytokines in *Rattus norvegicus* (Wistar lineage), experimentally infected with *T. cruzi* and treated with *Phosphorus*.

Methods: In two blind, controlled and randomized trials, 53 45-day-old, male animals were allocated into groups **Control (n=24)**: Control group infected and treated with 7% hydroalcoholic solution, the preparation vehicle of the test medication; and **Phosphorus (n=24 on days 0, 5, 10 and 24 after infection)**: group infected and treated with *Phosphorus* 13cH, diluted 10^{-26} and dynamized (test medication). The animals were inoculated intraperitoneally with 5×10^6 blood trypomastigotes of *T. cruzi*-Y strain. The medication was administered *overnight* (16 consecutive hours), diluted in water (1 mL / 100 mL) in amber water bottles. The animals were treated 2 days before and 2, 4, and 6 days after infection. Enumeration of inflammatory foci in cardiac tissue (Hematoxylin-Eosin) and dosage of cytokines TNF- α and IFN- γ in the serum were performed on days 0, 5, 10 and 24 after infection, using three animals/group. *Mann-Whitney*, *Friedman ANOVA*, *Spearman correlation* ($p < 0.05$), and *Statistica Single User Software version 13.2* were used for data analysis.

Results: The animals treated with *Phosphorus* 13cH had high concentration of IFN- γ on the 5th day of infection with significant decrease on the 10th and 24th days ($p < 0.05$), and high concentration of TNF- α on the 5th and 10th days of infection with decrease on the 24th day ($p < 0.05$). The treatment with *Phosphorus* caused a significant increase of IFN- γ and TNF- α on the 5th day of infection compared with the **Control** ($p < 0.05$), with reestablishment on the 24th day, as well as in the **Control** group. The group treated with *Phosphorus* had 52.5% less number of myocarditis foci in heart than **Control** group ($p < 0.05$) on the 10th day of infection. The significant increase in cytokines on the 5th day of infection in the *Phosphorus* group is related to a significant decrease in the number of inflammatory foci in cardiac tissue on the 10th day of infection in this group.

Discussion and Conclusion: Treatment with *Phosphorus* 13cH promotes beneficial effects in *T. cruzi* infection in Wistar rats by modulating the secretion of IFN- γ and TNF- α with decreased inflammation in cardiac tissue. These results reinforce the importance of considering the use of homeopathy for establishing new therapeutic approaches in the management of patients with Chagas disease.

Keywords: *Phosphorus*, *Trypanosoma cruzi*, Cytokines, TNF- α , IFN- γ .

Highlights

Phosphorus 13cH promotes beneficial effects in murine infection by *T. cruzi*;

The treatment beneficially modulates as inflammatory cytokines IFN- γ e TNF- α ;

The drug reduces inflammation of cardiac tissue in Wister rats infected with *T. cruzi*.

1. Introduction

American trypanosomiasis (Chagas disease) is a neglected parasitic disease resulting from *Trypanosoma cruzi* infection[1]. It affects 7 to 8 million people worldwide, especially in Latin America, where it is endemic[1]. Due to the occurrence of migration, the number of people with Chagas disease living in non-endemic countries, such as the United States, Canada, Europe, Japan and Australia, is increasing[2].

The pathophysiology of the disease is not fully understood, however, the involvement of a balanced immune response is essential to determine the course of the infection[3]. The infection is basically a inflammation process and heart is the main target organ[4]. Trypomastigote forms of *T. cruzi* promote secretion of cytokines in the infected host thatact synergistically in the production of nitric oxide in order to promote trypanocidal activity[5,6]. In view of this response, immune regulatory cytokines are secreted in order to avoid an exacerbated response with tissue damage[5,6].

Two drugs are available for the etiological treatment of the disease: Nifurtimox and Benznidazole. These drugs, besides presenting undesirable side effects that lead the patients not to adhere to the treatment, demonstrate better results in the acute phase of the disease and not in the chronic phase, in which the vast majority of the patients are diagnosed[1,2].

The study of new compounds and evaluation of the impact of treatment on the prevention of morbidity in infected individuals remain essential challenges in the pursuit of disease control and health promotion[7].In this context, studies with highly diluted substances are being conducted [3,7], and besides demonstrating benefits in the treatment of *T. cruzi* experimental infection, they prove that these substances contribute to reducing the toxicity and adverse effects of the medicines available, thus promoting the improvement of the quality of life in infected and treated individuals[3,8].

The medication ***Phosphorus***, in addition to being indicated for disorders observed in infection by *T. cruzi*[9,10],is able to modulate the immune response of rats, especially during the acute phase of the protozoan infection, with significant increase in lymphocytes, decrease in the period of patent parasitemia and in mortality rate[9,10]. The ***Phosphorus*** in homeopathy is related to the treatment of heart disease[11]. Considering the data available in the literature and the immunomodulatory effect of highly diluted medications, this study

evaluates and correlates the heart inflammation and the production of cytokines in *Rattus norvegicus* experimentally infected with *T. cruzi* and treated with *Phosphorus*.

2. Materials and methods

Experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at the Universidade Estadual de Maringá (UEM) – registration No. 110/2011. All procedures performed in this study were in accordance with the 3Rs rules, following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk/ARRIVE). The Vivarium in the Basic Parasitology laboratory is in accordance with current legislation (Lei 11.794/2008) in the country.

Two blind, controlled and randomized trials were performed on 53 45-day-old, male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar line). The animals were kept in the sectoral vivarium for seven days for adaptation to the environment, with controlled temperature ($21\pm 23^{\circ}\text{C}$), humidity (70%), and illumination, with 12:12 hourlight/dark cycle, receiving water and feed (Nuvilab Cr-1® by Nuvital®) *ad libitum*. After the initial period, they were allocated into two experimental groups, ensuring that the mean initial weights in the groups were statistically the same, being:

- a) **Control (n=24):** control group infected and treated with 7% hydroalcoholic solution, preparation vehicle of the test medication;
- b) **Phosphorus (n=24):** group infected and treated with homeopathic medicine *Phosphorus* 13cH, diluted 10^{-26} and dynamized (test medication).

The infected animals were inoculated intraperitoneally with 5×10^6 blood trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain), which, in previous experiments, allowed evolution of the infection to the chronic phase in the species *Rattus norvegicus* [12].

Collection of blood samples

The animals were anesthetized and euthanized through an excessive dose of anesthetic: Ketamine 300 mg/kg associated with xylazine 30mg/kg intraperitoneally. Blood was collected by cardiac puncture; after anesthetized, the animals were placed on a flat surface in lateral decubitus position and a needle was inserted above the abdomen at an angle of 10° to 30° [8]. The collection was performed in three animals per group, and the collections were performed before the infection (day 0) and on days 5, 10 and 24 after infection. Approximately 500 μL of each animal was collected in a vial without anticoagulant

in order to obtain serum, which was stored at -40°C in 90 μL aliquots. The proinflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α were evaluated.

Medication and treatment regimen

The medication *Phosphorus* was selected based on the beneficial results reported in studies conducted by Almeida [12] and Brustolin[10] in mice and rats infected with *T. cruzi*. The medication was prepared following the guidelines of the Farmacopéia Homeopática Brasileira[13] from *Phosphorus* (Bento Mure Homeopathy, São Paulo, Brazil) until dynamization 13cH, considered a low dynamization and chosen because it is an acute infection according to previous studies[3]. To achieve final dilution (10^{-26}), 13 successive dilutions of 1:100 were made. After each dilution, 100 mechanical agitations were performed (Denise 10-50 Mechanical Dynamizer, AUTIC, Brazil).

The medication was administered *overnight* (for 16 consecutive hours), diluted in water (1mL/100mL), in amber water bottles, being provided at 4pm and withdrawn at 8am the following day. The animals were treated 2 days before and 2, 4, and 6 days after infection, totaling four administrations[10]. The control group received only the 7% hydroalcoholic solution (used for preparing of the test medication), also diluted 1mL/100 mL in water.

Parameters evaluated

Considering that in the parasitemia curve, the peak of parasites on the 5th day after infection was evidenced[10], histopathological analyses, with enumeration of *inflammatory foci* and measurement of cytokines, were performed on days 0, 5, 10, and 24 after the infection. For this purpose, three animals from each experimental group were euthanized on each evaluation day.

Cytokines: The concentrations of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ were measured. Approximately 500 μL of blood from each animal, on each day evaluated, were collected in vials without anticoagulant and the serum was stored at -40°C in 90 μL aliquots. The Multiplex – Rat Cytokine Magnetic 10-Plex Panel (Invitrogen) kit was used for the analysis. The reaction was conducted according to the manufacturer's guidelines and fluorescence obtained using Luminex reader (Luminex® 200™ xPONENT). The concentrations of the cytokines were expressed in pg/mL.

Inflammatory foci: The heart of each animal, on each day evaluated, was collected. The organs were washed in 0.9% physiological solution, fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. Afterwards, the organs were maintained in 70% alcohol, until being subjected to the processes of dehydration, diaphanization and paraffin embedding. Histological sections with 5 μ m thickness stained with Hematoxylin-Eosin, obtained with an interval of 20 μ m, avoiding the repetition of the same inflammatory focus, were prepared. The sections were examined using an optical microscope, with 40x magnification, by counting the number of inflammatory *foci* present in 10 fields/section. The inflammatory *foci* was defined as a group of 10 or more inflammatory cells in general as described by Lopes et al. 2016[4].

Statistical Analysis: The data were analyzed statistically using the *Statistica Single User Software version 13.2* and *GraphPad Prism version 7.0*. The *Shapiro Wilk* test was performed to evaluate normality and after checking non-normality in the data, non-parametric tests were used. Evaluation of averages, standard deviations, median, maximum and minimum for the quantitative variables were evaluated, followed by the *Mann-Whitney* test for comparison of two groups in both cytokines and inflammatory focus. The non-parametric Friedman ANOVA paired test was used to evaluate the evolution over the 5th, 10th and 24th days after infection. *Spearman* correlation between quantitative variables was used when necessary. The level of significance was 5%.

3. Results

Immunological analysis

Cytokine analysis is illustrated in Figure 1- graphs 1 and 2. It can be observed that the infection with *T. cruzi* (**Control** group) in *wistar* rats stimulates the production of the pro-inflammatory cytokines evaluated (INF- γ and TNF- α). In this group, the concentration of INF- γ is higher on the 5th and 10th day of infection, with decrease on the 24th day, and the concentration of TNF- α increases on the 10th day of infection ($p < 0.05$) and decreases significantly on the 24th day ($p < 0.05$).

Considering the production of pro-inflammatory cytokines INF- γ and TNF- α during the course of the infection, it is observed that the treatment with *Phosphorus* causes a significant increase on the 5th day of infection compared with the **Control** ($p < 0.05$), with reestablishment on the 24th day, as observed in the **Control** group.

Histological analysis

The analysis of inflammatory *foci* in the heart is illustrated in Figure 1 - Graph 3 and photo 4. When evaluating the number of inflammatory *foci*, we observed that there were more on the 10th day of infection in both groups evaluated ($p < 0.05$). By comparing the groups, on the 10th day of infection, the group treated with **Phosphorus** has 52.5% less inflammatory *foci* in the heart than the **Control** group ($p < 0.05$).

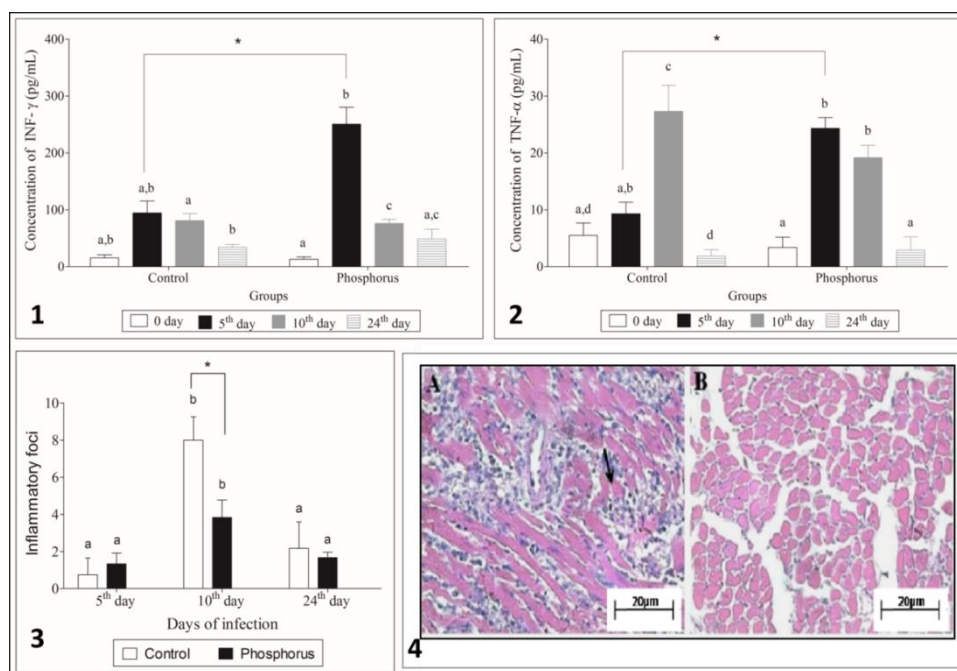


Figure 1.

Graph 1-2. Concentration of cytokines in serum in *Rattus norvegicus* infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain). Concentration of each group at different times: 0, 5th, 10th and 24th days after infection. Groups: **Control** – infected and untreated animals; **Phosphorus** – infected animals, treated with **Phosphorus** 13cH. Statistics: *Corresponds to a significant difference between the groups at the same time of infection –Mann-Whitney Test ($p < 0.05$). Different letters correspond to a significant difference between times in the same groups –Mann-Whitney Test ($p < 0.05$).

Graph 3. Inflammatory foci in *Rattus norvegicus* infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) evaluation at different times: 5th, 10th and 24th days after infection. Groups: **Control** –infected and untreated animals; **Phosphorus** – infected animals, treated with **Phosphorus** 13cH. Statistics: *Corresponds to a significant difference between the groups at the same time of infection –Friedman ANOVA Test ($p < 0.05$). Different letters correspond to a significant difference between times or groups –Mann-WhitneyTest ($p < 0.05$).

Photo 4. Inflammatory foci in heart of *Rattus norvegicus* rat infected with the Y strain of *T. cruzi*. Groups: (A) Control– Greater inflammatory process and (B) **Phosphorus**– Without the presence of inflammatory foci (400x, HE).→ (Arrow) - Indicates example of area with inflammation.

Citokines vs inflammatory foci

In Figure 2, we have the relationship between the concentration of cytokines INF- γ and TNF- α evaluated on the 5th day of infection and the number of inflammatory *foci* on the 10th day of infection.

The increase of pro-inflammatory cytokines in **Phosphorus** group is related to a significant decrease in the number of inflammatory *foci*. A detailed analysis of the cells involved in the inflammatory foci is a prospect of advancing the understanding of the action of this drug on murine *T. cruzi* infection.

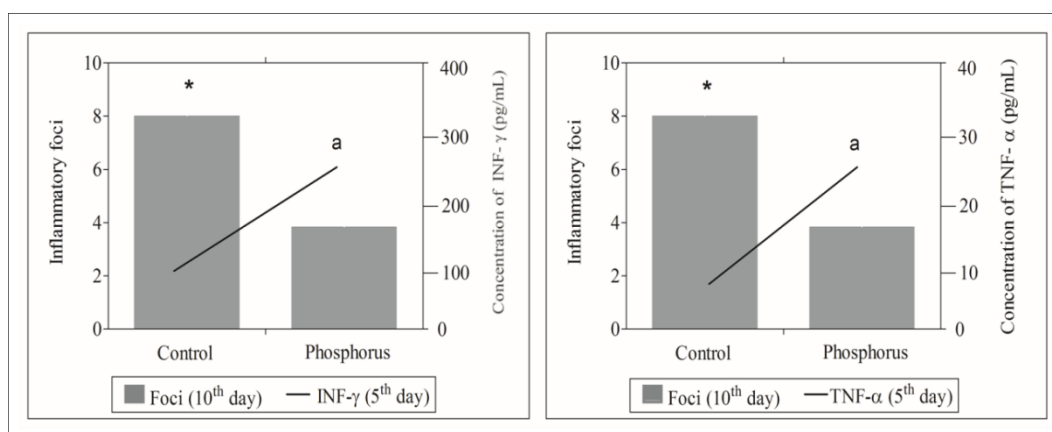


Figure 2.

Relationship between the concentration of cytokines no serum in pg/mL (INF- γ and TNF- α) on the 5th day of infection and the number of inflammatory foci in the heart on the 10th day of infection, in *Rattus norvegicus* infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain).

Groups: Control - infected and untreated animals; **Phosphorus**-infected animals, treated with **Phosphorus** 13cH.A:Significant difference between the groups regarding concentration of cytokines no serum INF- γ ($\rho=-0,89$) or TNF- α ($\rho=0,90$) on the 5th day after infection – $p<0.05$; *Significant difference between the groups regarding the number of inflammatory foci on the 10th day after infection $p<0.05$.

4. Discussion

When relating the number of focuses in the myocardium and production of cytokines in *Rattus norvegicus* experimentally infected with *T. cruzi* and treated with **Phosphorus** 13cH, it can be observed that the treatment interferes with the course of infection by modifying the production of pro-inflammatory cytokines and decreasing the inflammation in cardiac tissue.

When the animal is infected, the parasite enters the cells of the host and initiates a cycle of differentiation and proliferation, causing acute systemic inflammation. On the 5th day of infection in *Rattus norvegicus* there is a peak of parasites in the blood[10], and this is when

we observe the increase in pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α , which integrates the immune response of the host to control the parasitic load.

The cytokines IFN- γ and TNF- α play important roles in *T. cruzi* infection and act synergistically in order to modulate the immune response in the host, inducing resistance to infection[14]. The inflammatory response is triggered by events originating from cells, such as synthesis of cytokines and nitric oxide, which are essential for the host's resistance[15]. The macrophage is a cell that acts against the parasite through the production of NO stimulated by IFN- γ , initially produced by Natural Killer cells[15]. TNF- α , in turn, is secreted by macrophages and is able to recruit inflammatory leukocytes, such as phagocytes and monocytes, to the site of infection, and potentiate lysis mediated by cytotoxic T lymphocytes. This cytokine also seems to mediate its trypanocidal function through an autocrine pathway [14].

Despite the beneficial effects of pro-inflammatory cytokines in the attempt to eliminate the parasite, several studies have evidenced that cytokines and chemo-cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , and NO metabolites, are related to inflammation and disease progression when the parasite-host relationship is unbalanced[6,14–16]. In the present study, the positive outcome therefore reflects the balance provided by the highly diluted **Phosphorus** medication.

Furthermore, in this study, the increase in the concentration of cytokines on the 5th day of infection seems to produce, in a moment after its production, the control of inflammation, with decrease in the number of inflammatory *foci* in the cardiac tissue on the 10th day of infection. Figure 3 clearly shows the positive relationship between the increase in concentration of the cytokines on the 5th day of infection, and the decrease in tissue inflammation. It demonstrates that the medication **Phosphorus** 13cH provides an immune response capable of reducing damage to the cardiac tissue, characterizing protection, since inflammation is one of the main events in the pathogenesis of *T. cruzi* infection[6,8,15].

TNF- α and IFN γ cytokines are in high concentrations in *T. cruzi* infection. In this study, a significant increase of these cytokines occurred in the group treated with **Phosphorus** compared with the control. This data suggests that other substances may be involved in the final result of this process. In other studies[12,16,19], in addition to the cytokines measured here, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 presented significant variation in response to the

administration of homeopathic medications, altering the balance of Th1 and Th2 response in mice infection by *T. cruzi*, which may lead to beneficial results or not. Likewise, the Th1/Th2 ratio, inflammatory alterations in spleen, number of megakaryocytes, B cells and number of free amastigotes at the site of infection were observed in BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* and treated with the biotherapeutic prepared with the parasite[18]. Together, these data show that homeopathic medications modulate the secretion of cytokines, which are peptides or glycoproteins[21]. Considering that epigenetic alterations can be conceptualized as functionally relevant changes for the genome which do not involve a change in the nucleotide sequence[21], the literature shows that the intracellular signaling triggered by cytokines can be altered by epigenetic mechanisms[18,20,21]. It suggests that homeopathic medications can trigger these epigenetic alterations, as already mentioned by other authors [20,18], considering the results of Bellavite et al. [22].

5. Conclusion

The results demonstrate that the treatment with *Phosphorus* 13cH promotes beneficial effects in *T. cruzi* infection in *Wistar* rats by modulating the secretion of IFN- γ and TNF- α with reduced inflammation in cardiac tissue.

These results, added to others already published [3,6], evidence the benefits provided by highly diluted medications for the treatment of *T. cruzi* infection, reinforcing the importance of considering the use of homeopathy to establish new therapeutic approaches in the management of patients with Chagas disease.

Funding information

This study was financed by Fundação Araucária, CAPES and CNPq.

Ethical approval

The study was approved by the Standing Committee on Ethics in Research Involving Animals, according to CEUA 110/2011.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Authors' contributions

Érika Cristina Ferreira: Critical review of important intellectual content; analysis and interpretation of data; final approval of the version to be presented.

Larissa Ciupa: Critical review of important intellectual content; analysis and interpretation of data; final approval of the version to be presented.

Angela Rigo Portocarrero: Analysis and interpretation of data

Camila Fernanda Brustolin: Elaboration of important intellectual content and data acquisition.

Paula Fernanda Massini: Data acquisition.

Denise Lessa Aleixo: Co-authored the conception and design of the study.

Silvana Marques de Araújo: Conception and design of the study; critical review of the intellectual content; final approval of the version to be presented.

References

- [1] World Health Organization (WHO), Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis., WHO Tech. Rep. Ser. (2012) v–xii, 1-100. doi:978 92 4 120975 5.
- [2] J. Carlos Pinto Dias, A. Novaes Ramos Jr, E. Dias Gontijo, A. Luquetti, M. Aparecida Shikanai-Yasuda, J. Rodrigues Coura, R. Morais Torres, J. Renan da Cunha Melo, E. Antonio de Almeida, W. de Oliveira Jr, F. Scalabrini Pinto, A. Walter Ferreira, A. Rassi, A. Augusto Fragata Filho, A. Silvestre de Sousa, D. Correia Filho, A. Maria Jansen, G. Manzan Queiroz Andrade, C. Felícia De Paoli de Carvalho Britto, A. Yecê das Neves Pinto, A. Rassi Jr, D. Elisabeth Campos, F. Abad-Franch, S. Eloi Santos, E. Chiari, A. Marcel Hasslocher-Moreno, E. Furtado Moreira, D. Seila de Oliveira Marques, E. Lages Silva, J. Antonio Marin-Neto, L. Maria da Cunha Galvão, S. Salles Xavier, S. Aldo da Silva Valente, N. Barbosa Carvalho, A. Viana Cardoso, R. Albuquerque Silva, V. Maia da Costa, S. Monzani Vivaldini, S. Mamede Oliveira, V. da Costa Valente, M. Maia Lima, R. Vieira Alves, II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015* Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015 Antônio Carlos Silveira (in memoriam) Joffre Marcondes de Rezende (in memoriam), Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília. 25 (2016) 7–86. doi:10.5123/S1679-49742016000500002.
- [3] D.L. Aleixo, F.K. da Veiga, L. Ciupa, A.R. Portocarrero, P.F. Sandri, F.N. Ferraz, C.F. Braga, M.J. Benvenuti, S.M. de Araújo, Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*, Int. J. High Dilution Res. 12 (2013) 93–94. doi:10.1186/1756-0500-5-352.
- [4] C.R. Lopes, G.J.S. Falkowski, C.F. Brustolin, P.F. Massini, É.C. Ferreira, N.M. Moreira, D.L. Aleixo, E.N. Kaneshima, S.M. de Araújo, Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*, Homeopathy. 105 (2016) 186–193. doi:10.1016/j.homp.2015.09.005.
- [5] A.R.L. Teixeira, R.J. Nascimento, N.R. Sturm, Evolution and pathology in Chagas disease - A Review, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101 (2006) 463–491. doi:10.1590/S0074-02762006000500001.
- [6] L.E. Fichera, M.C. Albareda, A. Laucella, M. Postan, S.A. Laucella, Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi* in Cardiac Myocytes Is Inhibited by Cytokine-Induced Nitric Oxide Release Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi* in Cardiac Myocytes Is Inhibited by Cytokine-Induced Nitric Oxide Release, 72 (2004) 359–363. doi:10.1128/IAI.72.1.359.
- [7] M.T.B. Isabel Mayer de Andrade, Maria Terezinha Bahia, Avaliação in vivo da atividade anti -*Trypanosoma cruzi* de derivados nitroimidazólicos [Dissertation], Universidade Federal de ouro preto, 2011. <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/2616>.
- [8] F.N. Ferraz, G.K. Simoni, A. do Nascimento, C.S. de Melo, D.L. Aleixo, M.L. Gomes, M. Spack, S.M. de Araújo, Different forms of administration of biotherapy 7dH in

- mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects, *Homeopathy*. 100 (2011) 237–243. doi:10.1016/j.homp.2011.05.006.
- [9] J.T. Kent, *Phosphorus* par le Dr J.T. KENT, Conférence Extr. La Rev. Med. Adv. Juillet 1989. Trad. Par Le Docteur Périchon-Bastaire. (1992). <http://www.homeoint.org/cgh/29-1992/kentpho.htm> (accessed February 10, 2015).
- [10] C.F. Brustolin, C. Fontes, N.M. Moreira, C.R. Lopes, C.F. Braga, P.F. Massini, G. Janaina, S. Falkowski, C. Edmundo, R. Fontes, D.L. Aleixo, S.M. De Araújo, Homeopathic treatment reduces parasitemia and protects colon myenteric neurons Wistar rats infected by *Trypanosoma cruzi*, *Proc. XXVII GIRI Symp. Bern Homeopath.* (2013) 3–6.
- [11] Y. Demarque, D;Jouanny, J., Poitevin, B., Saint-Jean, *Farmacologia e material médica homeopática*, 1^o edição, São Paulo, n.d.
- [12] L.R. de Almeida, Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*, *Homeopathy*. 97 (2008) 65–69. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2008.02.009>.
- [13] A.N.D.V.S. Farmacopéia, *Farmacopeia Brasileira*, Farm. Bras. 5^a Edição. 1 (2010) 1–523. doi:10.1590/S0102-33062006000100002.
- [14] J.C. Aliberti, J.T. Souto, A.P. Marino, J. Lannes-Vieira, M.M. Teixeira, J. Farber, R.T. Gazzinelli, J.S. Silva, Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection., *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 1433–40. doi:10.1016/S0002-9440(10)64094-1.
- [15] W.R. Pavanelli, *Citocinas e óxido nítrico na doença de Chagas*, Biosáude, Londrina, Dez. 2008. 10 (2008) 147–155.
- [16] J.S. Silva, G.N. Vespa, M. a Cardoso, J.C. Aliberti, F.Q. Cunha, Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages., *Infect. Immun.* 63 (1995) 4862–4867.
- [17] *Farmacopeia Homeopática Brasileira 3^a edição 2011*, 2011.
- [18] A. Paula, B. Cajueiro, E. Puna, H. Antônio, I. Almeida, H. Keiko, S. Marques, L. Villano, N. Brêtas, D.N. Gomes, M. Teixeira, L. Castelo-branco, E. Paraguai, D.S. Dias, S. Pyrrho, C. Holandino, Cytokine Homeopathic medicines cause Th1 predominance and induce spleen and megakaryocytes changes in BALB / c mice infected with *Leishmania infantum*, *Cytokine*. 95 (2017) 97–101. doi:10.1016/j.cyto.2017.02.010.
- [19] P. Bellavite, A. Conforti, *Immunology and Homeopathy . 1 . Historical Background*, (2006). doi:10.1093/ecam/neh141.
- [20] F. Rodrigues de Santana, C. de Paula Coelho, T.N. Cardoso, E.C. Perez Hurtado, N. Roberti Benites, M. Dalastra Laurenti, L. Villano Bonamin, Modulation of inflammation response to murine *cutaneous Leishmaniasis* by homeopathic medicines:

- Antimonium crudum 30cH, Homeopathy. 103 (2014) 264–274.
doi:10.1016/j.homp.2014.08.006.
- [21] P. Bellavite, A. Signorini, M. Marzotto, E. Moratti, C. Bonafini, D. Oliosio, Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects, Homeopathy. 104 (2015) 139–160.
doi:10.1016/j.homp.2015.02.002.
- [22] P. Bellavite, M. Marzotto, D. Oliosio, E. Moratti, A. Conforti, High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic mechanisms, Homeopathy. 103 (2014) 22–43.
doi:10.1016/j.homp.2013.08.002.

Artigo 2 - “Medicamento ultradiluído produzido a partir de soro de animal refratário ao *Trypanosoma cruzi* aumenta a sobrevivência e interfere na imunomodulação de citocinas em camundongos experimentalmente infectados”

Artigo a ser submetido revista: *Microbial Pathogenesis*

ISSN: 0882-4010

Qualis Medicina II: B1

Érika Cristina Ferreira¹, Larissa Ciupa², Larissa Aparecida Ricardini³, Fernanda Tomiotto Pellissier⁴, Ivete Conchon Costa⁵, Denise Lessa Aleixo⁶, Silvana Marques de Araújo⁷

¹Doutoranda em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá.

²Doutoranda em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá.

³Graduanda em Biomedicina no Centro Universitário Ingá.

⁴Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia - Instituto Carlos Chagas FIOCRUZ- PR.

⁵Professora Doutora do programa de pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina.

⁶Professora Doutora do centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UNICESUMAR

⁷Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá.

Abbreviations: TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; INF- γ : Interferon gamma; IL-6: Interleukin 6; NO: Oxído Nítrico.

Corresponding authorat: Department of Health Sciences, Laboratory of Parasitology, block I90, Av. Colombo 5790, CEP: 87020-900 Maringá, PR, Brazil.

E-mail addresses: erikaestatistica@gmail.com (É.C Ferreira),
ciupalarissa@gmail.com (L. Ciupa),
larissaricardini@hotmail.com (L.A. Ricardini),
fernandantomiotto@hotmail.com (F. Tomiotto-Pellissier),
conchon@uel.br (I. Conchon-Costa),
denise.aleixo@unicesumar.edu.br (D. L. Aleixo),
smaraujo@uem.br (S.M. de Araújo).

RESUMO

Introdução: A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, infecta 8 milhões de pessoas nas Américas sendo, 1,5 milhões deles no Brasil que dispõe somente do benznidazol para o tratamento etiológico da infecção. Esse fármaco além de provocar efeitos colaterais importantes e possui baixa eficácia na fase crônica da doença. Assim, a procura de um tratamento complementar ou alternativo tem sido o objetivo de muitos pesquisadores. A literatura mostra que medicamentos ultradiluído tem sido investigados por ser uma possibilidade e que aqueles preparados a partir de soro de animal sadio e resistente a infecção apresenta melhor efeito. Assim, bioterápicos produzidos a partir de soro de galinha (*Gallus*

Gallus domesticus), que é um animal refratário à infecção por *T. cruzi*, podem ser uma opção de tratamento complementar. Desta maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do bioterápico na dinamização 13cH produzido a partir de soro de *Gallus gallus domesticus*, na sobrevivência, clínica e dinâmica de secreção de alguns marcadores imunológicos do hospedeiro. **Materiais e métodos:** Em três ensaios cegos, controlados e randomizados, utilizaram-se 55 camundongos suíços, machos, 56 dias. Os animais foram distribuídos em três grupos e mantidos em gaiolas microambientadas: CNI (controle não infectado) = 5 animais, CI (controle infectado) = 18 animais e 13cH (animal tratado com soro de galinha 13cH) = 32 animais. A infecção foi realizada por via intraperitoneal, 1.400 tripomastigotas sanguíneas, cepa Y-*T. cruzi*. O estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UEM, parecer 2401220716/2016. Para o preparo dos medicamentos foi utilizado pool do soro de cinco galinhas com 65 semanas de idade, linhagem Hy-Line W-35. A coleta do sangue foi realizada na veia jugular assepticamente e o preparo do medicamento foi realizado no mesmo dia, em fluxo laminar, utilizando agitador mecânico (Denise 10-50 Autic, Campinas, Brasil), de acordo com a Farmacopeia Homeopática Brasileira até a dinamização 13cH. Foram comparados entre os grupos parâmetros parasitológicos, clínicos, sobrevida e dosagens de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e NO (Oxido Nítrico). Para análise dos dados, utilizou-se o teste *t* não pareado, ANOVA, correlação de *Pearson*, *Kruskal-Wallis* seguido de teste de *Dunn*, estimativa de sobrevida não paramétrica com estimador de *Kaplain-Meier* - teste de *Logrank*, com 5% de significância. **Resultados e discussão:** No grupo 13cH, 42,31% (n=11) dos animais sobreviveram mais de 2 semanas comparados a 25,0% (n=3) no grupo CI. Em 13cH o tempo médio de vida ($47,3 \pm 63,5$) e a estimativa de sobrevida (60,1 dias) foram maiores ($p=0,0069$ e $p=0,0088$) que no grupo CI ($13,0 \pm 3,0$ e 13,9 dias). Da mesma forma, a sobrevida mínima e a máxima de 13cH de (13 e 161 dias) foi maior que a de CI (8 e 17 dias). Este resultado indica aumento de sobrevida animal associado ao tratamento com o medicamento produzido a partir de soro de animal refratário. A parasitemia no grupo 13cH no 7º dpi foi maior do que no CI ($p=0,0001$). Como o resultado final foi favorável ao hospedeiro, entende-se que o aumento de parasitemia foi ação do medicamento para provocar resposta combativa do organismo mais precocemente, a dinâmica da temperatura foi mais homogênea no grupo 13cH que em CI ($p=0,0285$). As contrações de IFN- γ e de IL-6 estavam diminuídas no 8º dpi quando comparado ao controle. Foi observada correlação positiva na produção de NO/IFN- γ e de IFN- γ /TNF- α no grupo 13cH diferente de CI. Embora o tratamento ative o sistema imunológico do animal, as citocinas pro-inflamatórias apresentaram produção diminuída em 13cH comparado a CI com reação mais equilibrada do organismo, impedindo aumento exagerado de TNF- α ou NO ($p<0,05$), reduzindo inflamação e danos teciduais, evitando morte precoce, diferente do observado em CI. **Conclusão:** O tratamento da infecção murina por *T. cruzi* com soro ultradiluído de animal refratário a esta infecção apresentou modulação diferenciada do sistema imunológico, com alteração do curso da infecção e secreção de TNF- α , IFN- γ , IL6 e NO promovendo aumento de sobrevida e tempo de vida estimado.

Palavras chave: Homeopathy, Chagas disease, Serum, *Gallus gallus domesticus*, Refractory animal.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, acomete aproximadamente oito milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina[1,2] sendo 1,5 milhões deles no Brasil. Todavia, até o momento, o Brasil dispõe somente do benznidazol para o tratamento desta infecção, sendo que este medicamento pode provocar efeitos colaterais importantes com baixa eficácia na fase crônica da doença. Assim, a procura de novos tratamentos tem sido o objetivo de muitos pesquisadores[3–5].

O curso da infecção murina com a cepa Y de *T. cruzi* é bem conhecido, constituindo-se em bom modelo para o entendimento do efeito de novas intervenções terapêuticas. Mesmo com inóculo baixo, esta cepa produz invariavelmente morte de todos os camundongos suíços infectados[6,7] desse modo, o percentual de sobrevivência pode ser importante preditor. O efeito de medicações ultradiluídas vem sendo demonstrado em diversos experimentos por vários grupos de pesquisa[4,8–12].

Estudo anterior realizado por nosso grupo[8] testou a utilização de bioterápico de animais parcialmente resistentes (coelho) e susceptíveis (camundongo) à infecção por *T. cruzi*, favorece a resposta do hospedeiro tratado quanto mais resistente era a espécie doadora do soro para preparo do medicamento. Seguindo esta linha de raciocínio, foram encontrados na literatura estudos anteriores que relatam que a galinha (*Gallus gallus domesticus*) é um animal refratário à infecção por *T. cruzi*[13].

T. cruzi injetado na pele de aves é eliminado no ponto de inoculação e, aparentemente, não atinge a corrente sanguínea. A galinha é um animal refratário e possui essa característica mesmo antes do nascimento[13]. Essa refratariedade pode ser considerada uma resistência natural ao *T. cruzi*. Ovos de galinhas embrionados e inoculados dos com formas sanguíneas de *T. cruzi* apresentaram-se parasitêmicos apenas alguns dias após o período embrionário e 32 dias após o nascimento, os pintos originados apresentaram-se ausentes de infecção[13]. Warren e Borsos [15] atribuíram a refratariedade das aves ao *T. cruzi* à presença no soro de um anticorpo aglutinante.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do bioterápico na dinamização 13cH produzido a partir de soro de *Gallus gallus domesticus* refratário ao *T. cruzi* na sobrevivência, clínica e no sistema imune do hospedeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ética animal

O uso, a manutenção e o cuidado dos animais experimentais foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, parecer CEUA 2401220716/2016. Os procedimentos realizados no Biotério Setorial da Parasitologia seguem os princípios propostos no 3Rs que visam à redução, refinamento e substituição, sendo que a essa quantidade de animais solicitados e as metodologias utilizadas estão amparadas por referências bibliográficas que justificam o número de animais necessários em experimentos com substâncias ultradiluídas [16].

As recomendações da Lei Nacional nº. 11.794 (8 de outubro de 2008) para a gestão científica dos animais foram seguidas[17]. O Biotério encontra-se de acordo com a legislação vigente, e desta forma dispõe de condições favoráveis ao bem-estar dos animais durante todos os procedimentos realizados, com acompanhamento de um profissional capacitado. Nesse experimento foi utilizado o *end point* de 161 dias.

2.2. Animais e infecção experimental

Foram realizados três ensaios cegos, controlados e randomizados, utilizando 55 camundongos suíços, machos com 56 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram distribuídos em grupos e mantidos em unidades experimentais com no máximo 4 animais por gaiolas microambientadas de polisulfona (ALESCO®), com 20 cm x 32 cm x 21 cm, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), com ciclo de claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. Os três grupos foram mantidos nas mesmas condições experimentais.

Os animais infectados foram inoculados por via intraperitoneal, com 1.400 tripomastigotas sanguíneos (formas infectantes) de *T. cruzi*-cepa Y[18]. A cepa Y é uma das cepas mais utilizadas nos estudos experimentais e suas propriedades biológicas e moleculares são amplamente conhecidas[18]. Os animais foram monitorados diariamente com avaliação de bem-estar, parasitemia, marcadores imunológicos e sobrevivência durante o experimento.

2.3. Delineamento experimental e regime de tratamento

Os camundongos foram distribuídos em grupos de modo que a média inicial dos pesos dos animais em cada grupo fossem estatisticamente iguais.

O medicamento foi diluído em água (1 mL / 10 mL) e fornecido *ad libitum* em garrafa âmbar estéril de acordo com Aleixo e colaboradores[6], durante 16 horas consecutivas (medicamento disponível para os animais das 16:00 às 08:00), no 4º, 7º e 10º dia após a infecção (totalizando 3 doses). O esquema de tratamento baseia-se na ação do medicamento que está ligada aos seus efeitos imunológicos e à evolução específica da cepa Y de *T. cruzi* em camundongos *Swiss*[6,8] e com base em estudo anterior desenvolvido por Ferraz e colaboradores[8] que observou que o bioterápico produzido a partir de soro de coelho apresentou modulação diferenciada da resposta imune do hospedeiro infectado com *T. cruzi*.

Os grupos experimentais foram os seguintes:

O Grupo CNI (Controle não infectado) foi composto por 5 animais, o grupo CI (controle infectado) foi composto por 18 animais e o grupo de tratamento 13cH (animal tratado com soro de galinha 13cH) foi composto por 32 animais.

1) 13cH - Animais tratados com bioterápico de soro de galinha 13cH (n=32). Foram avaliados 26 animais para os dados de parasitemia, sobrevivência e clínica, já para as citocinas foram sacrificados 6 animais (3 no tempo 8 e 3 no tempo 12 após a infecção).

2) CI - (Controle infecção). Os animais foram infectados e não receberam tratamento (n=18). Foram avaliados 12 animais para os dados de parasitemia, sobrevivência e clínica, já para avaliação das citocinas foram sacrificados 6 animais (3 no tempo 8 e 3 no tempo 12 após a infecção).

3) CNI - (Controle não infectado). Animais não infectados e não tratados (n=5). Foram utilizados cinco animais para os parâmetros avaliados.

2.4. Preparo dos medicamentos

Para o preparo dos medicamentos foram utilizadas amostras de soro obtidas de sangue de cinco galinhas (pool) com 65 semanas de idade, da linhagem Hy-Line W-35, mantidas na Fazenda Experimental da UEM em Iguatemi (FEI), distrito de Maringá - PR.

A coleta do sangue para obtenção do soro foi realizada na veia jugular de forma asséptica e o material foi conduzido ao Laboratório da Parasitologia para processamento. As amostras foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 min e o soro separado.

O preparo do medicamento foi realizado no mesmo dia, em fluxo laminar, em escala centesimal até a dinamização 13cH, para atingir a diluição final 13 diluições sucessivas de 1:100 foram feitas. Após cada diluição, foram realizadas agitações mecânicas utilizando dinamizador mecânico (Denise 10-50 Autic, Campinas, Brasil), de acordo com a Farmacopeia Homeopática Brasileira - 3ª edição[19]. A primeira diluição (1:100) de soro de galinha foi realizada em água estéril, com 100 sucussões mecânicas, resultando na dinamização 1cH; assim foi feito até a dinamização 3cH. Das dinamizações 4cH a 12cH o veículo utilizado nas diluições foi solução de álcool a 70%. O preparo da dinamização 13cH a ser administrada foi realizada em solução de álcool 7%, e armazenada em temperatura ambiente ao abrigo de luz e em frasco âmbar[8].

A dinamização 13cH foi selecionada com base na experiência clínica e nos resultados benéficos observados em trabalho que avaliou camundongos *Swiss* experimentalmente inoculados por *Trypanosoma cruzi* e tratados com soro de coelho que são animais resistentes a infecção[8].

2.5. Parâmetros avaliados

2.5.1. Parâmetros parasitológicos: A parasitemia foi avaliada usando a técnica de Brener[20] e a contagem de parasitos foi realizada no 4º dia para confirmação da infecção dos animais nos 7º e 8º dias após a infecção (7º dpi e 8º dpi onde 0 é o dia da infecção) para efeito comparativo dos grupos avaliados, já que existe a produção de um pico de parasitos característico neste período para a cepa utilizada[20].

2.5.2. Dosagem de citocinas: Foram avaliadas 3 amostras de soro por grupo em cada um dos tempos experimentais: Dia 0 (animal ainda saudável), 8º dpi e 12º dpi. Foi utilizado o kit *Cytometric Bead (CBA, BD Biosciences®)* para dosar os níveis de IFN- γ , IL-6, TNF- α seguindo as instruções do fabricante. A obtenção dos níveis das citocinas foi realizada usando um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus.

2.5.3. Determinação dos níveis de nitrito: O nitrito foi avaliado como descrito por Panis e colaboradores[21]. As amostras foram desproteinizadas pela adição de solução de sulfato de

zinco (ZnSO_4) e hidróxido de sódio (NaOH). A mistura foi centrifugada (10.000 rpm, 5 minutos, 4° C). O sobrenadante foi recuperado e diluído em tampão glicina. Os grânulos de cádmio foram enxaguados em água destilada estéril e adicionados a uma solução de sulfato de cobre (CuSO_4), que foi deixada em repouso durante 5 minutos e os grânulos de cádmio revestidos com cobre foram então utilizados dentro de 10 minutos. Os grânulos ativados foram adicionados ao sobrenadante diluído em tampão glicina e agitados durante 10 min. Aliquotas de 50 μL de sobrenadante foram transferidas para microplacas de 96 poços e foi adicionado um volume igual de reagente de Griess. Uma curva de calibração foi preparada usando nitrito de sódio (NaNO_2) em diferentes concentrações, e a absorbância foi determinada a 550 nm em um leitor de microplacas.

2.5.4. Parâmetros clínicos: Foram avaliados diariamente de acordo com o protocolo proposto por Falkowski 2016[10]. A temperatura corporal foi medida na região frontal da perna esquerda, devido à menor quantidade de pelo (IcelThermometer, Model TD-920.0387). O peso corporal foi medido em balança semianalítica (Balance BEL®). Consumo de água (300mL / grupo / dia) e ração (400g / grupo / dia) foram medidas por unidade experimental e divididos pelo número de animais por grupo:

$$\text{Consumo}_{\text{Total}} = \frac{\text{Peso/volume adicionado} - \text{Peso/volume após 48 horas}}{\text{Número de animais por unidade experimental}}$$

O resultado final na clínica (peso, temperatura e consumo de ração) obtido foi reagrupado em períodos (considerando as médias dos dias avaliados): *Entre infecção e o pico* (Período entre a infecção do animal e o 7º dpi que ocorre antes do pico de parasitos) e *Após o pico* (Realizado avaliações sucessivas até duas semanas após a infecção ou morte do animal).

2.5.5. Sacrifício dos animais: Para coleta de amostras sanguíneas por punção cardíaca, os camundongos foram anestesiados em câmara saturada de vapor de halotano (Dose: 1,5%-Inalatório). Para o sacrifício dos animais após o termino do experimento, após atingir o plano anestésico (como o mesmo medicamento e dosagem) os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento crânio-cervical.

2.5.6. Análise de sobrevida: Foi registrado o período de vida (em dias) dos animais após a infecção em todos os grupos, considerando 161 dias como *endpoint*.

2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com auxílio dos *softwares Graph Pad Prim Version 7, Statistica Single User Version 13.2 e R 3.0.2*. Foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* para analisar a normalidade dos dados. Somente os dados de citocinas apresentaram normalidade (utilização de testes paramétricos), e para os dados que não apresentaram normalidade optou-se pelo uso de estatística não paramétrica. Para os dados paramétricos foi utilizado teste *t* não pareado, *ANOVA* para medidas repetidas e correlação de *Pearson* para avaliar possíveis relações entre os tempos avaliados nas citocinas em cada um dos grupos separadamente. Já para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* para comparações dos grupos (13cH, CI e CNI), seguidos pelo teste de *Dunn* quando necessário. Também foi realizada a estimação de sobrevida não paramétrica dos grupos com base no estimador de *Kaplain-Meier*, segundo do teste de *Logrank* para comparação das curvas. A maior sobrevivência dos animais do grupo tratado em relação ao controle só ficou evidenciada após a duplicação da amostra (sem alteração da média e do desvio padrão) uma vez que para esta análise necessita-se de grupos experimentais com maior número de animais para demonstração de efeitos de medicamentos altamente diluídos, considerando os parâmetros usualmente avaliados[4] o que não vem sendo permitido pelos comitês de ética em experimentação animal. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, foram considerados significativos $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise de sobrevida animal e parasitemia

No grupo tratado com bioterápico soro de galinha 13cH (13cH), 42,31% (n=11) dos animais e no grupo Controle (CI), 23,08% (n=3) sobreviveram mais de 2 semanas. Este resultado indica aumento de sobrevida animal associada ao tratamento com o medicamento produzido a partir de soro de animal refratário.

Reforçando esse resultado, o tempo médio de vida ($47,3 \pm 63,5$) foi maior no grupo 13cH ($p=0,0069$) do que no CI ($13,0 \pm 3,0$). A estimativa de sobrevida do 13cH foi de 60,1 dias, a sobrevida mínima foi de 13 e a máxima de 161 dias (Tabela 1), enquanto que o CI apresentou menor sobrevida média de 13,9 dias ($p=0,0088$) com mínimo de 8 e máximo de 17 dias (Figura1). Diversos estudos[6,22,23] também mostraram aumento da sobrevida em animais infectados com *T. cruzi* devido ao tratamento com medicamento ultradiluído.

A parasitemia sofreu efeito do tratamento utilizado, já que o 13cH apresentou maior parasitemia no 7º dpi, quando comparado ao CI ($p=0,0001$). Essa diferença pode estar relacionada, ao aumento em menor intensidade, das citocinas avaliadas em comparação ao controle, como se verá mais adiante. O mesmo ocorreu no 8º dpi embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 1).

Nossos resultados diferem dos achados por Aleixo e colaboradores[6] que observou redução da parasitemia no tratamento de animais experimentalmente infectados e tratados com bioterápico produzido a partir do próprio *T. cruzi*. Além disso, estes dados mostram que os efeitos de medicamentos altamente diluídos apresentam particularidades que estão fortemente correlacionadas aos insumos biológicos utilizados no seu preparo, dinamização, esquema de tratamento, espécie animal utilizada entre outros. O assunto merece maior aprofundamento e talvez estudos exploratórios comparativos para eleição da melhor proposta, sempre considerando a individualidade de resposta em sentido amplo.

O tratamento com bioterápico de soro de coelho não infectado na diluição 13cH também proporcionou decréscimo de parasitemia em camundongos infectados embora não tenha proporcionado maior sobrevivência dos animais tratados[8]. Embora a parasitemia esteja relacionada à patogênese na infecção murina por *T. cruzi*[2], os efeitos finais dependem de vários fatores, entre eles suscetibilidade da espécie e de como a infecção foi tratada [8].

No presente trabalho, como o resultado final foi favorável ao hospedeiro, com aumento de sobrevivência, entende-se que o aumento de parasitemia no 7º dpi foi resposta do organismo para apresentar mais precocemente e com maior nitidez o agente agressor, de forma a suscitar resposta combativa mais efetiva, como relata a literatura no caso de tratamento com medicamentos homeopáticos[3,24].

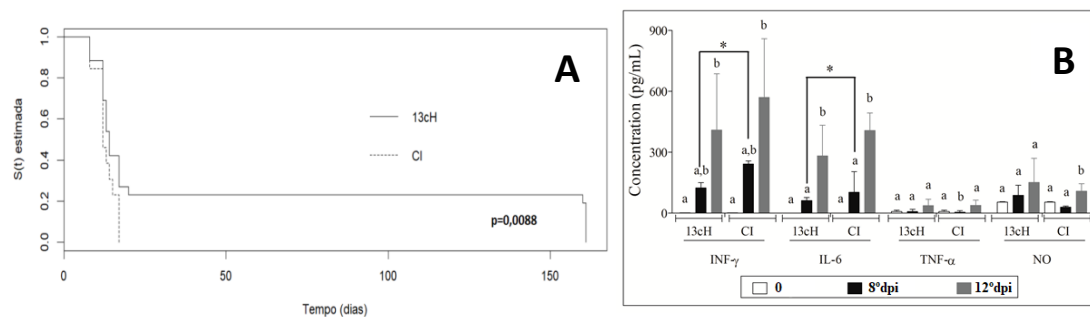
A informação que o bioterápico de soro de galinha passa ao organismo a ser tratado como observado nos resultados aqui apresentados, parece ser mais eficiente que a do bioterápico de soro de coelho conforme relatado por Ferraz e colaboradores[8]. Esta afirmação tem coerência uma vez que aves são refratárias à infecção por *T. cruzi* enquanto coelhos, apesar de não desenvolverem agravos patológicos/clínicos significativos, mantêm-se infectados[22]. Ainda, Ferraz e colaboradores[8] mostraram que o tratamento com bioterápico de soro de coelho não infectado apresentou melhores resultados quando comparado ao tratamento com bioterápico preparado a partir de soro de animal infectado.

Se por um lado esses dados podem mostrar que os eventos ocorridos em experimentos com medicamentos homeopáticos aconteceram em uma parte pequena dos animais – no caso do experimento em questão seis dos 26 animais avaliados no grupo 13cH sobreviveram 161 dias (*endpoint*) – por outro lado sugerem que é necessário buscar outros marcadores mais eficientes que consigam evidenciar o efeito secundário que culmina com a proteção que estes medicamentos estejam promovendo. Vale salientar que o modelo experimental deste estudo utilizou uma linhagem de camundongos altamente suscetível a infecção por *T. cruzi* e esperava-se um desfecho fatal em todos os casos[8].

Tabela 1. Avaliação da sobrevida, parasitemia do 7º dpi, 8º dpi e estimativa de sobrevivência dos camundongos infectados com *T. cruzi* - Cepa Y e tratados com bioterápico de soro de galinha na diluição 13cH.

Grupo	n	Média	±	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	P
Sobrevida (em dias)							
13cH	26	47,3	±	63,5	8	161	0,0069*
CI	13	13,0	±	3,0	8	17	
Parasitemia 7º dpi (parasitos/mL)							
13cH	26	155,9	±	166	6	510	0,0001*
CI	13	24,8	±	24	5	91,9	
Parasitemia 8º dpi (parasitos/mL)							
13cH	26	90,6	±	82,7	4	320	0,8816
CI	13	69,1	±	33,1	31	157	
Estimativa de sobrevivência** (em dias)							
13cH	26			60,1	13	161	0,0088***
CI	13			13,9	8	17	

*p significativo pelo teste t não pareado considerando nível de significância de 5%;
 Estimativa não paramétrica de *Kaplain-Meier*; *Teste de *Log Rank*; CI: Controle infecção, 13cH: Bioterápico de soro de galinha na diluição 13cH. Todos os animais de CNI (controle não infectado) sobreviveram por todo o período experimental.



A. Figura 1. Curva de sobrevida segundo os grupos experimentais pelo estimador de *Kaplan Meier* seguido do teste de Log Rank. CI: Controle infectado e não tratado, 13cH: Bioterápico de soro de galinha na diluição 13cH. Todos s animais de CNI (controle não infetado) sobreviveram por todo o período experimental.

B. Figura 2. Comparação da produção de citocinas e NO nos 0, 8^o dpi e 12^o dpi para os grupos 13cH e CI; 13cH: Grupo tratado com soro de galinha na diluição 13cH e CI: Controle infectado e não tratado. Estatística: *corresponde a uma diferença significativa entre os grupos no mesmo momento da infecção - Teste de t não pareado ($p < 0,05$). Letras diferentes correspondem a uma diferença significativa entre os tempos nos mesmos grupos - Teste ANOVA para medidas repetidas ($p < 0,05$).

3.2. Análise clínica

Ao comparar os grupos amostrais avaliados (Tabela 2), ficou evidenciado que a temperatura foi estatisticamente maior no grupo CI ($p = 0,0285$) quando comparado ao 13cH no período entre a infecção e o pico de parasitas, enquanto que o grupo 13cH permaneceu semelhante ao CNI. No período após o pico, o grupo CNI apresentou temperatura maior quando comparado aos demais grupos ($p = 0,0019$) e este comportamento está relacionado à hipotermia que acontece com o agravamento da infecção murina pelo *T. cruzi*[9].

Nesse mesmo período o consumo de água também foi estatisticamente maior no CNI, quando comparado aos demais grupos, confirmando o desequilíbrio homeostático que a infecção ocasiona. Ficou evidenciado que na maioria das avaliações o grupo tratado 13cH, tanto entre a infecção e pico quanto após o pico, apresentou comportamento mais próximo ao CNI, o que pode evidenciar um equilíbrio maior do organismo frente à infecção no animal tratado com medicamento ultradiluído que o observado no grupo CI. Sandri e colaboradores[9], também encontraram aumento de temperatura, de consumo de ração e de água em animais tratados com bioterápico 17dH de *T. cruzi* quando comparado ao controle não infectado.

Tabela 2. Comparação do temperatura, consumo de água, consumo de ração e peso e segundo os grupos experimentais avaliados entre a infecção e o pico e após o pico.

Período	13cH				CNI				CI				P
	n	Média	±	Desvio Padrão	n	Média	±	Desvio Padrão	n	Média	±	Desvio Padrão	
Temperatura (°C)													
Entre a infecção e o pico	12	34,5	±	0,4	5	34,6	±	0,5	12	35	±	0,5	0,0285* ^A
Após o pico	9	33,5	±	0,6	5	35,4	±	0,2	9	34,1	±	0,8	0,0019* ^B
Água (ml)													
Entre a infecção e o pico	12	17	±	0,6	5	17,5	±	0	12	18,7	±	3,7	0,0604
Após o pico	9	11,6	±	1,3	5	17,5	±	0	9	11,9	±	3,2	0,0019* ^B
Ração (g)													
Entre a infecção e o pico	12	16,1	±	1,9	5	14,6	±	0	12	17,6	±	1,5	0,0511
Após o pico	9	13,2	±	0,6	5	13,9	±	0	9	12,7	±	1,5	0,0505
Peso (g)													
Entre a infecção e o pico	12	45,1	±	4,5	5	45,1	±	2,9	12	42,7	±	4,2	0,4057
Após o pico	9	44	±	4,6	5	46,6	±	3,6	9	44	±	2,8	0,2936

* Teste *Kruskal-wallis* significativo considerando nível de significância de 5%. ^ACI difere de 13cH; ^BCNI difere dos demais.

CNI: Controle não infectado; **CI:** Controle infectado; **13cH:** Grupo tratado com bioterápico de soro de galinha na diluição 13cH

3.3. Análise imunológica

Tanto os níveis de IFN- γ quanto da IL-6 no 8º dpi apresentaram-se diminuídos em 13cH quando comparado ao CI (Figura 2). Estas citocinas participam de diversas respostas imunológicas desenvolvidas frente à infecção por *T. cruzi*. Se por um lado estão diretamente envolvidas com a eliminação do parasito, por outro são responsáveis por uma exacerbação da inflamação gerando danos teciduais, agravando o quadro clínico do hospedeiro[10]. Esses achados permitem compreender que embora o tratamento ative o sistema imunológico do animal, aumentando a parasitemia, as citocinas pro-inflamatórias apresentam reação diminuída com relação ao CI com o intuito de equilibrar a reação do organismo, com provável redução de inflamação e diminuição de danos teciduais, também demonstrados em outro trabalho[4], em que o tratamento com medicamento altamente diluído promoveu imunomodulação diferenciada quando comparado ao CI, conseqüentemente redução da inflamação e aumento da parasitemia no 7º dpi (Figura 2).

Ao longo da infecção, tanto no CI quanto no 13cH os níveis da citocina IFN- γ foram maiores no 12º dpi quando comparado ao 0 (dia da infecção). O nível da citocina IL-6 foi maior no 12º dpi quando comparado aos demais tempos tanto no 13cH quanto no CI. No

grupo CI o nível do TNF- α aumentou com a evolução do tempo de infecção, a dosagem do 8º dpi diferiu dos demais e a dosagem em 12º dpi também diferiu dos demais (Figura 2).

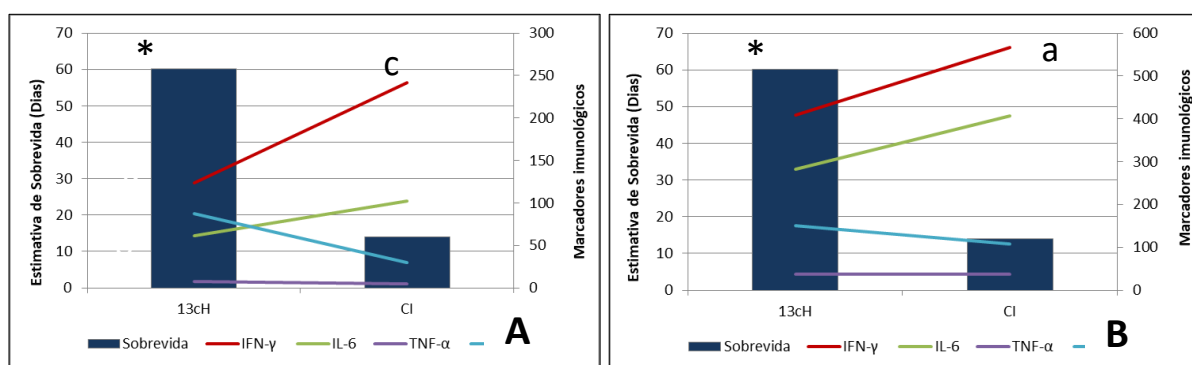
Embora no 13cH exista um aumento de TNF- α entre os tempos avaliados, o grupo tratado apresentou níveis que mostraram aumento inferior em relação ao CI. Embora o sistema imune tenha sido estimulado devido à infecção do animal por *T. cruzi*, o tratamento impede aumento exagerado dos níveis de TNF- α no momento de pico de parasitos no sangue, que é o instante que o animal está sendo mais desafiado. Assim, há estímulo na produção de NO sem, no entanto, haver aumento significativo evitando assim danos teciduais[25]. Esse equilíbrio não foi observado nos animais do grupo CI que apresentou aumento significativo e prejudicial de NO, causando provável dano tecidual e morte mais precoce (Figura 2).

O TNF- α atua significativamente na produção do NO [26] molécula com importante ação tripanocida quando em grande concentração. No IFN- γ e no TNF- α embora o padrão de produção das citocinas de 13cH tenha sido comparável ao CI, o medicamento 13cH causou relação de produção mais equilibrada quando comparado ao controle. Níveis mais expressivos foram observados no CI quando comparado ao 13cH no 8º dpi ($p < 0,05$) tanto na IFN- γ quanto na IL-6 (Figura 2).

O desequilíbrio causado pelo parasito observado em CI faz com que a infecção evolua para a morte do animal, quando em altos níveis no organismo, TNF- α , IFN- γ e NO podem ser extremamente prejudiciais ao próprio hospedeiro. A produção descontrolada de mediadores imunológicos, entre eles o TNF- α , que produz, entre outros a caquexia[27] e o NO que está relacionado ao dano tecidual [26]. Já no 13cH, assim como em outros trabalhos com outras substâncias ultradiluídas[4,10,24], observou-se um padrão de atuação diferenciado, levando o animal infectado ao alcance de equilíbrio, mesmo durante a infecção de uma linhagem de camundongos altamente suscetível por uma cepa de *T. cruzi* extremamente patogênica[4]. Importante citar que situações onde predomina o padrão de resposta Th1, as citocinas IFN- γ e TNF- α podem atuar na ativação de macrófago e na produção NO que podem culminar na eliminação do parasito. Situações onde predomina padrão de resposta Th2, as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 podem bloquear as citocinas do padrão Th1 visando a manutenção do parasito, no caso do *T. cruzi*, no tecido[26].

Ficou evidenciado comportamento correlacionado no grupo 13cH entre NO e IFN- γ no 8º dpi ($p < 0,05$), onde IFN- γ diminui enquanto NO aumenta bem como no 12º dpi quando

IFN- γ aumentou diretamente proporcional ao TNF- α (Figura 3). Como não houve este padrão de correlação no grupo CI, entende-se que a relação observada no grupo tratado é o efeito imunomodulatório resultante da interferência do tratamento com o bioterápico de soro de ave ultradiluído (Figura 3). Este efeito imunomodulatório foi também observado por outros autores[4,10,24]. Embora os dados de citocinas tenham apresentado distribuição normal, somente a correlação perfeita ($r=1,00$; $p<0,05$) foi significativa, pois esse teste sofre interferência do tamanho da amostra (no caso de 3 animais por grupo em cada tempo avaliado).



Ferraz e colaboradores 2016[8] observaram que o grupo tratado com soro ultradiluído de coelho não infectado apresentou diminuição das concentrações de IL-4, sem alterações no TNF- α e IFN- γ , associada à diminuição da IL-17 quando comparado ao controle. Ferraz e colaboradores 2016[8] evidenciaram ainda que o grupo tratado com soro ultradiluído de coelho infectado, teve aumento na concentração de IL-4, sem alterações no TNF- α e IFN- γ , associado à diminuição da IL-17 em relação ao grupo controle. Os dados do presente estudo estão de acordo com esses achados e confirmam modulação de citocinas de maneira diferenciada em animais infectados com *T. cruzi* e tratados com medicamento ultradiluído.

Esses achados reforçam o resultado de que a modulação diferenciada nos dois grupos parece interferir na inflamação, como observado em trabalhos do nosso grupo de pesquisa publicados anteriormente[3,4,24]. Além disso esse resultado pode ainda estar ligado à sobrevida aumentada no grupo 13cH. Em resumo, pode-se observar que existe uma dinâmica diferenciada na secreção dos mediadores envolvidos na resistência murina ao *T. cruzi*, chamando atenção para os marcadores (balanço das citocinas, sobrevida aumentada) avaliados nesse trabalho. Essa dinâmica diferenciada pode ser observada tanto na correlação entre os dias pós-infecção quanto na comparação dentro dos grupos nos diferentes períodos avaliados

CONCLUSÃO

O tratamento da infecção murina por *T. cruzi* com bioterápico de soro de animal refratário a esta infecção provocou modulação diferenciada do sistema imunológico, com aumento da parasitemia no 7º dpi e redução das citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e IL-6) em relação ao CI com o intuito de equilibrar a reação do organismo, com provável redução de inflamação e evitando dano tecidual promovendo aumento de sobrevida e tempo de vida estimado dos animais quando comparado ao grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ministério da saúde - Doença de Chagas, (2017). portalms.saude.gov.br.
- [2] T.C. Araújo-Jorge, S.L. de Castro, Doença de chagas: manual para experimentação animal [online], Rio de Janeiro, 2000. <http://books.scielo.org>.
- [3] D.L. Aleixo, S.M. de Araújo, Utilização de medicamento homeopático em infecções parasitárias: Modelo *Trypanosoma cruzi*, 2012.
- [4] É.C. Ferreira, L. Ciupa, A.R. Portocarrero, C.F. Brustolin, P.F. Massini, D.L. Aleixo, S.M. de Araújo, Phosphorus protects cardiac tissue by modifying the immune response in rats infected by *Trypanosoma cruzi*, *Cytokine*. 102 (2018) 102–106. doi:10.1016/j.cyto.2017.07.017.
- [5] Paula Fernanda Massini; Silvana Marques de Araújo, *Rattus norvegicus* infectados com *Trypanosoma cruzi*: Efeitos clínicos do tratamento com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* ultradiluídos, 2013.
- [6] D.L. Aleixo, F.K. da Veiga, L. Ciupa, A.R. Portocarrero, P.F. Sandri, F.N. Ferraz, C.F. Braga, M.J. Benvenuti, S.M. de Araújo, Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. High Dilution Res.*

12 (2013) 93–94. doi:10.1186/1756-0500-5-352.

[7] F.N. Ferraz, G.K. Simoni, A. do Nascimento, C.S. de Melo, D.L. Aleixo, M.L. Gomes, M. Spack, S.M. de Araújo, Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects, Homeopathy. 100 (2011) 237–243. doi:10.1016/j.homp.2011.05.006.

[8] F.N. Ferraz, F.K. da Veiga, D.L. Aleixo, L. Ciupa, B.A. de A. Filho, S.S. da Silva, I. Conchon-costa, W.R. Pavanelli, S.M. de Araújo, Biotherapies of rabbit serum modulate the immune response and decrease parasite load in mice infected with *Trypanosoma cruzi*, J. Appl. Biomed. 14 (2016) 187–197. doi:10.1016/j.jab.2015.11.003.

[9] P.F. Sandri, A.R. Portocarrero, L. Ciupa, F.N. Ferraz, G.J. Falkowski-Temporini, W.N.S. Rodrigues, É.C. Ferreira, D.L. Aleixo, S.M. de Araújo, Dynamized ethyl alcohol improves immune response and behavior in murine infection with *Trypanosoma cruzi*, Cytokine. 99 (2017) 240–248. doi:10.1016/j.cyto.2017.07.016.

[10] G.J. Falkowski-Temporini, C.R. Lopes, P.F. Massini, C.F. Brustolin, P.F. Sandri, É.C. Ferreira, D.L. Aleixo, N.R. Pala, S.M. de Araújo, Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*, Cytokine. 88 (2016) 57–61. doi:10.1016/j.cyto.2016.08.015.

[11] C. de P. Coelho, P.D. Motta, M. Petrillo, R. de O. Lovine, L.C. Dalboni, F.R. Santana, M.S.F. Correia, R.C.V. Casarin, V.M. Carvalho, L.V. Bonamin, Homeopathic medicine *Cantharis* modulates uropathogenic *E. coli* (UPEC)-induced cystitis in susceptible mice, Cytokine. 92 (2017) 103–109.

[12] C. Holandino, J.V. da C. Batista, M.N. de O. Melo, F. Homsani, A.P. Oliveira, L.M. Rocha, V.F. da Veiga, D.S. Alviano, C.S. Alviano, M. Grazi, H. Ramm, M. Kunz, K. Urech, U. Weissenstein, S. Baumgartner, Biological activity and phytochemical analysis of homeopathic preparations of *Viscum album L.*, Int. J. High Dilution Res. Suíça GIRI. 17 (2017) 25–26.

[13] F. Nery-Guimarães, V. Ismélia, N. Grynberg, Refratariedade das galinhas ao “*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*” III - Dissociação dos fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1/2 (1974) 131–136.

[14] A.R.L. Teixeira, R.J. Nascimento, N.R. Sturm, Evolution and pathology in Chagas disease - A Review, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101 (2006) 463–491. doi:10.1590/S0074-02762006000500001.

[15] L.G. Warren, T. Borsos, Studies on Immune Factors Occurring in Sera of Chickens Against the Crithidia Stage of *Trypanosoma Cruzi*, J. Immunol. 82 (1959) 585–590.

[16] E.C. Ferreira, C.F. Braga, P.F. Massini, R.N. Drozino, N.M. Moreira, D.L. Aleixo, A.L.F. Guilherme, S.M. de Araújo, Homeopathy: Statistical significance versus the sample size in experiments with *Toxoplasma gondii*, Int. J. High Dilution Res. 10 (2011) 115–118.

[17] P.C. Taborda, T. Carlos, Biotério de Experimentação Animal Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biomédicas – USP Manual de Normas Técnicas, 2004.

- [18] L.H.P. Silva, V. Nussenzweig, Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco, *Folia Clínica Biol.* 20 (1953) 191–201.
- [19] Farmacopeia Homeopática Brasileira 3ª edição, 2011.
- [20] Z. Brener, Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 4 (1962) 389–396.
- [21] C. Panis, T.L. Mazzuco, C.Z.F. Costa, V.J. Victorino, V.L.H. Tatakihara, L.M. Yamauchi, S.F. Yamada-Ogatta, R. Cecchini, L.V. Rizzo, P. Pinge-Filho, *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice, *Exp. Parasitol.* 127 (2011) 58–65. doi:10.1016/j.exppara.2010.06.030.
- [22] F.N. Ferraz, V.A. Gonçalves, D.L. Aleixo, A.S. Mizutani, S.M. de Araújo, Effect of biotherapy T. cruzi 7x in several therapeutic schemes on experimental infection by *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. High Dilution Res.* 10 (2011) 125–127.
- [23] L.R. de Almeida, M.C. de O.H. Campos, H.M. Herrera, L.V. Bonamin, A.H. da Fonseca, Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*, *Homeopathy.* 97 (2008) 65–69. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2008.02.009.
- [24] F.N. Ferraz, F.K. da Veiga, D.L. Aleixo, M. Spack Júnior, S.M. de Araújo, Different treatment schemes and dynamizations of *Trypanosoma cruzi* biotherapies: what information do they transfer to the organism in infected mice?, *Homeopathy.* 105 (2016) 327–337. doi:10.1016/j.homp.2016.02.002.
- [25] J.A. Pérez-Molina, I. Molina, Chagas disease, *Lancet.* 391 (2018) 82–94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- [26] W.R. Pavanelli, Citocinas e óxido nítrico na Doença de Chagas, *Biosaúde, Londrina, Dez.* 2008. 10 (2008) 147–155.
- [27] S.D. Anker, A.J.S. Coats, A Syndrome With Impaired Survival and Immune and Neuroendocrine Activation, *Chest.* 115 (1999) 836–847. doi:10.1378/chest.115.3.836.

Funding information

This study was financed by Fundação Araucária, CAPES and CNPq.

Ethical approval

The study was approved by the Standing Committee on Ethics in Research Involving Animals, according to CEUA 2401220716/2016.

Conflict of interests: The authors stated that they had no conflicts of interest.

Authors' contributions

Érika Cristina Ferreira: Data acquisition, critical review of important intellectual content; analysis and interpretation of data; final approval of the version to be presented.

Larissa Ciupa: Data acquisition, critical review of important intellectual content; analysis and interpretation of data; final approval of the version to be presented.

Larissa Aparecida Ricardini: Data acquisition.

Fernanda Tomiotto: Data acquisition.

Ivete Conchon Costa: Data acquisition.

Denise Lessa Aleixo: Co-authored the conception and design of the study.

Silvana Marques de Araújo: Conception and design of the study; critical review of the intellectual content; final approval of the version to be presented.

Suggestion of Referees to evaluate the work

Gislaine Janaina Falkowski-Temporini Doctor in Health Sciences, UEM, Universidade Estadual de Maringá. UEM, Av Colombo 9727, Bloco I-90, Sala 11, KM 130, 87070-000, Brazil. E-mail: gisajanaina@hotmail.com.

Fabiana Nabarro Ferraz - Doctor in Health Sciences, UEM, Universidade Estadual de Maringá. UEM, Av Colombo 9727, Bloco I-90, Sala 11, KM 130, 87070-000, Brazil, E-mail: fabiana_nabarro@hotmail.com.

Leoni Villano Bonamin - Paulista University, Graduation Program in Environmental and Experimental Pathology, Rua Dr. Bacelar, 1212 – 4th Floor, CEP: 04026-002, São Paulo, Brazil. E-mail address: leonibonamin@unip.br.

Carla Holandino - Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Multidisciplinary Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Department of Drugs and Medicines, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho 373, Bloco B-ss, salas 11 e 34, CEP: 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail address: cholandino@gmail.com.

Cideli de Paula Coelho - Médica Veterinária, docente permanente 40h da Universidade de Santo Amaro (Unisa). Pós-doutorado na Universidade Paulista (Unip). Tem experiência na área de Medicina Veterinária clínica, com ênfase em Homeopatia (pequenos animais, silvestres e animais de produção), produção animal, epidemiologia, imunologia e comportamento animal e Bem Estar. E-mail: ccideli@uol.com.br.

Marta de Lana – Department of clinical analysis, Universidade Federal de Ouro Preto. Nucleus of Research in Biological Sciences (NUPEB), Morro do Cruzeiro University Campus, Federal University of Ouro Preto, R.Nove, 27. CEP: 35400-000. Ouro Preto - MG, Brazil. E-mail address: delana@nupeb.ufop.br.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o tratamento com *Phosphorus* 13cH promove efeitos benéficos na infecção pelo *T. cruzi* em ratos *Wistar*, modulando a secreção de IFN- γ e TNF- α com redução da inflamação no tecido cardíaco. Já o tratamento da infecção murina por *T. cruzi* com bioterápico de soro de animal (*Gallus gallus domesticus*) refratário a esta infecção apresentou modulação diferenciada do sistema imunológico com alteração do curso da infecção e secreção de TNF- α , INF- γ , IL-6 e NO, promovendo aumento de sobrevida e tempo de vida estimado.

Esses resultados evidenciam os efeitos benéficos proporcionados pelos medicamentos altamente diluídos para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*, reforçando a importância do uso da homeopatia para estabelecer novas abordagens terapêuticas no manejo de pacientes com doença de Chagas aguda.

PERSPECTIVAS

Como novas pesquisas espera-se realizar avaliações comportamentais, dosagem de outras citocinas e mediadores inflamatórios em animais experimentalmente infectados com *T. cruzi* submetidos ao tratamento com o medicamento *Phosphorus*.

Já com o bioterápico produzido a partir de soro de galinha 13cH, espera-se que com novas pesquisas possa ser realizado a dosagem de outras citocinas e histologia dos órgãos mais afetados pela doença de Chagas nos animais que foram submetidos ao tratamento com bioterápico. Além disso seria interessante testar o tratamento com bioterápico em outra espécie mais resistente, como o rato, nas mesmas condições avaliadas nos camundongos, para comparação dos efeitos proporcionando melhor compreensão dos resultados observados.