

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Efeitos de Medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em
Camundongos Experimentalmente Infectados por
Trypanosoma evansi (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 e
Trypanosoma cruzi CHAGAS, 1909**

Luciana Rodrigues de Almeida

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Efeitos de Medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em Camundongos
Experimentalmente Infectados por *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885)
BALBIANI, 1988 e *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909**

LUCIANA RODRIGUES DE ALMEIDA

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

e Co-orientação dos Professores
**Heitor Miraglia Herrera
e Leoni Villano Bonamin**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Parasitologia Animal.


Seropédica, RJ
Fevereiro 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**


LUCIANA RODRIGUES DE ALMEIDA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração Parasitologia Animal.

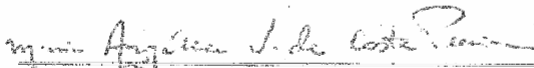
TESE APROVADA EM 26/02/07


Adivaldô Henrique da Fonseca (Ph.D) UFRuralRJ
(Orientador)


Argemiro Sabavina (Ph.D) UFRuralRJ


Heitor Miraglia Fonseca (Ph.D) Fiocruz / IOC


Marcelo Sabatini Gonzalez (Ph.D) UFF


Maria Angélica Vieira da Costa Pereira (Ph.D) UENF

“Não quero para mim a terrível limitação de viver apenas o que é passível de fazer sentido. Eu não. Quero uma verdade inventada”. **(Clarice Lispector)**.

Dedico esse trabalho aos animais
destinados à pesquisa científica. . .
vítimas de sofrimento físico e psicológico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A meus pais, Dejair e Denise, pelo amor e apoio incondicional de sempre.

Ao Prof. Adivaldo Henrique da Fonseca, pela oportunidade, assim como pelo exemplo de convivência e ética que sempre proporcionou aos seus orientados.

Ao Dr. Heitor Miraglia Herrera, pela co-orientação deste trabalho, assim como pela oportunidade e confiança.

À Dra. Leoni Villano Bonamin, pela co-orientação deste trabalho e por toda sua contribuição ao conhecimento científico da Homeopatia.

À Dra. Ana Maria Jansen, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo exemplo de compromisso com o espírito científico.

Ao Professor Rogério Tortelli, Universidade Federal Fluminense (UFF), pelo apoio incondicional e ensinamentos na execução das avaliações histopatológicas, assim como pelas palavras sempre positivas e motivadoras.

Aos amigos da Anatomia Patológica da UFF, Lorenzo, Isabelle e Marcelle, sempre dispostos a colaborarem de alguma forma.

Ao Médico Veterinário Rodrigo Caldas Menezes, CECAL / Fiocruz, pelo apoio e orientação nas avaliações anatomopatológicas e histopatológicas.

Ao Prof. Luiz Figueira Pinto, quem me proporcionou o conhecimento da Terapêutica Homeopática, introduzindo o ensino da Homeopatia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), onde emprega brilhantemente esta terapêutica.

Às queridas amigas do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRuralRJ, Raquel Lisbôa, Nathalie Cunha, Renata Madureira e Jânia Rezende pelo apoio e amizade de sempre.

Ao representante dos alunos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fábio Silva Souza, pela paciência e pelas informações sempre 'precisas'.

Aos funcionários do laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos, IOC/Fiocruz, Valquírea Menezes, Marco Antônio, Carlos Alberto, Marilene e Amarildo, pela atenção e apoio na rotina das atividades experimentais.

À Mônica Caroline de Oliveira Campos, pelo auxílio fundamental nas atividades experimentais, pela presença amiga, assim como por compartilhar momentos tão inusitados, os quais permeiam o meio científico.

Aos amigos do laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos, IOC/Fiocruz, Daniella Barcelos, Daniela Rozas, Mariane Amâncio e Rafael Monteiro pela ajuda e amizade em todos os momentos.

Ao Professor Pedro Cabello, IOC/Fiocruz, pelo auxílio com as análises estatísticas.

À Comissão de Apoio ao Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Luciana Rodrigues de Almeida, filha de Dejair Lopes de Almeida e Denise Iunes Rodrigues de Almeida, nasceu em Bom Jardim - RJ, no dia 08/11/1976. Em 1990, ingressou no Colégio Técnico da UFRRJ, obtendo o título de Técnico em Agropecuária em 1993. Gradou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, em outubro de 1999. No período compreendido entre março de 1996 e fevereiro de 1998, foi bolsista de Iniciação Científica pelo programa PIBIC-CNPq, junto à UFRRJ. Em agosto de 2001, ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva, sob a orientação do professor Adivaldo Henrique da Fonseca, durante o qual, teve a oportunidade de estar na “Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse”-França, onde obteve diploma de especialização em “Pathologie Animale en Régions Chaudes”. Em dezembro de 2002, obteve o título de especialista em Homeopatia Veterinária pelo Instituto Hanhemanniano do Brasil, onde, posteriormente, em 2005, foi aceita como Membro Titular.

RESUMO

ALMEIDA, Luciana Rodrigues de. **Efeitos de Medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em Camundongos Experimentalmente Infectados por *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 e *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909.** 2007. 67p Tese (Doutor em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Com o objetivo de estudar efeitos terapêuticos e profiláticos de medicamentos homeopáticos foram empregados modelos de infecção aguda e crônica: infecção experimental de camundongos por *Trypanosoma evansi* e por *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, assim como foi, também, empregado modelo de imunização de camundongos com extrato de *T. evansi*, objetivando avaliar efeitos imunomodulatórios de bioterápico homeopático. Foram empregados os medicamentos homeopáticos: bioterápico de *Trypanosoma evansi* no modelo de infecção por *T. evansi* e imunização; bioterápico de *Trypanosoma cruzi* e *Phosphorus* na infecção por *T. cruzi*. Para tal, camundongos machos adultos da linhagem C57BL/6 foram divididos em grupos experimentais: tratado com bioterápico antes da infecção experimental e imunização (Bai); tratado com bioterápico após infecção e imunização (Bpi); tratado com *Phosphorus* após infecção por *T. cruzi* (*Phosphorus*); tratado com soro fisiológico antes e após infecção e imunização (Controle) e grupo controle não infectado (s/ infec.). Os bioterápicos foram preparados a partir do sangue de camundongos experimentalmente infectados por *T. evansi* e por *T. cruzi*. O medicamento *Phosphorus* foi proposto através da correlação entre as imagens clínicas e repertorial da infecção por *T. cruzi*, considerando-se as características diatélicas da Doença de Chagas. Ambos foram empregados na 12ª dinamização decimal Hering (12DH). Após infecção experimental, os animais foram monitorados a cada dois dias para determinação da parasitemia e de parâmetros relacionados à infectividade e à virulência da parasita. Foram também realizadas avaliações hematológicas e sorologia para pesquisa de anticorpos IgM e IgG após-infecção e imunização. De acordo com os resultados obtidos, não foram observados efeitos profiláticos e/ou terapêuticos decorrentes da administração de bioterápico homeopático em camundongos infectados por *T. evansi*, o que pode ser atribuído à elevada virulência e curso hiper agudo característico deste modelo experimental. Os resultados decorrentes do tratamento com bioterápico antes e após imunização de camundongos com extrato de *T. evansi* sugerem efeito imunomodulador, sendo observada resposta linfocítica mais precoce e intensa em Bai ($p < 0,05$), assim como maiores títulos de IgG em Bpi ($p < 0,05$) em relação ao controle. Em camundongos infectados por *T. cruzi*, observou-se em Bai menor período de patência ($p < 0,05$), menor percentual de mortalidade e menores valores parasitêmicos nos dias 09, 13, 15 ($p < 0,05$), 17 ($p < 0,05$), 22, 24 e 28 dias pós-infecção, em relação ao Controle, além de aumento significativo no número de linfócitos ($p < 0,05$) e neutrófilos ($p < 0,05$) ao longo do curso da infecção. O grupo *Phosphorus* apresentou maior período de patência e maior valor de parasitemia máxima ($p < 0,05$), quando comparados ao Bai e ao Controle, entretanto, registrou-se 0% de mortalidade neste grupo durante o período avaliado. O estudo histopatológico revela que o grupo Bai apresentou, em geral, lesões inflamatórias teciduais menos intensas, sendo as lesões mais intensas observadas em *Phosphorus* e Controle, o qual apresentou características de cronificação do processo inflamatório. Os resultados obtidos indicam efeitos imunomoduladores associados à administração de bioterápicos, assim como efeitos do medicamento *Phosphorus* sobre a patogenicidade da infecção por *T. cruzi*, devendo, assim, ser melhor investigados.

Palavras-chave: *Trypanosoma* sp, bioterápico, *Phosphorus*.

ABSTRACT

ALMEIDA, Luciana Rodrigues de. **Effects of homeopathic medicines and biotherapics on *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 and *Trypanosoma cruzi* experimentally infected mice CHAGAS, 1909.** 2007. 67p Thesis (Doctor of Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

With the aim to study the therapeutic and prophylactic effects of homeopathic medicines were employed acute and chronic infection models: experimental infection of mice by *Trypanosoma evansi* and by *Trypanosoma cruzi*, respectively, as a mice immunization model with *T. evansi* extract aiming evaluate the homeopathic biotherapeutic immunomodulatory effects. It were employed the homeopathic medicines: *T. evansi* biotherapeutic on *T. evansi* infection model and immunization, *T. cruzi* biotherapeutic and *Phosphorus* on *T. cruzi* infection model. Adult male C57BL/6 inbred mice had been divided in experimental groups: Treated with biotherapeutic before experimental infection and immunization (Bbi); treated with biotherapeutic post-infection and immunization (Bpi); treated with *Phosphorus* post *T. cruzi* infection (*Phosphorus*); treated with physiologic serum before and post-infection and immunization (Control) and control group not infected. The biotherapics were made from blood of *T. evansi* and *T. cruzi* experimentally infected mice. *Phosphorus* was proposed by correlation between clinical and repertorial images of *T. cruzi* infection, considering the diathesis of Chaga's Disease. Both were used at 12 DH (Hering's decimal) potency. After infection, mice were monitored at two days intervals, to determine the parasitaemia and infectivity and virulence parasite's parameters. Hematological evaluations were also realized as a serology to IgM and IgG search. In according with the obtained results, it were not observed therapeutic or prophylactic effects due to biotherapeutic on *T. evansi* infected mice, that may be attributed to the high virulence and hyper acute course of infection characteristic of this experimental model. The results obtained when mice were treated with biotherapeutic before and after immunization with *T. evansi* extract suggests immunomodulatory effect, since it were observed highest lymphocytic response at Bbi ($p < 0,05$), as highest IgG titers at Bpi ($p < 0,05$), when comparated to the control group. On *T. cruzi* infected mice a significant lower patence period was observed in Bai group ($p < 0,05$), as well a lower rate of mortality, lowest parasitaemias values at 9, 13, 15 ($p < 0,05$), 17 ($p < 0,05$), 22, 24 and 28 days post infection, and a significant growing of lymphocytes ($p < 0,05$) and neutrophils ($p < 0,05$) along the course of infection, regarding Control group. *Phosphorus* showed longest patent period, higher maximum of parasitaemia value ($p < 0,05$), in relation to Bai and Control group, nevertheless, with 0% of mortality. The histopathological study showed at Bbi less intense inflammatory lesions, being the more intense lesions observed at *Phosphorus* and Control group, which showed cronication characteristics of inflammatory process. The results indicate immunomodulatory effects of biotherapics, as an effect of *Phosphorus* on the patogenicity of infection, and should be better investigated.

Key words : *Trypanosoma* sp., biotherapeutic, *Phosphorus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

C'	Sistema Complemento
CH	Diluição Centesimal Hahnemanniana
DEAE-celulose	Dietil Amino Etil-celulose
DH	Diluição Decimal de Hering
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
IL-10	Interleucina 10
INF- γ	Interferon gama
KLH	<i>Hemocyanin</i> . Macro-molécula extraída da hemolinfa de molusco
LTh1	Linfócito T auxiliar 1 (T 'helper' 1)
LTh2	Linfócito T auxiliar 2 (T 'helper' 2)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade ("Major histocompatibility complex")
NK	Células exterminadoras naturais ("Natural killer cells")
NO	Óxido nítrico ("Nitric oxide")
PBS	Salina Fosfatada Tamponada ("Phosphate Buffer Saline")
PSG	Fosfato de sódio monobásico e dibásico + glicose ("Phosphate Solution + glucose")
TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta ("Transforming growth factor β ")
TNF- α	Fator de necrose tumoral ("Tumor necrosis factor")
UHD	Ultradiluição ("Ultra high dilution")
VAT	Tipo de variação antigênica ("Variation antigenic type").
VG	Volume globular
VSG	Glicoproteína variante de superfície ("Variante surface glycoprotein")

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1	Biotério convencional de experimentação, Pavilhão Carlos Chagas, IOC, Fiocruz, RJ. Estante com ventilação e temperatura controlada destinada à alocação de camundongos. Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 alocados em gaiolas de polietileno convencionais	14
Figura 2	Administração oral de medicamento na forma líquida a camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i>	16
Figura 3	Curso da infecção experimental por <i>T. evansi</i> em camundongos C57BL/6 tratados com bioterápico antes e após infecção experimental (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle). Log das médias de parasitemias observadas nos grupos.....	22
Figura 4	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores parasitêmicos entre os grupos de tratamento após infecção experimental por <i>T. evansi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção experimental (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle). * Significância estatística. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	22
Figura 5	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos das contagens global e diferencial de leucócitos em camundongos tratados com bioterápico antes da infecção (Bai), após infecção (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle) antes e após infecção experimental por <i>T. evansi</i> . <i>Kruskal-Wallis Test</i> . 'continua'	24-25
Figura 6	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos títulos de anticorpos IgM e IgG aos 10 dias pós-infecção experimental por <i>T. evansi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes da infecção (Bai), após infecção (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após infecção (Controle). <i>Kruskal Wallis Test</i>	26
Figura 7	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) valores globais de leucócitos em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> (Controle). * Significância estatística. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	28
Figura 8	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores globais de linfócitos em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle) antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> . * Significância estatística. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	29

Figura 9	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de neutrófilos em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle) antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> . * Significância estatística. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	29
Figura 10	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) valores absolutos de eosinófilos em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> (Controle). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	30
Figura 11	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de monócitos em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> (Controle). *Significância estatística. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	30
Figura 12	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos títulos sorológicos de IgG em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> (Controle). * Significância estatística. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	31
Figura 13	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos títulos sorológicos de IgM em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> (Controle) <i>Kruskal-Wallis Test</i>	32
Figura 14	Curso da infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção e, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle). Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores de parasitemia. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	36
Figura 15	Varição dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores parasitêmicos após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção e, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle). Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores de parasitemia. *Significância estatística. <i>Kruskal-Wallis Test</i>	37
Figura 16	Postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores máximos de parasitemia após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	38

Figura 17	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) do número de leucócitos entre os grupos de tratamento após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infetado (s/ infec.). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	44
Figura 18	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de linfócitos entre dias após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infetado (s/ infec.). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	44
Figura 19	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de linfócitos entre os grupos de tratamento após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infetado (s/ infec.). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	45
Figura 20	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de neutrófilos entre dias após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infetado (s/ infec.). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	45
Figura 21	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de neutrófilos entre os grupos de tratamento após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infetado (s/ infec.). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	46
Figura 22	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de monócitos entre dias após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infetado (s/ infec.). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	46
Figura 23	Variação dos postos médios (<i>Mean Rank</i>) dos valores absolutos de monócitos entre os grupos de tratamento após infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infetado (s/ infec.). <i>Kruskal-Wallis Test</i>	47

- Figura 24** Aspectos microscópicos de **músculo cardíaco** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. Fase aguda da infecção, 14 dias p.i.. (a) Grupo Bai. Miocardite moderada, infiltrado inflamatório mononuclear (objetiva 40x. H.E.). (b) Grupo Bpi. Miocardite moderada, infiltrado inflamatório mononuclear (objetiva 40x. H.E.). (c) Grupo Phosphorus. Miocardite intensa, infiltrado inflamatório mononuclear, presença pseudocisto de *T. cruzi*. (objetiva 40x. HE). (d) Grupo Controle. Miocardite intensa, infiltrado inflamatório mononuclear (objetiva 10x. H.E.). ‘continua’ 51
- Figura 25** Aspectos microscópicos de **músculo esquelético** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. Fase crônica da infecção, 42 dias p.i. (a) Grupo Bai. Miosite moderada, infiltrado inflamatório mononuclear (objetiva 40x. HE). (b) Grupo *Phosphorus*. Miosite discreta, infiltrado inflamatório mononuclear (objetiva 40x. HE). (c) Grupo Controle. Miosite intensa, infiltrado inflamatório mononuclear; (c’) destruição da parede vascular (objetiva 40x. HE). 52
- Figura 26** Aspectos microscópicos de **fígado** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. Fase crônica da infecção, 42 dias p.i. (a) Grupo Bai. Infiltrado inflamatório mononuclear intenso (objetiva 40x. HE). (b) Grupo Bbi. Infiltrado inflamatório mononuclear intenso (objetiva 40x. HE). (c) Grupo *Phosphorus*. Infiltrado inflamatório mononuclear moderado (objetiva 40x. HE). (d) Grupo Controle. Infiltrado inflamatório mononuclear intenso (objetiva 40x. HE)..... 53
- Figura 27** Aspectos microscópicos de **intestino grosso** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. Fase crônica da infecção, 42 dias p.i. (a) Grupo Bai. Infiltrado inflamatório mononuclear moderado (objetiva 40x. HE). (b) Grupo Bbi. Infiltrado inflamatório mononuclear intenso (objetiva 40x. HE). (c, c’) Grupo *Phosphorus*. Infiltrado inflamatório mononuclear intenso (objetiva 10x e 40x, respectivamente. HE). (d) Grupo Controle. Infiltrado inflamatório mononuclear intenso (objetiva 40x. HE). 54

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 Médias dos períodos pré-patentes de camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção experimental por <i>T. evansi</i> (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle).....	21
Tabela 2 Médias de parâmetros hematológicos, aos 10 dias p.i., em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção experimental por <i>T. evansi</i> (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle).....	23
Tabela 3 Títulos de anticorpos IgG e IgM, aos 10 dias p.i., em soros de camundongos tratados com bioterápico antes da infecção (Bai), após infecção (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após infecção (Controle).....	27
Tabela 4 Títulos de anticorpos IgG em soros de camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle) antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> . * Significância estatística.....	32
Tabela 5 Títulos de anticorpos IgM em soros de camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de <i>T. evansi</i> (Controle).....	33
Tabela 6 Resultado da repertorização matemática das rubricas representativas da imagem clínica da infecção por <i>T. cruzi</i> no homem e em modelo murino experimental. Medicamentos ordenados por cobertura de sintomas e pontuação final.....	34
Tabela 7 Valores médios dos períodos de pré-patência e patência, taxa de mortalidade aos 42 dias pós-infecção de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> , tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle)...	35
Tabela 8 Percentual (%) de reagentes IgG e IgM (IFI) em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle).....	40

Tabela 9	Percentuais de títulos sorológicos (%) de anticorpos IgM em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle)...	41
Tabela 10	Percentuais (%) de títulos sorológicos de anticorpos IgG em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com <i>Phosphorus</i> após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle)...	41
Tabela 11	Percentual de lesões inflamatórias no músculo cardíaco em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com homeopatia, placebo e, controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.....	55
Tabela 12	Percentual de lesões inflamatórias em músculo esquelético em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com homeopatia, placebo e, controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.....	55
Tabela 13	Percentual de lesões inflamatórias em intestino grosso em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com homeopatia, placebo e, controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.....	56
Tabela 14	Percentual de lesões inflamatórias em intestino delgado em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com homeopatia, placebo e, controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.....	56
Tabela 15	Percentual de lesões inflamatórias em fígado em camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> e tratados com homeopatia, placebo e, controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.....	57

LISTA DE QUADROS

	Páginas
Quadro 1 Rubricas Repertoriais dos sintomas da infecção por <i>T. cruzi</i> citados na literatura. Imagem clínica da infecção por <i>T. cruzi</i> no homem e no modelo murino.....	35

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Divisão do gênero <i>Trypanosoma</i>	3
2. Características da infecção por <i>Trypanosoma evansi</i>	3
2.3 Características da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.3.1 Doença de Chagas	5
2.3.2 Resposta imune à infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.3.3 Patogênese na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.3.4 Tratamento	7
2.3.5 Abordagem imunológica	8
2.3.6 Critérios de cura	8
2.4 Homeopatia	9
2.4.1 Medicamentos homeopáticos	9
2.4.2 Mecanismo de ação das ultradiluições	9
2.4.3 Efeitos biológicos das ultradiluições	10
2.4.4 Bioterápicos	11
2.4.5 Diátese	13
2.4.6 Repertorização	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Experimento 1: Infecção Experimental de Camundongos por <i>T. evansi</i>	15
3.2 Experimento 2: Imunização de Camundongos com Extrato de <i>T. evansi</i>	17
3.3 Experimento 3: Infecção Experimental de Camundongos por <i>T. cruzi</i>	18
3.4 Análise Estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Infecção Experimental de Camundongos por <i>T. evansi</i>	21
4.1.1 Parasitemia e curso da infecção	21
4.1.2 Parâmetros Hematológicos	23
4.1.3 Resposta Imune Humoral	25

4.2 Imunização de Camundongos com extrato de <i>T. evansi</i>	27
4.2.1 Resposta leucocitária	27
4.2.2 Resposta imune humoral	31
4.3. Infecção Experimental de Camundongos por <i>T. cruzi</i>	34
4.3.1 Estudo das imagens clínica e repertorial homeopáticas	34
4.3.2 Parasitemia e curso da infecção	35
4.3.3 Resposta imune humoral	39
4.3.4 Resposta leucocitária	42
4.3.5 Avaliações histopatológicas	48
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Muitas espécies do gênero *Trypanosoma* são responsáveis por doenças parasitárias de grande importância médica e veterinária na África, Ásia, América Central e América do Sul.

O *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885) é um protozoário flagelado encontrado no sangue e fluidos tissulares de diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres.

No Brasil, a doença determinada pela infecção por *T. evansi* já foi diagnosticada nos Estados do Pará, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul e é conhecida vulgarmente por “mal das cadeiras”, afetando especialmente equinos (SEQUEIRA e AMARANTE, 2001). Os animais não tratados geralmente morrem em consequência do parasitismo (SEQUEIRA e AMARANTE, 2001). Desde 1930, a droga empregada contra a doença tem sido o Berenil® [4,4'-(diazamine)-aceturato de dibenzamidine], entretanto o desenvolvimento de resistência à referida droga tem sido relatado (CARDOSO *et al.*, 1999).

Além de mamíferos domésticos, várias espécies de animais de laboratório, como coelhos, cobaias, ratos e camundongos, são sensíveis à infecção pelo *T. evansi*, tendo sido estes empregados como modelo experimental (OLIVEIRA e MENEGUIN, 1989).

O *Trypanosoma cruzi* CHAGAS 1909, agente etiológico da Doença de Chagas, é um protozoário flagelado encontrado no sangue e tecidos de homens, animais domésticos e silvestres e no tubo digestivo do inseto vetor. Embora avanços tenham sido alcançados no controle da transmissão vetorial intradomiciliar, não existe quimioterapia segura disponível ao tratamento da doença, a qual constitui, ainda, importante problema de saúde pública. Os tradicionais antiparasitários, Nifurtimox e Benzonidazol são eficazes apenas na fase aguda da infecção (CANÇADO, 1985) e têm aplicabilidade severamente restrita em pacientes crônicos, além de serem altamente tóxicos (de CASTRO, 1993).

Os tripanosomas parasitas de mamíferos, evolutivamente, desenvolveram mecanismos para escapar da resposta imunológica do organismo hospedeiro, como a ocupação intracelular, no caso do *T. cruzi*, ou a variação antigênica exemplificada pelos tripanossomas da seção Salivaria, como o *T. evansi* (NELSON *et al.*, 1984), o que tem frustrado tentativas de vacinação (URQUHART *et al.*, 1998). Tais aspectos associados ao desenvolvimento da resistência dos parasitos a drogas empregadas no tratamento da infecção tornam difícil o controle das tripanosomíases em áreas endêmicas.

A perspectiva de emprego de medicamentos bioterápicos, anteriormente conhecidos como nosódios, no tratamento e na profilaxia de doenças parasitárias e infecciosas tem sido investigada e questionada por diversos autores. Embora os bioterápicos sejam amplamente empregados pela terapêutica homeopática, ainda são poucas as informações disponíveis, as quais evidenciem através de metodologia adequada, a ação dos mesmos.

Hahnemann (1835), idealizador da Homeopatia, após concluir suas observações sobre as doenças crônicas, apresentou o conceito de que estas teriam como base um princípio hereditário e/ou adquirido, ao qual denominou miasma. Atualmente, o termo miasma é substituído por diátese (grego: “dispor à”), indicando estado mórbido reacional crônico do organismo para desenvolver determinados grupos de moléstias (PUSTIGLIONE e CARILLO Jr., 1994). Andrade *et al.* (2005), em estudo da origem diatéctica da Doença de Chagas, observaram significância estatística entre esta e a diátese sífilínica.

Uma das principais características do medicamento homeopático é a reduzida concentração de substância que este contém, sendo os medicamentos ultradiluídos e dinamizados (“Ultra High Dilution”). A partir de potências equivalentes à 12 CH, não há mais presença de moléculas da substância original (BASTIDE *et al.*, 1995), visto que o número de

Avogrado foi ultrapassado. Entretanto, de acordo com vários autores, tais ultradiluições continuam a exercer efeitos biológicos em sistemas vivos (WYNN, 1998; JONAS e DILNER, 2000; WEISSMAN et al., 1992; MACHADO, 2003; BUKHSH, 2003).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos terapêuticos, profiláticos e imunomodulatórios de bioterápico homeopático em dois modelos de doença parasitária: infecção experimental de camundongos por *T. evansi* e por *T. cruzi*, representando infecção de curso agudo e crônico, respectivamente; assim como avaliar os efeitos do medicamento homeopático *Phosphorus* na infecção por *T. cruzi*.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Divisão do gênero *Trypanosoma*

Com base no comportamento em seus hospedeiros e, principalmente, no vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em duas seções: *Salivaria* e *Stercoraria*, incluindo, respectivamente, tripanosomas que não apresentam fase de desenvolvimento no vetor, sendo inoculados mecanicamente, como é o caso do *Trypanosoma evansi* e tripanosomas que se desenvolvem no trato digestivo do vetor e têm suas formas infectivas liberadas juntamente com as fezes, como é o caso do *Trypanosoma cruzi* (HOARE, 1972).

2.2 Características da infecção por *Trypanosoma evansi*

Durante seu ciclo evolutivo, o *T. evansi* apresenta somente a forma tripomastigota, a qual vive livre no plasma sanguíneo, assim como nos espaços extracelulares dos hospedeiros (SEQUEIRA e AMARANTE, 2001).

A transmissão do *T. evansi* de um animal a outro ocorre mecanicamente através da picada de moscas hematófagas como *Tabanus* e *Stomoxys* (SOULSBY, 1982), embora, nas Américas Central e do Sul, o morcego hematófago também possa atuar como vetor e hospedeiro do parasita (URQUHART et al., 1998).

Nos hospedeiros vertebrados, os tripomastigotas se dividem assexuadamente por divisão binária simples. Após a infecção inicial, os parasitas multiplicam-se rapidamente, determinando elevados níveis de parasitemia (SEQUEIRA e AMARANTE, 2001).

A maioria dos animais domésticos é susceptível ao *T. evansi* (ITARD, 1989). Dependendo da virulência do parasita e da suscetibilidade individual do hospedeiro, a sintomatologia clínica varia, sendo os casos graves da doença normalmente observados em eqüinos, camelos e cães (SOULSBY, 1982). Outros animais domésticos, como bovinos, bubalinos e suínos são também comumente infectados, porém, a doença clínica nestes animais é raramente observada, sendo sua maior importância como reservatório da infecção (URQUHART et al., 1998). Os eqüinos infectados apresentam febre, anemia severa e emaciação características da tripanosomose, além de desenvolverem tumefações edematosas na região ventral do abdome e genitais. Nos casos crônicos é comum a paralisia progressiva dos quartos posteriores (URQUHART et al., 1998). Os animais não tratados geralmente morrem em consequência do parasitismo (SEQUEIRA e AMARANTE, 2001).

Certamente, o aspecto mais importante da tripanosomose causada pelos tripanosomas da seção *Salivaria*, responsável pela parasitemia persistente, seja a maneira pela qual o parasita escapa da resposta imunológica do hospedeiro. Os tripanosomas possuem uma camada glicoprotéica antigênica (VSG), a qual determina a formação de anticorpos, que causam opsonização e lise dos tripanosomas. Entretanto, quando os anticorpos são produzidos, certa proporção dos tripanosomas já apresenta alterada a estrutura química de sua camada glicoprotéica e, apresentando uma superfície antigênica diferente, não são afetados por estes anticorpos. Esse processo de variação antigênica produz ondas de remissão da parasitemia (URQUHART et al., 1998). Nos eqüinos, tal processo de multiplicação dos parasitas e resposta do hospedeiro se repete até a morte do animal (SEQUEIRA e AMARANTE, 2001).

Sabe-se que o animal, o qual se recupera de infecção por *T. evansi*, adquire certa imunidade à re-infecção. Entretanto, esta resistência é de curta duração quando a cura decorre da administração de quimioterápicos e mais duradoura, quando os animais se recuperam sem tratamento. Em nenhum caso haverá proteção contra cepa heteróloga. Existem numerosas

cepas antigenicamente distintas de *T. evansi* em várias partes do mundo (WOO, 1977; UCHE e JONES, 1994).

Na patogenia da infecção por *T. evansi*, a anemia é um dos aspectos mais importantes, (HOARE, 1972; HERRERA et al., 1998; MENEZES et al., 2004), embora sua patogênese não tenha sido completamente elucidada. De acordo com IGBOKWE e NWOSU (1997), a etiologia da anemia na tripanossomíase é multifatorial, com hemólise, hemodiluição e / ou eritropoiese não compensatória, oscilando durante o curso da infecção.

Entre os fatores associados à tripanotolerância, caracterizada pela capacidade de controlar a parasitemia e a anemia, conseqüências importantes do parasitismo por tripanosomas salivários (MURRAY et al., 1982; LUCKINS e MEHLITZ, 1976 'citado por' MENEZES et al., 2004), D'Ieteren et al. (1998) descrevem a capacidade de uma resposta humoral mais rápida à infecção, assim como um sistema fagocítico mononuclear mais eficiente, além da participação de mecanismos inespecíficos.

Embora o mecanismo de tripanotolerância tenha sido discutido no modelo murino para várias espécies de tripanosomas salivários, estas questões ainda são pouco conhecidas em relação ao *T. evansi* (MENEZES et al. 2004).

Onah et al. (1997) observaram que ovinos portadores de infecção crônica por *T. evansi* apresentam declínio na proporção de células T, e aumento dos níveis de linfócitos B. Entretanto, a expansão do número de linfócitos B circulantes com títulos ascendentes de IgM não possibilita o controle da infecção.

Dados obtidos através da avaliação do reconhecimento de peptídeos antigênicos de *T. evansi*, assim como dos níveis específicos de anticorpos em "Wistar rats" (*Rattus norvegicus*) experimentalmente infectados com isolados domésticos e silvestres de *T. evansi*, oriundos da região do Pantanal, Brasil, sugerem que a resposta imunológica humoral não é suficiente para garantir efetivo controle da infecção (QUEIROZ et al., 2001). Semelhantemente, Menezes et al. (2004) não observaram correlação entre título sorológico de IgG, maior tempo de sobrevivência e capacidade de controlar a parasitemia, em camundongos experimentalmente infectados por *T. evansi*.

UMEDA (1988) avaliou as lesões teciduais determinadas pela infecção por *T. evansi* em camundongos, ratos, coelhos, entre outros roedores, experimentalmente infectados. Os autores observaram multiplicação de formas parasitárias em vários órgãos duas semanas após infecção, quando os níveis de anticorpos se elevaram. Infiltrado inflamatório mononuclear foi observado no fígado, pâncreas, epidídimo, músculo esquelético, cérebro e coração.

2.3 Características da Infecção por *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, tem despertado grande interesse em Biologia, devido à importância da doença grave que determina e, visto que os tripanossomatídeos apresentam alguns aspectos biológicos especiais, devido aos quais eles constituem excelente modelo para estudo de questões biológicas básicas (BRENER et al. 2000).

A transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer naturalmente a humanos e a outros mamíferos pela contaminação da pele ou das mucosas por fezes e/ou urina dos vetores, insetos hematófagos da família Reduviidae, conhecidos como triatomíneos ou, popularmente, como 'barbeiros'. Outras formas de transmissão incluem a transfusão sanguínea, transmissão pelas vias oral e transplacentária, através do transplante de órgãos e acidental em laboratório (GOMES, 1997).

Independentemente da via de infecção do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* apresenta um estágio intracelular. Formas infectantes do parasito, tripomastigotas metacíclicas, invadem as células (como macrófagos, por exemplo), diferenciam-se e dividem-se em amastigotas

intracelulares (formas multiplicativas) para emergirem como tripomastigotas que circulam pelo sangue e reinvadem várias células (GARCIA e AZAMBUJA, 2000). Esse ciclo determina aumento da parasitemia, caracterizando a **fase aguda** da infecção (PEREIRA, 2003). A queda da parasitemia, decorrente da resposta imune efetora do hospedeiro, dá início à **fase crônica**. Essa fase é caracterizada por afecções cardíacas (forma cardíaca), digestivas (forma digestiva), cardíacas e digestivas (forma mista) e sem sintomatologia, mas com sorologia positiva (forma indeterminada) (RODRIGUES et al., 1999 'citado por' PEREIRA, 2003). Tais manifestações estão relacionadas a fatores inerentes ao parasito (cepa, virulência, tropismo) e ao hospedeiro (idade, perfil da resposta imune) (DIAS, 2000).

2.3.1 Doença de Chagas

Originalmente a Doença de Chagas era uma enzootia de animais silvestres, tendo ocorrido a adaptação dos triatomíneos vetores ao domicílio nos ciclos da agricultura e pecuária, devido ao desmatamento intenso (COURA, 2003).

A doença é circunscrita ao continente americano, particularmente às regiões tropicais e subtropicais da América Latina, aonde estima-se que sua prevalência seja em torno de 18 milhões de casos e que aproximadamente 100 milhões de pessoas estejam expostos ao risco da infecção (COURA, 2003). Além disso, a migração crescente de populações aumentou o risco de transmissão por transfusão de sangue em diversos outros países fora da América Latina. Entretanto, atualmente, a Doença de Chagas está entre as doenças consideradas negligenciadas pelas autoridades de saúde pública.

A Doença de Chagas Aguda pode ser aparente (casos clássicos) ou inaparente (freqüentemente apresentando somente quadro febril passageiro e inespecífico). A cura espontânea da infecção aguda pode ser observada em modelo experimental, sobretudo entre grandes mamíferos como bovinos e eqüinos, não podendo ser excluída em seres humanos, apesar de nunca ter sido reportada (BRENER et al., 2000). Em humanos, a duração da fase aguda varia geralmente entre 4 e 12 semanas, ao fim das quais o quadro febril e a parasitemia (detectada por métodos diretos) tendem a desaparecer. Em paralelo, decrescem também os níveis de imunoglobulinas da classe M e sobem os níveis de IgG, definindo, praticamente, a passagem para a Doença de Chagas Crônica (DIAS et al., 1997; STORINO et al., 1994 'citado por' BRENER et al, 2000).

A fase aguda pode se iniciar com a formação de um edema no local de entrada do parasito (chagoma de inoculação), que tende a desaparecer durante o curso da infecção. Este primeiro momento é seguido por um período pré-patente, de tempo variável, no qual os parasitos se multiplicam de forma exponencial. Após este período, é possível a detecção do parasito na corrente sanguínea e sob a forma de pseudocistos em tecidos, principalmente musculares (DIAS et al., 1956).

A presença do parasito induz acentuada resposta imunológica no indivíduo, e conseqüente diminuição da parasitemia a níveis sub-patentes, dando início à fase crônica da infecção. Tanto a fase aguda com a crônica são caracterizadas por intensa reação inflamatória no tecido cardíaco (DIAS et al, 1956).

2.3.2 Resposta imune à infecção pelo *T. cruzi*

A infecção pelo *T. cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta inata (natural) e adquirida (adaptativa) do hospedeiro. Em conseqüência, o parasita passa a ser continuamente combatido e tem a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro. No entanto, ele pode persistir indefinidamente, assim como a resposta imune. Lesões teciduais resultantes dessa atividade imunológica prolongada acumulam-se e, eventualmente, levam às alterações funcionais musculares e nervosas características da Doença de Chagas. Atualmente, está bem estabelecido que células e mecanismos efetores do

sistema imune são responsáveis tanto pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos como pelas lesões locais resultantes da atividade antiparasitária (BRENER et al., 2000).

O *T. cruzi* apresenta nos hospedeiros vertebrados dois estágios do seu ciclo de vida que são biológica e morfológicamente distintos e que, conseqüentemente, ativarão moléculas e populações celulares distintas do sistema imune. Os tripomastigotas extracelulares são formas flageladas que circulam no sangue e são alvos de anticorpos e da lise mediada por complemento, assim como, da fagocitose e morte por fagócitos ativados. A via alternada do complemento (C') é ativada pelo *T. cruzi*, entretanto, enquanto formas não infectivas (epimastigotas) do parasita são destruídas, formas infectivas tripomastigotas são resistentes à ação lítica do C' (NOGUEIRA et al., 1975).

Inúmeros autores já descreveram a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* em pacientes e em modelos experimentais e propõem sua importância no controle da infecção (SILVA, 1996; KUMAR e TARLETON, 1998). Krettli e Brener (1976) demonstraram a existência de anticorpos protetores contra formas sanguíneas vivas de *T. cruzi*, denominados anticorpos líticos. Esses anticorpos induzem a lise dos parasitas mediada por complemento e diferem dos anticorpos convencionais detectados nos diagnósticos sorológicos. Os anticorpos líticos participam da resistência a infecções com cepas virulentas e desaparecem após a cura.

Ao penetrar nas células do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, forma replicativa do parasito, localizando-se no citoplasma da célula hospedeira sob a forma de pseudocistos. Nesta forma intracelular o sistema imune reconhece preferencialmente a célula infectada através de epítomos do parasito apresentados no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e, portanto, por células T CD8, as quais controlam a replicação do parasito destruindo a célula infectada. (TARLETON, 1991).

A invasão de diversos tipos celulares pelo *T. cruzi*, em especial de macrófagos, inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata (ALIBERTI et al., 1996). A citocina pró-inflamatória TNF- α , produzida pelos macrófagos durante a infecção, participa de forma sinérgica na interação entre macrófagos e células NK, as quais, ativadas por IL-12 produzida pelos macrófagos, produzem IFN- γ que, por sua vez agirá sobre macrófagos, ativando-os para a atividade microbicida (TARLETON, 1988). O papel do TNF- α na resposta inata do hospedeiro é complexo, levando a efeitos tanto deletérios como protetores. Macrófagos de animais susceptíveis (maior letalidade) secretam níveis altos de TNF- α , comparados a macrófagos de animais resistentes. Além disso, a injeção de TNF- α exacerba a mortalidade de animais infectados. Entretanto, a atividade de proteção do TNF- α é evidente em animais geneticamente deficientes para o mesmo, os quais apresentam altas parasitemias e mortalidade, quando infectados pelo *T. cruzi*. No tecido cardíaco desses animais, o parasita se replica em grande número, mas na ausência do infiltrado inflamatório mononuclear observado em animais normais (SANTOS LIMA; MINOPRIO, 1996). Em associação ao TNF- α , o IFN- γ produzido pelas células NK estimula, em macrófagos, a produção de NO (GAZZINELLI et al., 1992), com atividade tóxica sobre o *T. cruzi*. As citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β inibem a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN- γ (GAZZINELLI et al., 1992), sendo responsáveis pela 'desativação', controlando os efeitos inflamatórios letais de citocinas tipo 1 produzidas durante a infecção (REVELLI et al., 1999). Diferentes estudos demonstraram a correlação entre maior susceptibilidade de linhagens murinas à infecção e uma maior produção da citocina antiinflamatória IL-10. Camundongos geneticamente deficientes em IL-10 são capazes de controlar melhor a infecção pelo *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN e COFFMAN, 1996), entretanto, a necessidade de produção de IL-10 pode estar relacionada com a proteção do hospedeiro contra sua própria resposta imune (HUNTER et al., 1997).

Citocinas de perfil Th1, como IFN- γ , têm sido freqüentemente associadas à resistência a doenças parasitárias, como a doença de Chagas, leishmaniose, entre outras (BRANDONISIO et al, 2001; LAUCELLA et al, 2004). Porém, na fase crônica da infecção chagásica, este perfil de citocinas tem sido associado à cronificação da inflamação (FRESNO et al., 1997; BAHIA-OLIVEIRA et al, 1998; DOS SANTOS et al, 2001, GOMES et al., 2003 citados por” MARINO, 2005).

2.3.3 Patogênese na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Os processos patogênicos das lesões na fase aguda da infecção, são complexos e nele estão envolvidos o parasita, sua multiplicação e morte intracelular, além mecanismos imunológicos humoral e celular (BRENER et al., 2000).

Os estudos iniciais referentes à ação do parasito revelaram que o seu desenvolvimento normal não lesa a célula parasitada, o que só ocorre quando os parasitos se rompem (MAYER e ROCHA LIMA, 1954). GRIMAUD e ANDRADE (1984) demonstraram que a integridade das miocélulas cardíacas está preservada mesmo na presença de pseudocistos contendo formas amastigotas de *T. cruzi*.

Muitos esforços têm sido empregados na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na gênese e perpetuação da miocardite chagásica crônica. Durante vários anos, questionamentos sobre a participação do parasita e seus antígenos nestes processos foram colocados num segundo plano em função da hipótese de que mecanismos auto-imunes seriam os principais responsáveis pela miocardite chagásica crônica (PIRMEZ e RIBEIRO dos SANTOS, 1994; KALIL e CUNHA NETO, 1996). Contudo, vários trabalhos têm mostrado que a presença de células T CD8+ está correlacionada à persistência do parasita e seus antígenos, sugerindo a influência direta do mesmo no desenvolvimento da miocardite em pacientes chagásicos crônicos (HIGUCHI et al., 1993).

Estas observações sugerem que o sucesso do controle da infecção pelo *T. cruzi* envolva a geração da resposta imune adequada para controlar o parasitismo e a regulação desta resposta, para prevenir a extensa destruição de tecidos do hospedeiro. Alguns trabalhos propõem que, na fase crônica da doença de Chagas, as células TCD4+ respondam de forma deletéria contra antígenos próprios, desencadeando reações inflamatórias de cunho auto-imune, sendo estas responsáveis pela manutenção da miocardite (RIBEIRO dos SANTOS et al., 1992). No entanto, em pacientes cardiopatas crônicos, a miocardite é determinada principalmente pelas células T CD8+ (HIGUCHI et al., 1993).

2.3.4 Tratamento

A quimioterapia para tratamento da Doença de Chagas ainda constitui um desafio, assim como a busca por alternativas de tratamento. Atualmente, existem apenas duas drogas disponíveis para uso clínico, Nifurtimox e Benzonidazol, entretanto, ambas com aplicabilidade restrita em pacientes crônicos, além de serem altamente tóxicas (de CASTRO, 1993). O tratamento específico com Nifurtimox ou Benzonidazol consegue curar a Doença de Chagas Humana **aguda** entre 30 e 80% dos casos relatados, incluindo os congênitos, sendo tanto mais efetivo quanto mais precocemente for instalado (BRENER et al., 2000).

O Ministério da Saúde, através do documento intitulado ‘Tratamento Etiológico da Doença de Chagas’, preconiza o tratamento com drogas anti-*T. cruzi* de todos os pacientes na fase aguda da infecção, sendo o Benzonidazol a droga de escolha, independente de qual tenha sido o mecanismo de transmissão (MARINO, 2005). De acordo com Andrade et al. (1996), a administração do Benzonidazol em crianças soropositivas para infecção chagásica é justificável, devendo ser recomendada como medida de saúde pública.

Alguns autores evidenciam que o tratamento com os nitroderivados é insatisfatório na infecção pelo *T. cruzi* e não deve ser recomendado, devido à ineficiência na erradicação do

parasita (CANÇADO, 1999). Novas propostas terapêuticas têm sido abordadas na literatura, como a identificação de potenciais candidatos vacinais (BHATIA et al., 2004), imunoterapia através de vacina de DNA (COSTA et al., 1998; ZAPATA-ESTRELLA et al., 2006) ou, ainda, o promissor transplante de células da medula óssea para reparo do tecido cardíaco e redução da miocardite (SOARES et al., 2004). Na busca de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas, destacam-se alguns antifúngicos de última geração, que atuam na inibição de enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol (FERRAZ, 2005). Novos quimioterápicos, obtidos de produtos naturais, medicamentos ou fármacos ativos em outras doenças e compostos químicos de síntese têm exibido resultados promissores, porém, os estudos ainda são preliminares e não existe previsão de chegada destes compostos ao mercado farmacêutico. Assim, ainda não há disponibilidade de uma terapia eficaz, o que impulsiona a busca de novas terapias, associadas ou não ao benzonidazol, que atuem de forma pontual e apresentem menores efeitos colaterais, aumentando a qualidade de vida do portador desta parasitose (MARINO, 2005).

2.3.5 Abordagem imunológica

Na infecção por *Trypanosoma cruzi*, a participação do sistema imune é importante, uma vez que uma resposta eficaz impede a evasão do parasito e, conseqüentemente, evita reações inflamatórias e teciduais causadas pelo mesmo. Assim, estratégias que envolvam intervenções imunes poderão ser uma ferramenta adicional para aumentar a eficácia do tratamento (PEREIRA, 2003).

Recentemente, vários grupos vêm desenvolvendo estudos de imunoproteção, no modelo murino, utilizando antígenos definidos. Estão sendo utilizados antígenos protéicos purificados de *T. cruzi*, assim como proteínas e peptídeos clonados e fusionados, expressos em bactérias por tecnologia de DNA recombinante (BRENER et al. 2002).

Zapata-Estrella et al. (2006) avaliaram os efeitos da administração de vacina DNA sobre o controle da infecção por *T. cruzi* e sobre a população de células T em camundongos. De acordo com os autores, a vacinação durante as fases aguda e crônica induziu aumento no número de linfócitos CD4+ e CD8+ em ambas as fases da infecção, além da redução das lesões e do parasitismo no tecido cardíaco.

Garcia et al. (2006) avaliaram as manifestações imunológicas e patológicas associadas à administração da proteína Tc13 do *T. cruzi*, assim como a capacidade do referido antígeno conferir proteção contra a infecção. Decorridos cinco meses da imunização, foram detectados sinais de hepatotoxicidade e alterações reativas no coração, fígado e baço em 40-80% dos animais. Quando os animais imunizados foram infectados, observou-se decréscimo significativo da parasitemia na fase aguda, assim como menor severidade das lesões cardíacas, entretanto sem alterações na sobrevida.

Licon-Trillo e Perez-Reyes (1994) avaliaram a cinética da resposta imune humoral em camundongos imunizados com membranas obtidas através do cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi*. De acordo com os autores, os animais previamente imunizados responderam primeiramente à infecção, além de reconhecerem maior número de peptídeos antigênicos (22 a 115 KDa).

2.3.6 Critérios de cura

Na fase crônica da infecção por *T. cruzi*, em geral, não há parasitemia patente; assim, diversos métodos de diagnóstico devem ser usados a fim de se estabelecer um critério de cura. Entre estes, Hemocultivo, Xenodiagnóstico, Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Subinoculação (BRENER et al. 2000). A lise mediada por complemento (LMC) muitas vezes se torna gradualmente negativa após a quimioterapia específica, enquanto que a sorologia

convencional permanece positiva, constituindo assim, um importante parâmetro para medir a cura parasitológica pós-tratamento (KRETTLI et al. 1982).

2.4 Homeopatia

A homeopatia, do grego *homoios*: semelhante e *pathos*: doença, é uma modalidade terapêutica praticada há mais de duzentos anos, tendo como idealizador o médico alemão Samuel Hahnemann (1755-1843). A idéia central da homeopatia está baseada na ‘Lei de Similitude’: substâncias submetidas a diluições seriadas, e a sucussões ritmadas (processo chamado ‘dinamização’) consevariariam um poder curativo contra doenças que apresentassem sintomas semelhantes aos que seriam produzidos pela mesma substância em indivíduos sãos (HAHNEMANN, 1835).

Ao investigar as propriedades medicamentosas de diversas substâncias, Hahnemann tomou, como base fundamental para seus estudos, os efeitos da droga no homem são, fenômeno denominado patogenesia, sendo seu objetivo, produzir sintomas bem caracterizados para, posteriormente, poder empregar esta mesma substância ultradiluída e dinamizada nos enfermos com sintomas semelhantes (MARTINEZ, 1997).

A medicina homeopática, no Brasil, é oficialmente reconhecida como uma especialidade, pela Associação Médica Brasileira, desde 1979 e pelo Conselho Federal de Medicina, desde 1980, estando presente até mesmo no sistema público de saúde (BONAMIN, 2001).

2.4.1 Medicamentos homeopáticos

Os medicamentos homeopáticos são submetidos a diluições e triturações seguidas de sucussões sucessivas, ‘dinamizações homeopáticas’, descritas como processos pelos quais são despertadas as propriedades medicinais, latentes nas substâncias naturais enquanto em estado bruto (HAHNEMANN, 1835), recebendo, também, o nome de ‘ultradiluição’, ‘diluição ultramolecular’ ou UHD (*ultra high dilution*), sobretudo na literatura científica tradicional, uma vez que alguns medicamentos são preparados de forma a apresentarem quantidades não ponderais do soluto, ou seja, ultrapassam a concentração equivalente a 6×10^{-24} M (número de Avogrado) (BONAMIN, 2001).

O fármaco é dinamizado em água destilada com a finalidade de desenvolver o potencial medicamentoso, podendo ser conservado em insumo inerte adequado – veículo que pode ser álcool, sacarose ou lactose. As potências são representadas por escalas (proporções de insumo ativo: insumo inerte): Centesimal Hahnemanniana (1: 100 e símbolo CH), Decimal Hering (1: 10 e símbolo DH) e Cinquenta Milsimal (1: 50.000 e símbolo LM ou Q) (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 1997).

2.4.2 Mecanismo de ação das ultradiluições

O mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos não pode ser explicado em nosso presente estado de conhecimento, visto que, a partir de potências equivalentes a 12 CH não há mais presença de moléculas da substância original no medicamento (JONAS e DILNNER, 2000). Assim, propostas teóricas, não mecanicistas, da Ciência contemporânea, se aplicam à compreensão do fenômeno homeopático (BONAMIN, 2001).

Teoria da Memória da Água

O modelo da memória da água, proposto por Citro et al. (1995), afirma que a transferência da atividade farmacológica molecular de uma substância, entre sistemas biológicos, poderia ocorrer através de processos envolvendo campos magnéticos. Neste caso, o mesmo efeito da substância será observado no sistema receptor, após a transferência.

Durante as diluições seriadas, ocorreria uma mudança estável nas conexões intermoleculares da água, impressa pelo soluto, sendo que tal propriedade poderia ser propagada para a água presente no organismo (BONAMIN, 2001).

Teoria do Caos e dos Sistemas Complexos

Os sistemas complexos são definidos como sistemas abertos, em condição de não-equilíbrio e auto-organizados (autopoiéticos). Assim, os fenômenos ocorrem nos sistemas complexos na forma de rede e não de forma linear (SAVI, 2006). Os seres vivos são descritos como ‘sistemas abertos’, os quais operam longe do equilíbrio e garantem sua sobrevivência através de mecanismos auto-reguladores não lineares. Nos sistemas complexos, pequenas variações podem representar grandes mudanças na organização do sistema como um todo (CAPRA, 1996 ‘citado por’ BONAMIN, 2001). A eficácia terapêutica dos medicamentos homeopáticos seria, então, compatível com a descrição de comportamento dos chamados ‘sistemas complexos’: uma pequena variação, representada pela ultradiluição de uma substância, poderia determinar grandes modificações fisiológicas e estas, por sua vez, dependeriam das condições prévias do organismo (BONAMIN, 2001).

BELLAVITE e SIGNORINI (1998) propõem também que os sistemas vivos estariam ‘suspensos’ entre a ordem e o caos, ou seja, albergariam simultaneamente estas duas características, o que constitui outra peculiaridade dos sistemas complexos. Ordem e caos seriam encontrados em todos os níveis de homeostase, das moléculas à mente humana. Segundo os autores, a doença seria antes de suas manifestações estruturais, um distúrbio de oscilações internas e de suas comunicações.

O Paradigma dos significantes corporais

A Teoria dos Significantes Corporais tem como base o conceito de informação dos sistemas biológicos e de seu papel na homeostase. Segundo este modelo teórico, alguns fenômenos biológicos poderiam ser mediados através dos hipotéticos objetos semânticos (informação) ao invés dos conhecidos objetos moleculares (droga e receptor) O sistema mínimo de informação constitui-se de três elementos: a matriz da informação (substância), o instrumento de mediação (água) e o receptor da informação (doente). Esses três elementos são indissociáveis e a informação só existe através de suas relações recíprocas. (BONAMIN, 2001). O “Paradigma dos Significantes Corporais” nos faz conceber outra forma de comunicação entre os seres vivos: todo organismo vivo é capaz de fazer trocas de informação com o meio de maneira não necessariamente simbólica, cognitiva ou molecular, o que se associa ao uso da homeopatia (BASTIDE e LAGACHE, 1997).

2.4.3 Efeitos biológicos das ultradiluições

Recentemente, vários trabalhos experimentais demonstraram a existência de efeitos biológicos dos medicamentos homeopáticos, entretanto, tais resultados não minimizam o principal entrave a sua aceitação científica, que é a incompatibilidade com as bases filosóficas da ciência tradicional, representadas pelo paradigma cartesiano-mecanicista (BONAMIN, 2001).

Bonamin *et al.* (2001) avaliaram em camundongos, a interação de dexametasona 7CH (10^{-17}) e dexametasona 15CH (10^{-33}), preparadas de acordo com a farmacotécnica homeopática, com dexametasona em concentrações farmacológicas. Os autores observaram que as referidas ultradiluições bloqueiam o efeito citotóxico determinado pelas concentrações farmacológicas da droga.

Belon (1999) avaliou a ação da Aspirina 5CH sobre a coagulação sanguínea, observando, em humanos, diminuição do tempo de sangramento. Após vários experimentos, o

autor concluiu que a Aspirina ultradiluída (9CH, 15CH e 30CH) determina aumento da agregação plaquetária, contrariamente ao efeito da droga em doses ponderais, a qual diminui a agregação, e que o efeito de doses ponderais da droga (100mg / Kg) pode ser totalmente inibido pela Aspirina 15 CH.

Guedes (2003) observou que preparações homeopáticas ultradiluídas de glândula tireoidiana de *Rana catesbeiana* altera a velocidade de metamorfose de girinos da mesma espécie. O número de imagos foi significativamente menor no grupo tratado com altas diluições da glândula tireoidiana quando comparado ao grupo controle. De acordo com o autor, os hormônios tireoidianos transmitem ‘informações’ específicas para as moléculas utilizadas na preparação da solução, mesmo em molaridade acima do número de Avogrado.

Entre os trabalhos destinados à avaliação da atividade imunomoduladora de antígenos ultradiluídos, Weissman et al. (1992) observaram que o KLH (macro-molécula extraída da hemolinfa de molusco) ultradiluído, administrado a camundongos, via oral ou parenteral, modulou a resposta imune específica humoral (IgG) e celular ao referido antígeno.

Um novo conceito de imunomodulação é proposto, tal conceito baseado em nova abordagem da capacidade de resposta do organismo, não em novas moléculas envolvidas na resposta. Visto que o sistema imune é submetido a complexas interações celulares e moleculares, é possível que o aspecto qualitativo ao invés do quantitativo possa ser importante e que a simples ‘informação’ de um imunomediador possa ser ‘entendida’ pelo organismo (BASTIDE e BOUDARD, 1995).

2.4.4 Bioterápicos

A Farmacopéia Francesa de 1948 define como nosódios os medicamentos obtidos a partir de culturas microbianas, de vírus, ou de secreções patológicas. Em 1954, a comissão permanente da Farmacopéia Francesa criou o termo bioterápico, o qual inclui os nosódios, os sarcódios e os auto-nosódios (PINTO, 2001).

De acordo com a 2ª edição do Manual de Normas Técnicas para Farmácia Homeopática de 1995, os bioterápicos são produtos oriundos de excreções, secreções, tecidos e órgãos, patológicos ou não, ou ainda, de produtos de origem microbiana ou alérgenos. Todos estes serão matérias-primas para as preparações de uso homeopático (PINTO, 2001).

Os bioterápicos são considerados medicamentos homeopáticos por serem preparados de acordo com a farmacotécnica homeopática, sofrendo diluição e dinamização. Entretanto, o método é chamado de Isopatia ou Isoterapia, visto que segue não a Lei dos Semelhantes, mas a Lei dos Iguais. Na Isopatia, é empregado o próprio agente etiológico, visando uma reação terapêutica. Nos modelos de isopatia (princípio de identidade), deve haver uma identidade estrita entre a substância diluída e a substância tóxica desafiante. Sob tal aspecto, a Isoterapia se diferencia da Homeopatia, a qual emprega o princípio da Similitude. Porém, estas não se distanciam muito, visto que as duas terapêuticas têm por objetivo provocar reação curativa, empregando substâncias em doses infinitesimais, uma vez que alguns medicamentos são preparados de forma a apresentarem quantidades ‘não ponderais’ do soluto.

De acordo com Bastide (1994), a isopatia é designada erroneamente como ‘vacinação homeopática’, através do emprego de antígenos virais, bacterianos ou parasitários diluídos e dinamizados, visto que não determina, após o emprego de antígenos ultradiluídos, síntese de moléculas, particularmente de imunoglobulinas. Segundo a referida autora, a administração de antígenos ultradiluídos é capaz de determinar modulação da resposta imune apenas quando o organismo for exposto ao referido antígeno.

Os primeiros relatos do emprego de bioterápicos datam de 1676. Nesta época, Robert Fludd utilizou o escarro tuberculoso no tratamento da tuberculose. Séculos mais tarde, em 1820, o primeiro veterinário homeopata na França, Wilhelm Lux, descreve o êxito obtido a partir do uso de secreção nasal de equino portador de Mormo, no tratamento da doença,

empregando a diluição de 30 CH e, a partir daí, passa a experimentar diversas outras secreções contagiosas (LABRE, 2001).

Nasi *et al.* (1982) propuseram o tratamento de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* com o nosódio preparado com o referido agente etiológico da Doença de Chagas. Foi observado que os animais tratados apresentaram redução da parasitemia, assim como maior tempo de sobrevivência, em relação ao grupo controle. Após o tratamento dos animais infectados, o xenodiagnóstico e a hemocultura revelaram resultado negativo.

Ribeiro *et al.* (1987) investigaram experimentalmente a susceptibilidade de duas cepas de *T. cruzi* (Y e Bolívia) à ação de quimioterápicos (Nifurtimax e Benzonidazol) e à ação do bioterápico Trypanosominum (TC D30), preparado de acordo com a farmacotécnica homeopática, a partir de cultura do *T. cruzi*. Para tal, grupos de camundongos foram experimentalmente infectados e, após o tratamento, foram avaliados a parasitemia e o comportamento dos animais. De acordo com os resultados, os autores observaram que a cepa Bolívia apresentou elevada resistência aos agentes quimioterápicos, enquanto a cepa Y mostrou-se mais susceptível aos mesmos. Porém, as duas cepas estudadas mostraram-se identicamente susceptíveis ao Trypanosominum D30. De acordo com os autores, os quimioterápicos atuam sobre as formas parasitárias, destruindo-as ou não, enquanto que o bioterápico agiria sobre a resposta imunológica do hospedeiro à infecção, a qual por mecanismo de resposta específica destruiu o agente etiológico, independentemente das características das cepas.

Buffa e Aubagna (1995) propuseram o emprego de nosódio no tratamento da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Para a produção do nosódio foi obtida secreção ocular de animais que apresentavam sintomatologia clínica da doença. De acordo com os autores, foi observado que a metade dos animais tratados com o bioterápico apresentou melhora do quadro clínico com recuperação total das estruturas oculares afetadas, sem recidivas. Tais resultados foram superiores quando comparados ao grupo tratado pela terapia convencional (gentamicina intrapalpebral, dexametasona, cloranfenicol e prednisolona).

Produtos homeopáticos foram ineficientes no controle de infecção por determinados nematódeos no gado. Um nosódio contra *Dyctiocaulus viviparus* não ofereceu proteção para infecção pulmonar determinada por este parasita, quando comparado ao grupo controle (TAYLOR *et al.*, 1989). Da mesma forma, o Antimônio homeopático foi ineficaz na eliminação de microfilárias de *Setaria labiatopapillosa* (KUMAR *et al.*, 1989).

Machado (2003) observou eficácia anti-helmíntica de 36,65% com o emprego de bioterápico preparado a partir de larvas infectantes do nematódeo *Trichostrongylus colubriformis*, em coelhos experimentalmente infectados, em relação ao número de nematódeos adultos recuperados à necrópsia.

Jonas (1999) avaliou a eficácia de nosódio preparado a partir de tecido infectado por *Francisella tularensis* em camundongos C3H/HeN tratados antes e após infecção experimental, observando proteção parcial (22%) quando comparado ao grupo controle. De acordo com o autor, se os nosódios homeopáticos podem induzir proteção contra agentes infecciosos contra os quais não há vacinação disponível, estes representam meio de redução de mortalidade e morbidade determinadas por tais agentes.

Neill (1993) ressalta a necessidade de investigações científicas sobre a eficácia dos bioterápicos preparados a partir de agentes infecciosos e parasitários ultradiluídos, visto que existem profissionais que empregam tais preparados em substituição às vacinas, mesmo em ausência de bases científicas que justifiquem tal procedimento.

2.4.5 Diátese

Diátese, palavra originada do grego *diathesis* ('dispor à'), indica predisposição hereditária ou adquirida do organismo para desenvolver determinados grupos de moléstias, frente a certos estímulos extrínsecos ou intrínsecos. Foram propostos quatro tipos de diáteses: Psora, Sicoze, Sifilismo e Tuberculinismo, cada uma correspondendo a síndromes representantes de determinado funcionamento orgânico. O conceito de diátese esclarece porque uma mesma entidade morfológica pode apresentar evoluções tão diversas, uma vez que variações no quadro clínico refletem a capacidade reacional herdada e adquirida por cada indivíduo, frente a um mesmo agressor. O conhecimento das diáteses é fundamental para melhor compreensão e abordagem terapêutica das enfermidades (CARILLO Jr., 2000).

De acordo com Andrade et al. (2005) as características clínicas e histopatológicas da Doença de Chagas poderiam ser explicados e melhor entendidos pela teoria da diátese sifilínica proposta por Carillo Jr. (2000).

Diátese Sifilínica

Diátese decorrente de deficiência hepática, tanto na estocagem de glicogênio e ferritina, como nas funções de desintoxicação de certas substâncias derivadas da metabolização do álcool e outros elementos, resultando em processos irritativos (inflamatórios) vasculares (arterites, trombozes e infartos, por comprometimento do *vasa vasorum* e proliferação da camada íntima) que evoluem para ulceração (fenômenos necróticos) e/ou esclerose, em nível de tecido elástico, gânglios, glândulas, vísceras, ossos, mucosas e pele. Tais deficiências comprometeriam o Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), presente em todos os tecidos e responsável pelo metabolismo intermediário, ou seja, pelos processos de assimilação e desassimilação de diversas partículas. Desse modo, o SMF além de realizar o metabolismo intermediário, entregando o produto metabolizado (nutrientes) ao parênquima do órgão, defende o organismo contra infecções, produzindo o processo de resposta inflamatória (CARILLO Jr., 2000).

Quanto ao aspecto de hipersensibilidade, é provável que o Sifilismo apresente reação do tipo II de Gell e Coombs, onde o dano aos tecidos é resultante de sua interação com anticorpos do tipo IgG ou IgM, com fixação e ativação do complemento (CARILLO Jr., 2000).

2.4.6 Repertorização

A consulta ao Repertório Homeopático - índice de medicamentos referentes a cada sintoma apresentado na experimentação patogenésica - auxilia a escolha do medicamento a ser utilizado. Os sintomas do indivíduo enfermo são colhidos e transformados em rubricas. Após repertorização das rubricas, são listados os respectivos medicamentos com diferentes pontuações, as quais se referem à frequência com que este medicamento causou o respectivo sintoma, quando administrado a indivíduo são. Dispondo-se dos medicamentos que apresentaram maior pontuação, consulta-se a Matéria Médica Homeopática para seleção do medicamento cuja patogenesia é mais semelhante ao quadro clínico observado (ZOBY, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Local

O trabalho experimental foi conduzido no Laboratório de Biologia de Trypanossomatídeos, Departamento de Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ.

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos, da linhagem C57BL/6, machos, com aproximadamente 60 dias de idade, provenientes do Centro de Criações de Animais de Laboratório (CECAL, Fiocruz). Os animais receberam água e alimento à vontade e foram mantidos em gaiolas de polietileno, máximo de 8 animais por caixa (Figura 1b), alojadas em estantes ventiladas (Figura 1a), com controle de temperatura ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (12h de luz / dia), no biotério de experimentação do Pavilhão Carlos Chagas, IOC, Fiocruz, RJ. O emprego de animais nos procedimentos experimentais foi previamente autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Fiocruz). Licença nº P 0209-04.

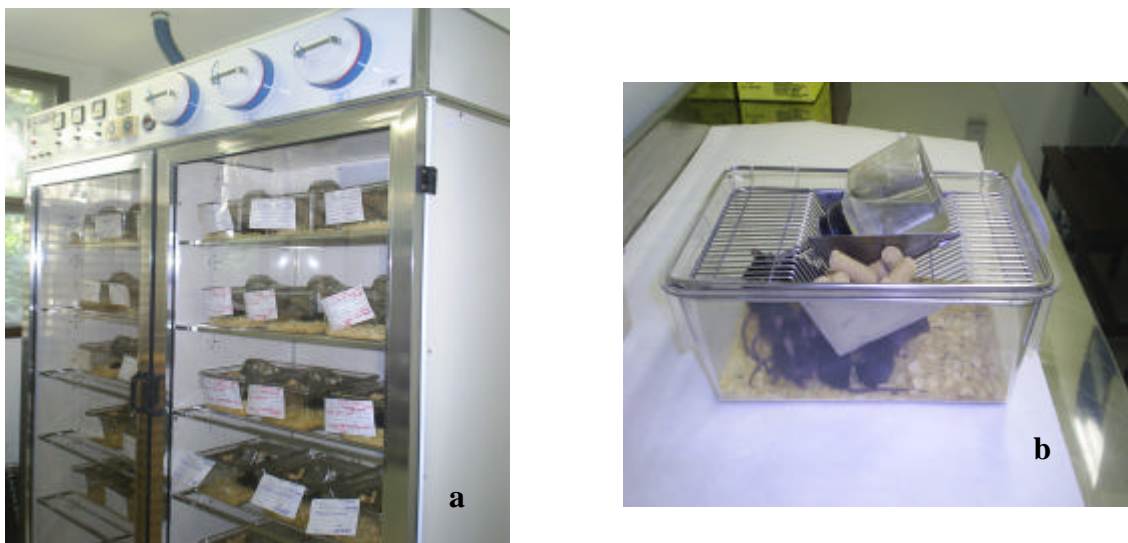


Figura 1. Biotério convencional de experimentação, Pavilhão Carlos Chagas, IOC, Fiocruz, RJ. Estante com ventilação e temperatura controladas, destinada à alocação de camundongos. Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 alojados em gaiolas de polietileno convencionais.

Delineamento Experimental

Foi empregado Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC).

Atividades Experimentais

As atividades experimentais foram divididas em três experimentos, através do emprego de diferentes modelos, os quais foram realizados em tempos distintos, como descrito a seguir:

Experimento 1: destinado à avaliação dos efeitos profiláticos e terapêuticos de BIOTERÁPICO *T. evansi* em camundongos experimentalmente infectados por *T. evansi*.

Experimento 2: destinado à avaliação de efeito imunomodulador do tratamento com BIOTERÁPICO *T. evansi* em camundongos imunizados com extrato total de *T. evansi*.

Experimento 3: destinado à avaliação dos efeitos profiláticos e terapêuticos de BIOTERÁPICO *T. cruzi* em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi*, assim como à avaliação dos efeitos do medicamento *Phosphorus* na infecção.

3.1 Experimento 1

Infecção de camundongos por *Trypanosoma evansi*

Inóculo de *Trypanosoma evansi*

Foi empregado isolado de *T. evansi* estocado em nitrogênio a -196°C em laboratório, obtido a partir de quati (*Nasua nasua*) naturalmente infectado. Por ocasião do preparo do inóculo, o material foi descongelado à temperatura ambiente e inoculado via intraperitoneal em camundongos C57BL/6 (n=4). Em seguida, a parasitemia dos camundongos infectados foi monitorada diariamente, através de exame direto de uma gota de sangue, obtida na extremidade da cauda dos animais, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico, até a detecção do pico parasitêmico.

Preparo do inóculo / infecção experimental

Após detecção do pico parasitêmico nos camundongos experimentalmente infectados, os animais foram insensibilizados em câmara de CO_2 e foi colhido o sangue total através de punção cardíaca. Em seguida, foi realizada contagem de parasitos em câmara de Neubauer e ajustado o inóculo a ser empregado. Assim, cada animal pertencente aos grupos de tratamento recebeu cinco formas tripomastigotas de *T. evansi*, por grama de peso corpóreo, via subcutânea, em Solução Fosfatada Glicosada (PSG). Visto que os animais apresentaram peso médio igual a 32 gramas, o inóculo foi constituído de 160 tripomastigotas por animal.

Obtenção de sangue destinado ao preparo do medicamento bioterápico (BIOTERÁPICO *T. evansi*):

Para tal, camundongos (n=6) receberam, por via intraperitoneal, 10 formas tripomastigotas de *T. evansi* / por grama de peso corpóreo. Em seguida, a parasitemia dos camundongos infectados foi monitorada diariamente. À detecção do pico parasitêmico nos camundongos experimentalmente infectados, os animais foram eutanasiados, sendo colhido o sangue total após insensibilização. O sangue obtido foi acondicionado em tubo estéril contendo soro fisiológico, destinando-se ao preparo do bioterápico na potência 12 DH, em solução com alcoolatura igual a 30%, em farmácia homeopática especializada¹, de acordo com a técnica proposta por COSTA (1988). Para o tratamento do grupo controle, a farmácia homeopática forneceu soro fisiológico na potência 12 DH, em solução com alcoolatura igual a 30%.

Grupos de tratamento

Bai: 10 camundongos foram tratados com BIOTERÁPICO *T. evansi* 12 DH, por via oral (Figura 2), durante 10 dias. Após 07 dias de intervalo, foram submetidos ao tratamento por mais 10 dias, de acordo com o esquema proposto por NASI *et al.* (1982), antes da infecção experimental, constituindo grupo **Bai** (Bioterápico antes da infecção).

Bpi: 10 camundongos, experimentalmente infectados por *T.evansi*, receberam BIOTERÁPICO *T. evansi* 12DH, 03 gotas via oral, durante 10 dias, de acordo com o esquema proposto por NASI *et al.* (1982), constituindo grupo **Bpi** (Bioterápico pós-infecção).

¹ Farmácia Homeopática Atomo, Rio de Janeiro, RJ.

Controle: 10 camundongos receberam soro fisiológico 12 DH, durante 10 dias, após 07 dias de intervalo foram submetidos ao tratamento por mais 10 dias, de acordo com o esquema proposto por NASI *et al.* (1982). Em seguida, foram experimentalmente infectados e submetidos ao tratamento com soro fisiológico 12 DH, por via oral, durante mais 10 dias, constituindo grupo **Controle**.

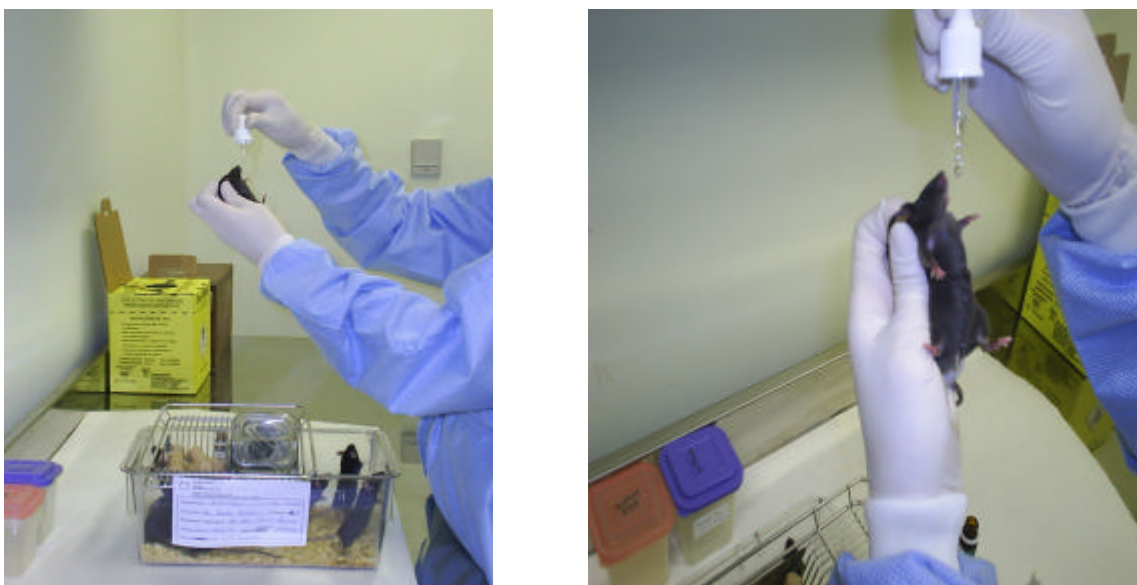


Figura 2. Administração oral de medicamentos na forma líquida a camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi*.

Parâmetros avaliados

- Avaliação da parasitemia (parasitas / mL de sangue) e do curso da infecção:

Os parâmetros avaliados relacionados à infectividade e virulência do parasita foram: parasitemias, períodos de pré-patência e patência. Para tal, decorridos 5 dias da infecção experimental, iniciou-se monitoramento da parasitemia dos animais. Após detecção de formas tripomastigotas sanguíneas por exame direto, a cada dois dias, foi colhido sangue (5 microlitros) diretamente da extremidade da cauda de todos os animais pertencentes aos grupos experimentalmente infectados, para determinação da parasitemia, através de contagem de tripanosomas em câmara de Neubauer. O sangue colhido foi submetido ao seguinte procedimento: diluição em cloreto de amônio, acondicionamento do sangue diluído em

câmara de Neubauer e contagem dos parasitos presentes nos quatro campos externos da câmara em microscópio ótico (objetiva 40x). O resultado era determinado a partir do seguinte cálculo:

número de parasitas / 4 x 10⁴ (fator de correção da câmara de Neubauer) x diluição em cloreto de amônio.

- Avaliações hematológicas :

Após detecção de parasitemias elevadas (10⁸-10⁹ parasitas / mL de sangue), aos 10 dias pós-infecção, os animais foram eutanasiados e foi colhido sangue total. As amostras de sangue obtidas foram destinadas à determinação do volume globular (VG), através de método de microhematócrito; hematimetria (x 10⁴ / mm³ de sangue), através da contagem de hemácias em câmara de Neubauer; leucometria global e específica (leucócitos / mm³ de sangue), através de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer e contagem diferencial em esfregaços sanguíneos corados com corante Panótico Rápido[®], respectivamente.

- Avaliação sorológica :

Parte do sangue colhido foi destinada à obtenção de soro para realização de técnica de Imunofluorescência Indireta, objetivando pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, segundo a técnica descrita por CAMARGO (1964), empregando-se as seguintes diluições séricas: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128. Após depósito de 10 µl de cada diluição nos poços das lâminas contendo antígeno do parasita previamente fixado, as lâminas foram incubadas e lavadas com PBS. Em seguida, procedeu-se a incubação das lâminas com conjugado fluoresceinado anti-IgM e anti-IgG de camundongo, diluído em PBS e azul de Evans, para revelação da reação antígeno-anticorpo. Após lavagem, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada e foi realizada leitura em microscópio com luz ultravioleta. O resultado foi considerado positivo quando 50% dos parasitas se apresentavam fluorescentes. O título sorológico correspondeu à última diluição positiva.

3.2 Experimento 2

Imunização de camundongos com extrato bruto de *Trypanosoma evansi*.

Preparo do Imunógeno

Para obtenção de antígeno total de *T. evansi*, camundongos (n=6) foram previamente infectados, recebendo, por via intraperitoneal, 10 formas tripomastigostas de *T. evansi* / por grama de peso corpóreo. Em seguida, a parasitemia dos animais infectados foi monitorada diariamente e após diagnóstico do 1º pico parasitêmico, os animais foram eutanasiados, sendo colhido sangue total. O sangue obtido foi processado em coluna de troca iônica preparada com DEAE-celulose (LANHAM e GODFREY, 1970), destinada à purificação dos parasitas por separação. Os parasitas, colhidos em PSG, foram submetidos à centrifugação, lavagem e ressuspensão em PBS. Para possibilitar a lise dos parasitas, o material foi submetido ao ultrassom (**sonicador**) e, em seguida, à dosagem protéica através de espectrofotometria.

Imunização

Foram realizadas 3 imunizações, via subcutânea, em intervalos de 3 semanas, de acordo com o seguinte esquema:

1ª imunização: 50 µg de imunógeno em Adjuvante Completo de Freund (CFA),

2ª imunização: 50 µg de imunógeno em Adjuvante Incompleto de Freund (IFA),

3ª imunização: 50 µg de imunógeno em Adjuvante Incompleto de Freund (IFA).

Grupos de tratamento

Bai: 24 camundongos receberam BIOTERÁPICO *T. evansi* 12DH, 3 gotas via oral, durante 10 dias. Após 07 dias de intervalo, receberam o tratamento por mais 10 dias, antes da imunização, constituindo grupo **Bai** (Bioterápico antes da imunização).

Bpi: 24 camundongos imunizados receberam BIOTERÁPICO *T. evansi* 12DH, 3 gotas via oral, durante 10 dias, constituindo grupo **Bpi** (Bioterápico pós-imunização).

Controle: 24 camundongos receberam soro fisiológico dinamizado (12DH), três gotas via oral, durante 10 dias. Após 7 dias de intervalo, receberam o tratamento por mais 10 dias. Após o período de tratamento, os animais foram imunizados por via subcutânea e em seguida, receberam soro fisiológico dinamizado (12DH), três gotas via oral, durante mais 10 dias, constituindo o grupo **Controle**.

Parâmetros avaliados

Nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42, 52 e 72 pós-imunização, foram eutanasiados 3 animais de cada grupo de tratamento. O sangue obtido destinou-se à avaliação de parâmetros hematológicos (leucometria global e específica) e à obtenção de soro destinado à Reação de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG (CAMARGO, 1964).

3.3 Experimento 3

Infecção de camundongos por *Trypanosoma cruzi*

Inóculo de *Trypanosoma cruzi*

Foi empregada a cepa Y de *T. cruzi*, isolada de paciente humano infectado e mantida em laboratório por passagens seriadas em camundongos.

Para a ampliação do inóculo a ser empregado na infecção experimental, camundongos (n=4) receberam, via intraperitoneal, sangue contendo formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* cepa Y. Em seguida, a parasitemia dos camundongos infectados foi monitorada diariamente, através do exame direto de uma gota de sangue, obtida na extremidade da cauda dos animais, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico, até a detecção do pico parasitêmico, aproximadamente aos 7 dias p.i.

Preparo do inóculo / infecção experimental

Após detecção do pico parasitêmico nos camundongos experimentalmente infectados, os animais foram eutanasiados e foi colhido o sangue total. Em seguida, foi ajustado, em câmara de Neubauer, o inóculo a ser empregado na infecção experimental dos animais pertencentes aos grupos de tratamento, 10.000 formas tripomastigotas sanguíneas do parasito, em PBS (pH 7,2) / por animal.

Obtenção de sangue destinado ao preparo do medicamento bioterápico

Para tal, camundongos (n=6) receberam, por via intraperitoneal, 10.000 formas tripomastigostas de *T. cruzi* cepa Y em diferentes dias, objetivando a obtenção de sangue de animais em diferentes fases da infecção. Em seguida, a parasitemia dos animais infectados foi monitorada até a detecção do estabelecimento da fase crônica, nos animais primeiramente

infectados (n=3) e diagnóstico do pico parasitêmico (fase aguda), nos animais secundariamente infectados (n=3), quando então, os animais foram eutanasiados e foi colhido o sangue total. O sangue obtido foi acondicionado em tubo estéril contendo soro fisiológico, destinando-se ao preparo do bioterápico na potência 12 DH, em solução com alcoolatura igual a 15%, em farmácia homeopática, de acordo com a técnica proposta por Costa (1988). Para o tratamento do grupo Controle, a farmácia homeopática forneceu soro fisiológico, em solução com alcoolatura igual a 15%. Visto que a durabilidade da solução com alcoolatura igual a 15 % é de, em média, uma semana, os medicamentos foram fornecidos semanalmente.

Escolha do medicamento homeopático *Phosphorus*

O emprego do medicamento homeopático *Phosphorus* foi proposto através do estudo da literatura especializada, nas áreas de parasitologia, clínica médica e homeopatia, a fim de determinar a imagem clínica da infecção por *T. cruzi* no homem e no modelo murino e produzir a imagem repertorial e patogênica da infecção. Através da correlação entre as imagens clínica e repertorial, foi determinando o diagnóstico medicamentoso da enfermidade, com base em descrições patogênicas, em sintomas homeopáticos relatados em repertório (FILHO, 2000) e através do emprego de técnica de repertorização matemática (SIHOREMAX *Software*). Considerando-se a diátese, de acordo com o estudo da origem diatéica da Doença de Chagas proposto por Andrade et al. (2005), o tratamento homeopático da enfermidade foi proposto.

O medicamento *Phosphorus*, a ser empregado no tratamento dos animais experimentalmente infectados, foi preparado na potência 12 DH, em solução com alcoolatura igual a 15%, em farmácia homeopática

Grupos de tratamento

Grupo 1: 16 camundongos receberam BIOTERÁPICO *T. cruzi* 12DH, 3 gotas via oral, durante 10 dias. Após 7 dias de intervalo, foram submetidos ao tratamento por mais 10 dias, de acordo com o esquema proposto por NASI *et al.* (1982), antes da infecção experimental, constituindo grupo **Bai** (Bioterápico antes da infecção).

Grupo 2: 16 camundongos, experimentalmente infectados por *T. cruzi*, receberam BIOTERÁPICO *T. cruzi* 12DH, 3 gotas via oral, durante 10 dias, de acordo com o esquema proposto por NASI *et al.* (1982), constituindo grupo **Bpi** (Bioterápico pós- infecção).

Grupo 3: 16 camundongos, experimentalmente infectados por *T. cruzi*, receberam *Phosphorus* 12 DH, 3 gotas via oral, durante 10 dias, constituindo grupo **Phosphorus**.

Grupo 4: 16 camundongos receberam soro fisiológico, durante 10 dias. Após 7 dias de intervalo foram submetidos ao tratamento por mais 10 dias, de acordo com o esquema proposto por NASI *et al.* (1982). Em seguida, foram experimentalmente infectados e submetidos ao tratamento com soro fisiológico, por via oral, durante mais 10 dias, constituindo grupo **Controle**.

Grupo 5: 16 camundongos não receberam nenhum tipo de tratamento e não foram submetidos à infecção experimental, constituindo grupo **Controle não-infectado (s/ infec.)**.

Parâmetros avaliados

- Avaliação da parasitemia (parasitas / mL de sangue) e do curso da infecção:

Os parâmetros avaliados relacionados à infectividade e virulência do parasita foram: parasitemias, parasitemia máxima, dia de parasitemia máxima, períodos de pré-patência e patência e taxa de mortalidade aos 42 dias pós-infecção. Para tal, decorridos cinco dias da infecção experimental, após detecção de formas tripomastigotas sanguíneas por exame direto, a cada dois dias, foi colhido sangue (5 microlitros), diretamente da extremidade da cauda de todos os animais pertencentes aos grupos experimentalmente infectados, para determinação da parasitemia, de acordo com a metodologia já descrita acima (Experimento 1).

- Avaliações hematológicas e sorológicas:

Aos 7, 14 e 42 dias após infecção experimental foram eutanasiados 4, 4 e 8 animais, respectivamente, de cada grupo experimental e colhido sangue total através de punção cardíaca. O sangue colhido destinou-se à determinação da leucometria global e específica (leucócitos / mm³ de sangue), e à obtenção de soro para realização de técnica de Imunofluorescência Indireta (CAMARGO, 1964). Objetivando a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG foram empregadas as seguintes diluições séricas: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128.

- Avaliação Histopatológica

O estudo histopatológico de órgãos e tecidos dos animais pertencentes aos grupos experimentais foi conduzido no Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF).

Para tal foram eutanasiados nos dias 0, 7, 14 e 42 pós-infecção, 4, 4, 4 e 8 animais de cada grupo experimental, respectivamente. Os seguintes órgãos e tecidos foram colhidos: coração, músculo esquelético, fígado, rins e intestinos grosso e delgado, os quais foram fixados em formalina *Millonig* e posteriormente processados da seguinte forma: desidratação sucessiva em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol puro, banho em parafina histológica e inclusão em parafina. Em seguida, os blocos contendo os órgãos foram submetidos a cortes de 5 µm em micrótomo e transferidos para lâminas, as quais foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e examinadas ao microscópio óptico (obj. 40x). O processo inflamatório observado durante as fases agudas e crônicas da infecção foi classificado como: infiltrado inflamatório discreto, moderado, intenso e sem alterações.

As preparações histológicas foram fotografadas com câmera digital (3,2 mega pixels), empregando-se zoom digital (3x).

3.4 Análise Estatística

Para a avaliação dos períodos de pré-patência e patência, entre os grupos experimentais, empregou-se Análise de Variância (ANOVA) e para a avaliação da taxa de mortalidade aos 42 dias pós-infecção, teste Qui-Quadrado. Para as demais variáveis: índices parasitêmicos, leucocitários e sorológicos, empregou-se o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do teste *Mann-Whitney* destinado à comparação de duas amostras independentes, quando indicado. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Para realização dos referidos testes estatísticos foi empregado o *software* SPSS 10.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Infecção Experimental de Camundongos por *Trypanosoma evansi*

4.1.1 Parasitemia e curso da infecção

De acordo com os resultados obtidos, em relação ao curso da infecção em camundongos tratados com bioterápico *T. evansi* antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente) e soro fisiológico dinamizado, antes e após infecção experimental por *T. evansi* (Controle), observou-se que não houve variação significativa em relação ao período pré-patente (Tabela 1). Após o período de pré-patência, os animais dos três grupos experimentais apresentaram aumento progressivo da parasitemia (Figura 3).

No presente trabalho, aos 10 dias pós-infecção, foram observados valores parasitêmicos de até $3,6 \times 10^9$ parasitas / mL de sangue (Figura 3), quando se realizou a eutanásia dos animais pertencentes aos grupos experimentais para obtenção de sangue destinado a avaliações hematológicas e sorológicas, visto que o aumento progressivo da parasitemia, sem ondas de remissão típicas das infecções por tripanosomas salivários (HERRERA, 1998; QUEIROZ et al., 2000), indicava que o curso da infecção seguia para o óbito. Embora o grupo experimental Bpi tenha apresentado índices parasitêmicos menores, em relação a Bai e Controle, nos dias 07, 08 ($p < 0,05$), 09 e 10 p.i. (Figura 4), a variação observada foi atribuída ao fato de que 01 animal do grupo Bpi apresentou curso da infecção atípico em relação aos animais dos demais grupos, apresentando parasitemia patente apenas aos 14 dias pós-infecção. Assim, apesar da referida variação observada em relação às parasitemias, em geral, não houve variação entre os grupos experimentais, quanto ao curso da infecção, uma vez que o aumento progressivo da parasitemia indicava que a infecção seguia para o óbito de todos os animais.

MENEZES et al (2004) estudaram o comportamento biológico de isolados de *T. evansi*, entre estes, o mesmo isolado empregado no presente trabalho (isolado obtido de quati naturalmente infectado) em camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados. Os autores observaram que a maioria dos animais infectados apresentou aumento progressivo da parasitemia até 10^9 parasitas / mL de sangue, sem apresentar ondas de remissão, característica da infecção por *T. evansi* em outras espécies. Todos os isolados estudados se apresentaram extremamente virulentos para as linhagens de camundongos estudadas, sendo observado 100% de mortalidade. Os autores observaram que morte dos camundongos ocorria quando a parasitemia alcançava 10^8 - 10^9 parasitas / mL de sangue.

Tabela 1. Médias dos períodos pré-patentes de camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção experimental por *T. evansi* (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle).

	Bai (n=08)	Bpi (n=10)	Controle (n=06)
PPP (dias)	7,3 ± 0,71	8,5 ± 2,13	7,5 ± 0,55

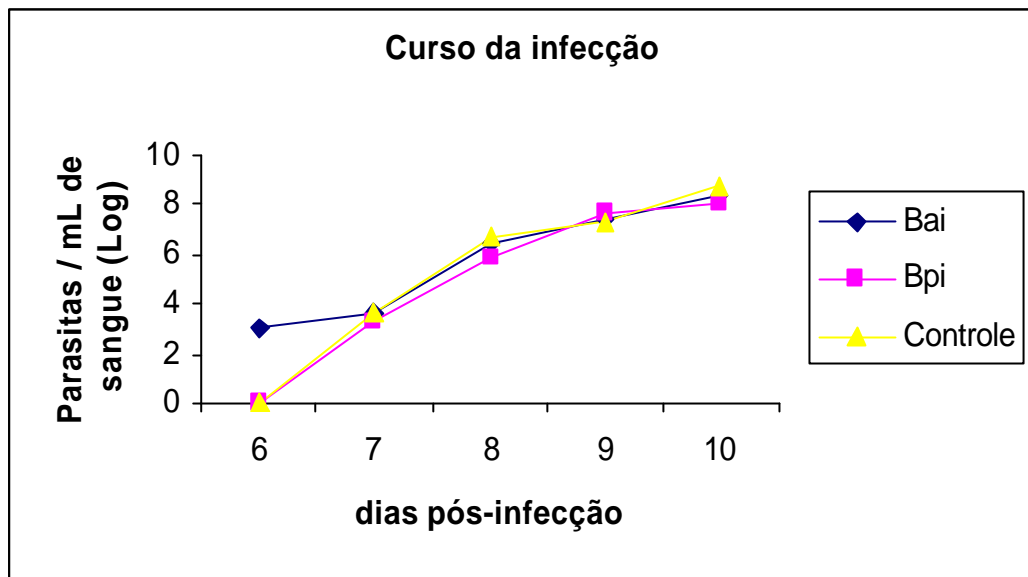


Figura 3. Curso da infecção experimental por *T. evansi* em camundongos C57BL/6 tratados com bioterápico antes e após infecção experimental (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle). Log das médias de parasitemias observadas nos grupos experimentais.

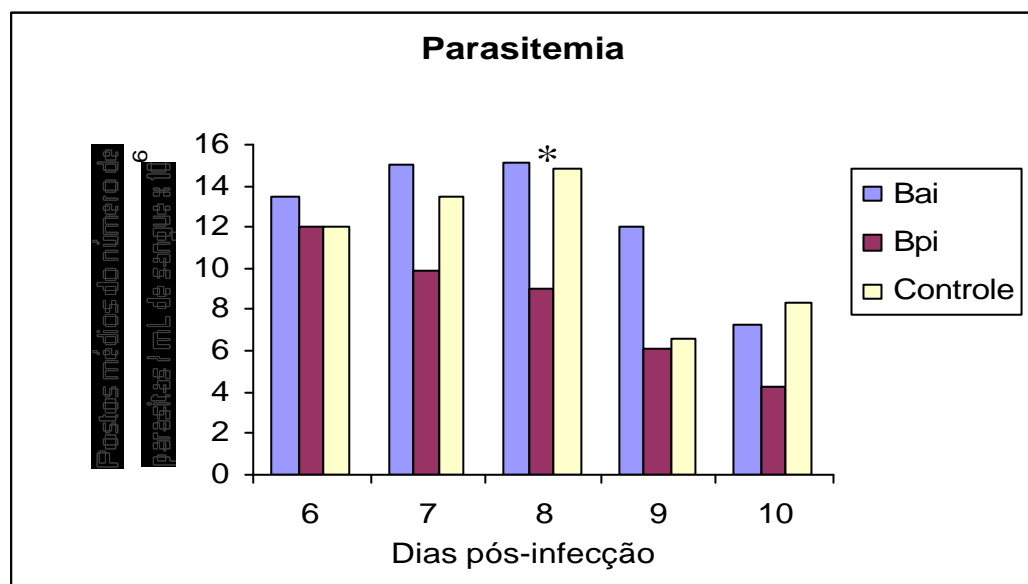


Figura 4. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores parasitêmicos, entre os grupos de tratamento, após infecção experimental por *T. evansi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção experimental (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle). * Significância estatística. *Kruskal-Wallis Test*.

4.1.2 Parâmetros hematológicos

De acordo com os resultados das avaliações hematológicas realizadas em camundongos tratados com bioterápico e soro fisiológico dinamizado, antes e após infecção experimental por *T. evansi* (Bai, Bpi e Controle), observa-se que não houve variação significativa em relação aos valores de: hematócrito, hematimetria, leucometria global (Tabela 2) e específica (Figura 5), embora tenham sido registradas menores médias de leucócitos e menores valores absolutos de neutrófilos e linfócitos no grupo controle, em relação a Bai e Bpi.

No presente trabalho, observou-se que os valores de hematócrito dos animais se apresentaram abaixo dos valores de referência ($49,6\% \pm 5,0$), entretanto, os valores da hematimetria se apresentaram compreendidos entre valores de referência ($5,0$ a $8,0 \times 10^6 / \text{mm}^3$ de sangue). A anemia é uma característica importante na patogenia da infecção por *T. evansi* (HOARE, 1972; MENEZES et al. 2004; HERRERA et al. 1998), embora, sua patogênese não tenha sido completamente elucidada.

Observa-se que os valores da contagem global de leucócitos se apresentaram abaixo dos valores de referência ($4,0 \pm 1,0 \times 10^3$ leucócitos / mm^3 de sangue), caracterizando imunossupressão determinada pela infecção experimental. A imunossupressão associada à infecção experimental por tripanosomas patogênicos tem sido relacionada à ação de metabólitos liberados pelo parasita e à imunomodulação causada pelo mesmo, buscando escapar da resposta imune do hospedeiro (ZAMBRANO et al. 2002; SIZEMORE e MANSFIELD, 1984). Menezes et al. (2004) observaram que a leucocitose não pode ser correlacionada com a maior ou menor resistência do hospedeiro.

Tabela 2. Médias de parâmetros hematológicos, aos 10 dias p.i., em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção experimental por *T. evansi* (Bai e Bpi, respectivamente) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle).

	Bai (n=08)	Bpi (n=10)	Controle (n=06)
Hematócrito (%)	37 ± 3	35 ± 9	38 ± 5
Hematimetria ($\times 10^4 / \text{mm}^3$ de sangue)	845 ± 101	805 ± 245	860 ± 127
Leucometria global (leucócitos / mm^3 de sangue)	2775 ± 693	2705 ± 1354	1996 ± 1220

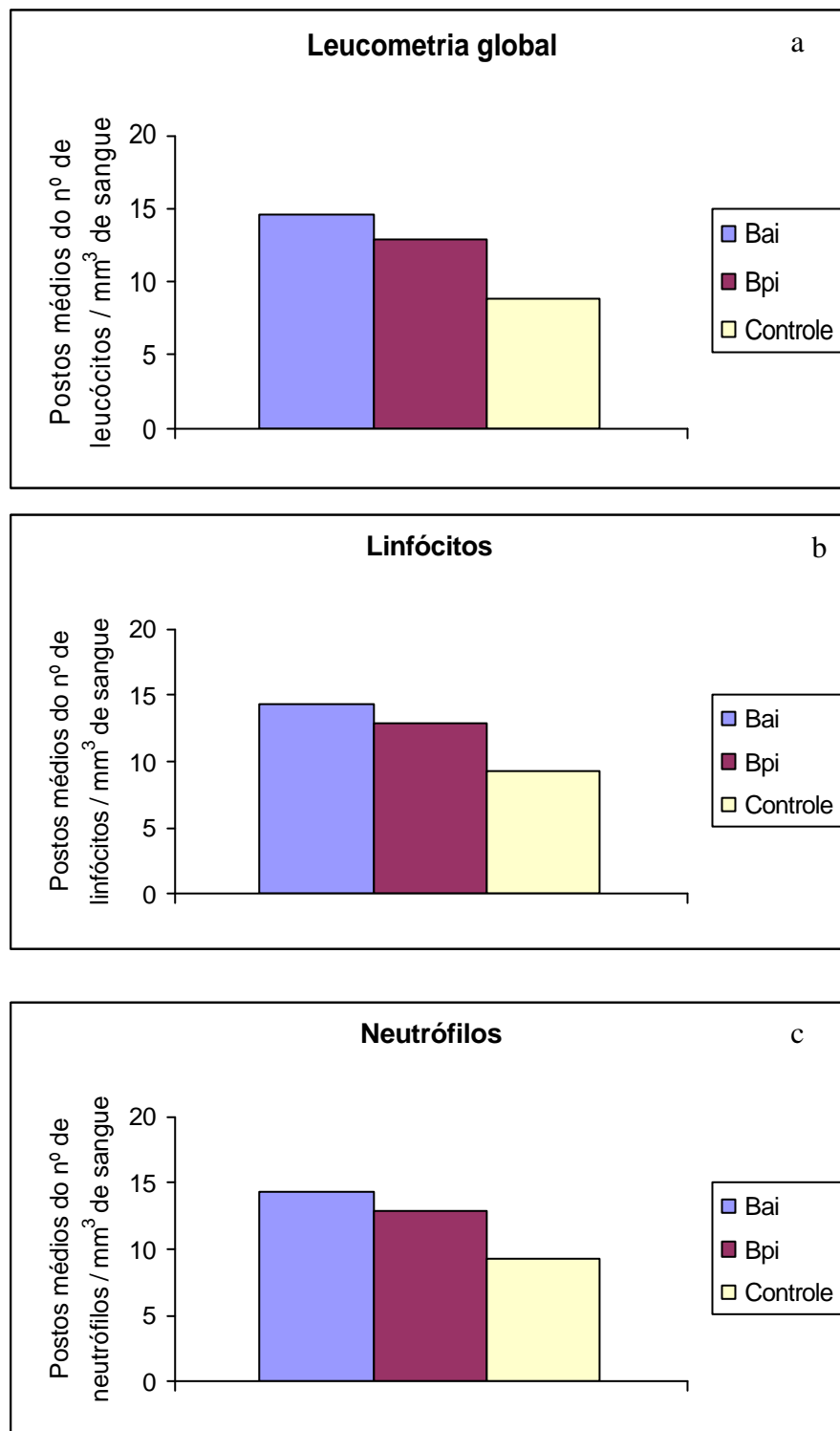
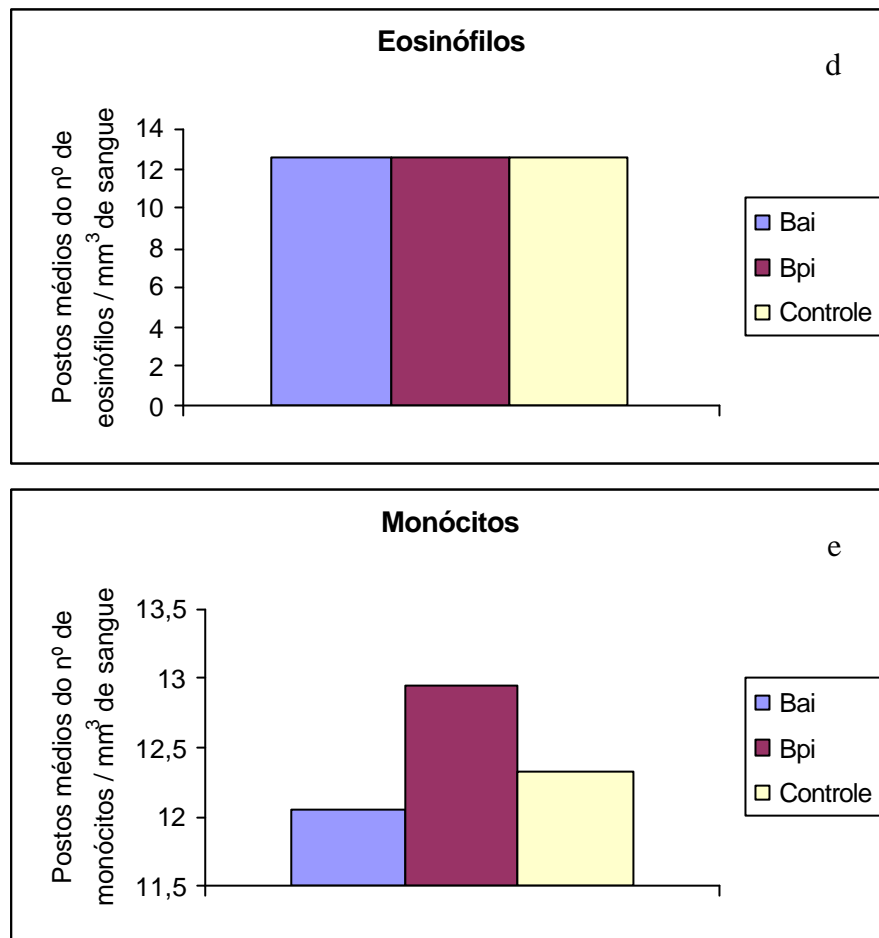


Figura 5. Postos médios (*Mean Rank*) dos resultados do leucograma realizado em camundongos tratados com bioterápico antes da infecção (Bai), após infecção (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após infecção experimental por *T. evansi* (Controle). (a) Contagem global de leucócitos. (b) Valores absolutos de linfócitos. (c) Valores absolutos de neutrófilos. (d) Valores absolutos de eosinófilos. (e) Valores absolutos de monócitos. *Kruskal-Wallis Test*. ‘continua’.



‘Figura 5. continuação’.

4.1.3 Resposta imune humoral

De acordo com os resultados da avaliação da resposta imune humoral, através de Reação de Imunofluorescência Indireta, observou-se que não houve variação significativa entre os grupos experimentais, em relação aos títulos de IgM e IgG (Figura 6), assim como em relação ao número de animais reagentes (Tabela 3). Observou-se que a resposta imune humoral, expressa pelos níveis de anticorpos IgM e IgG, em geral, foi baixa, apenas 01 animal do grupo Bpi, o qual apresentou curso da infecção atípico em relação aos demais, apresentou título maior que 1:8.

A importância da resposta imune humoral no controle da população parasitária circulante nas infecções por tripanosomas salivários é reportada por vários autores, sendo descrita em infecções experimentais (FRANKE et al., 1994; HERRERA, 1998) e naturais (BRANDÃO et al., 2002), embora Menezes et al. (2004) não tenham observado correlação entre título sorológico de IgG e tempo de sobrevivência ou capacidade de controlar a parasitemia.

Nas condições do presente trabalho, observou-se que a elevada virulência da infecção, expressa por elevadas parasitemias e curso hiper agudo, reflete, provavelmente a baixa produção de imunoglobulinas, visto o custo orgânico de uma resposta imune humoral, em um curso infeccioso extremamente agudo e grave.

Menezes et al. (2004) observaram que isolados de *T. evansi* se apresentaram virulentos para camundongos da linhagem C57BL/6 e concluíram que a infecção experimental de camundongos constitui modelo apropriado para estudar aspectos relacionados à patogenia da infecção por *T. evansi*. Entretanto, no presente trabalho, observa-se que o referido modelo experimental pode não ter sido adequado para se estudar os efeitos imunomodulares de

bioterápico homeopático, uma vez que a infecção apresentou curso hiper agudo, seguindo, invariavelmente, para o óbito, ou seja, pode não ter decorrido tempo suficiente para instalação de resposta imune específica efetora.

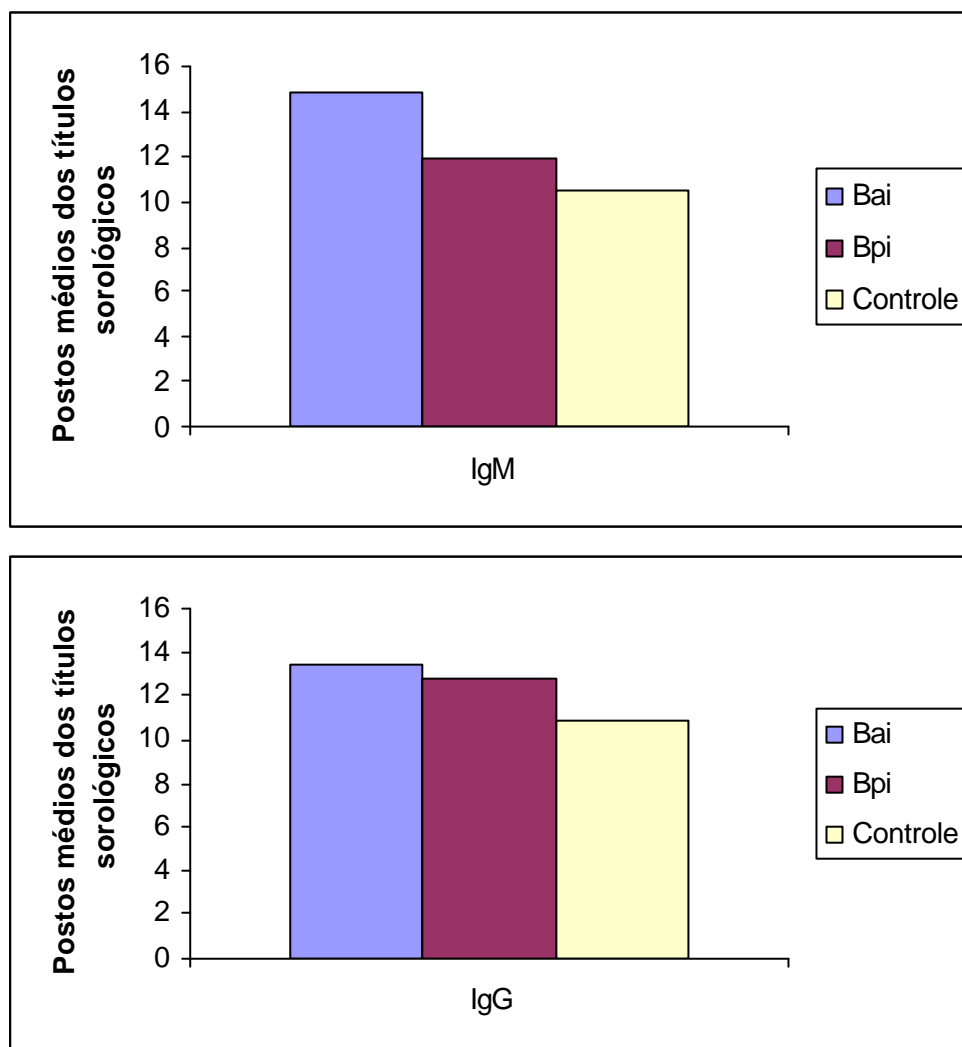


Figura 6. Postos médios (Mean Rank) dos títulos de anticorpos IgM e IgG, aos 10 dias pós-infecção experimental por *T. evansi*, em camundongos tratados com bioterápico antes da infecção (Bai), após infecção (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após infecção (Controle). *Kruskal Wallis Test*.

Tabela 3. Títulos de anticorpos IgG e IgM, aos 10 dias p.i., em soros de camundongos tratados com bioterápico antes da infecção (Bai), após infecção (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle) antes e após infecção experimental por *T. evansi* (Controle).

Bai		Bpi		Controle	
IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
neg	neg	1:4	neg	neg	neg
neg	neg	neg	neg	neg	neg
1:8	1:4	neg	neg	neg	neg
1:4	1:8	neg	neg	1:4	neg
neg	neg	neg	neg	neg	neg
neg	neg	1:4	neg	neg	neg
1:4	1:4	neg	neg	-	-
neg	neg	neg	neg	-	-
-	-	neg	neg	-	-
-	-	1:64	1:64	-	-

- soros excluídos da análise (animais não apresentaram parasitemia patente).

4.2 Imunização de Camundongos com Extrato de *Trypanosoma evansi*

Conforme descrito, não foram observados efeitos profiláticos ou terapêuticos em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção experimental por *T. evansi*, o que pôde ser atribuído ao fato deste modelo não se adequar ao estudo de uma possível atividade imunomoduladora do bioterápico. Assim, foi proposta a inoculação de extrato bruto de *T. evansi* (imunização) em camundongos tratados com bioterápico homeopático antes (Bai) e após (Bpi) imunização, objetivando avaliar possível efeito imunomodulador do tratamento.

4.2.1 Resposta leucocitária

De acordo com os resultados obtidos, observou-se variação significativa do valor global de leucócitos, entre os grupos experimentais, aos 07 e 52 dias pós-imunização (Figura 7). Aos 07 dias p.i., observou-se que o grupo experimental Bai apresenta valor superior ($p=0,05$) em relação ao Bpi, e tendência a ser mais elevado em relação ao controle ($p=0,07$). Aos 52 dias pós-imunização, observou-se que os grupos Bai e Controle apresentaram valores significativamente superiores, em relação ao Bpi ($p=0,05$ e $0,046$, respectivamente). Observou-se que, exceto aos 52 dias p.i., em geral, o grupo Bai apresentou número de leucócitos mais elevado, em relação ao controle, mesmo no dia 0 p.i., o que poderia estar associado ao tratamento prévio com o antígeno ultradiluído (bioterpico).

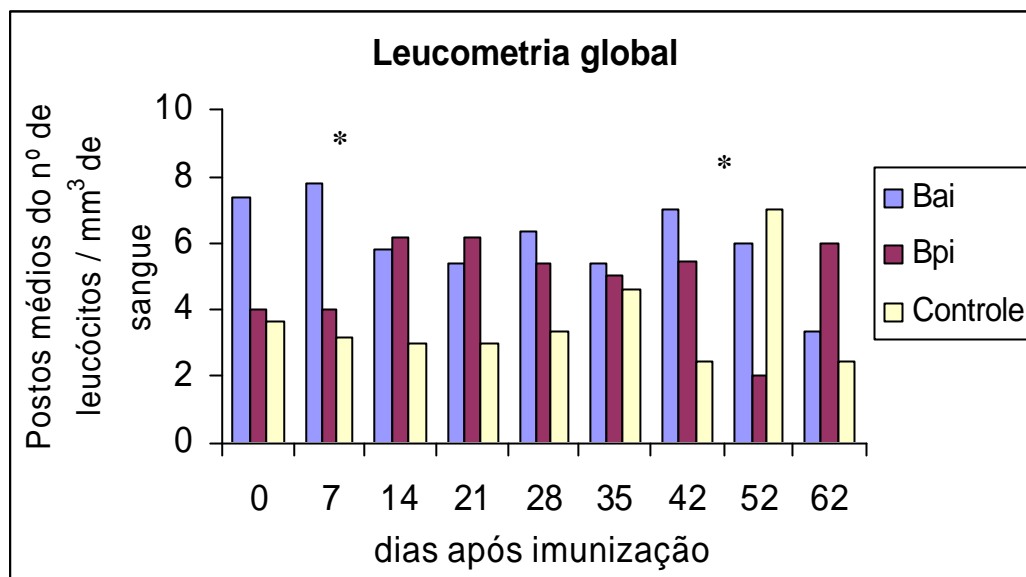


Figura 7. Postos médios (*Mean Rank*) dos valores globais de leucócitos, em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de *T. evansi* (Controle).

* Significância estatística. *Kruskal-Wallis Test*.

Aos 7 dias pós-imunização, observou-se que Bai apresentou número de linfócitos significativamente superior, em relação ao Bpi e Controle ($p=0,05$ e $p=0,05$, respectivamente) (Figura 8). Aos 52 dias, o grupo Bai e Controle apresentaram número de linfócitos significativamente superiores, quando comparados a Bpi ($p=0,05$ e $p=0,05$, respectivamente). Observou-se que, em geral, Bai e Bpi apresentaram valores de linfócitos superiores, quando comparado ao grupo controle, exceto aos 52 dias pós-infecção.

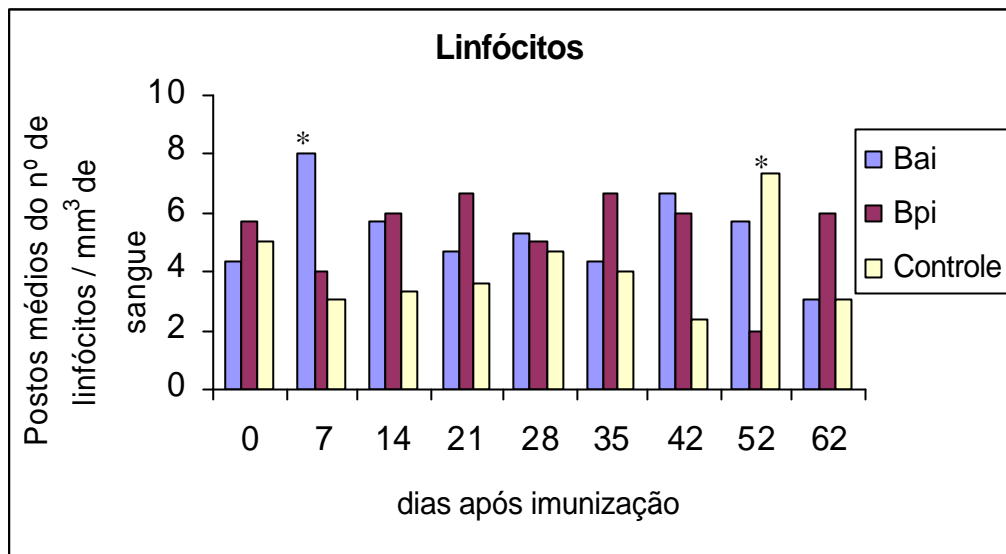


Figura 8. Postos médios (*Mean Rank*) dos valores globais de linfócitos, em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle) antes e após imunização com extrato de *T. evansi*.
* Significância estatística. *Kruskal-Wallis Test*.

Em relação ao número de neutrófilos (Figura 9), observou-se que aos 42 dias pós-imunização, os grupos Bai e Bpi apresentaram valores significativamente superiores ($p=0,05$ e $p=0,05$, respectivamente), quando comparados ao Controle. Aos 52 dias observou-se que Bai e Controle apresentaram número de neutrófilos significativamente maior em relação a Bpi ($p=0,05$, $p=0,05$, respectivamente). Observou-se que, em geral, Bai e Bpi, apresentaram valores de neutrófilos mais elevados em relação ao controle, exceto aos 52 dias p.i.

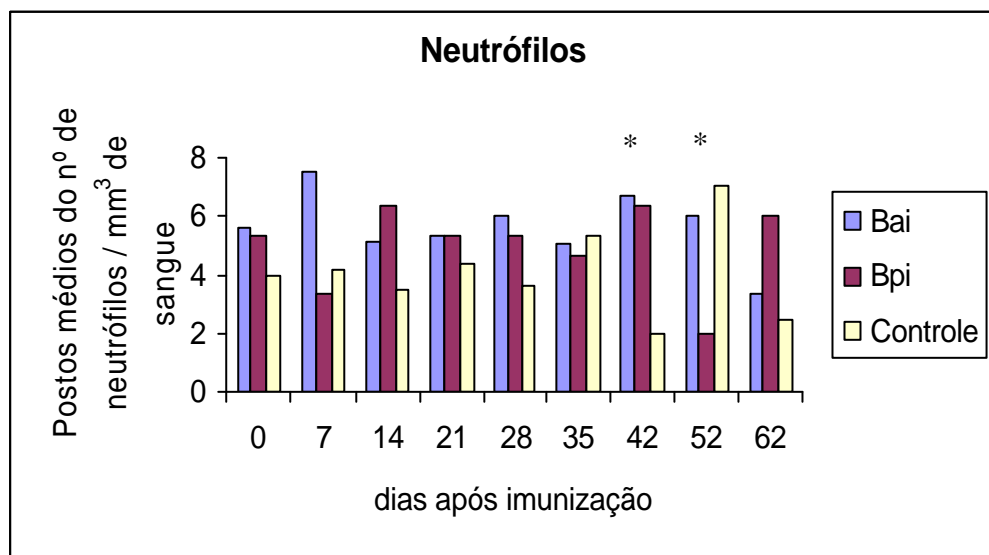


Figura 9. Postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de neutrófilos, em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado (Controle) antes e após imunização com extrato de *T. evansi*.
* Significância estatística. *Kruskal-Wallis Test*.

Em relação ao número de eosinófilos (Figura 10), não foi observada variação entre os grupos de tratamento.

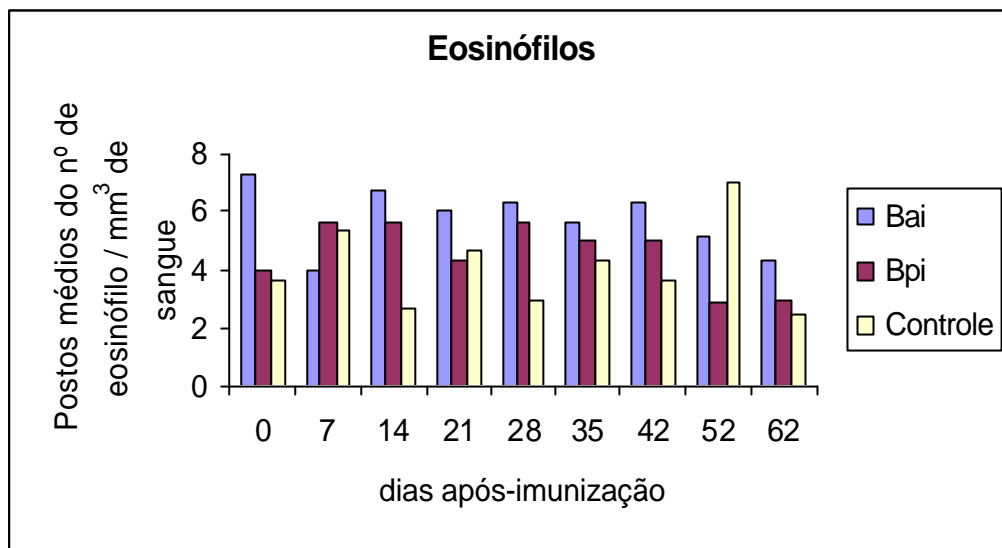


Figura 10. Postos médios (*Mean Rank*) valores absolutos de eosinófilos, em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de *T. evansi* (Controle). *Kruskal-Wallis Test*.

Aos 21 dias pós-imunização, observou-se que o grupo Bpi apresentou número de monócitos (Figura 11) significativamente mais elevado em relação ao Controle ($p=0,46$). Observou-se que, em geral, os grupos Bai e Bpi apresentaram número de monócitos superiores, quando comparados ao controle, exceto aos 52 e 62 dias pós-imunização.

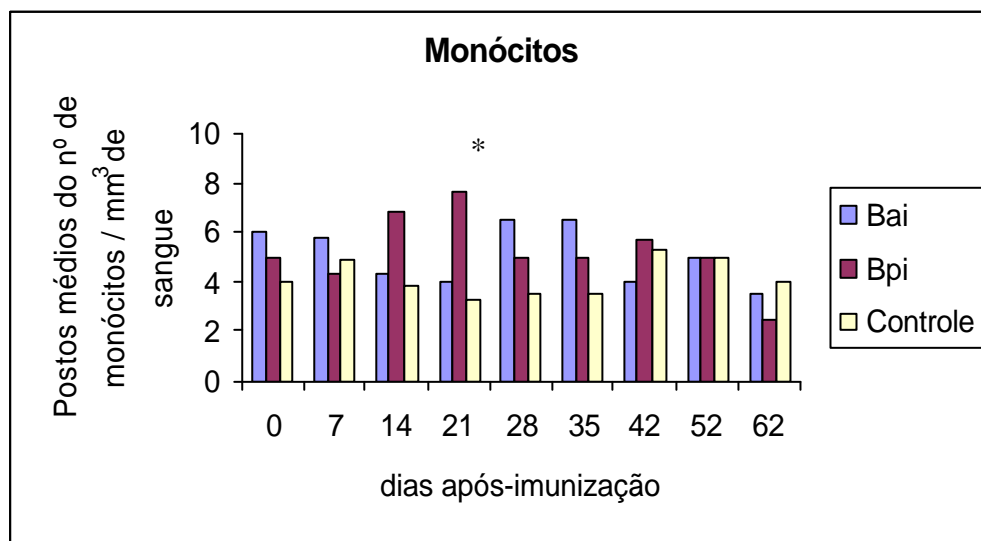


Figura 11. Postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de monócitos, em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e, tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de *T. evansi* (Controle).

* Significância estatística. *Kruskal-Wallis Test*.

4.2.2 Resposta imune humoral

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que, aos 28 dias pós-imunização, o grupo experimental Bpi, apresentou títulos sorológicos de IgG significativamente superiores ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo Controle (Figura 12, Tabela 4). Em geral, observou-se que o grupo Bpi apresentou títulos superiores, quando comparado ao Controle, aos 14, 21, 28 ($p < 0,05$), 35, 52 e 62 dias pós-imunização. Nos grupos Bai e Bpi foram observados títulos sorológicos de até 1:128, enquanto no controle apenas até 1:64 (Tabela 4). Não foram observadas variações significativas entre os grupos em relação aos títulos sorológicos de IgM.

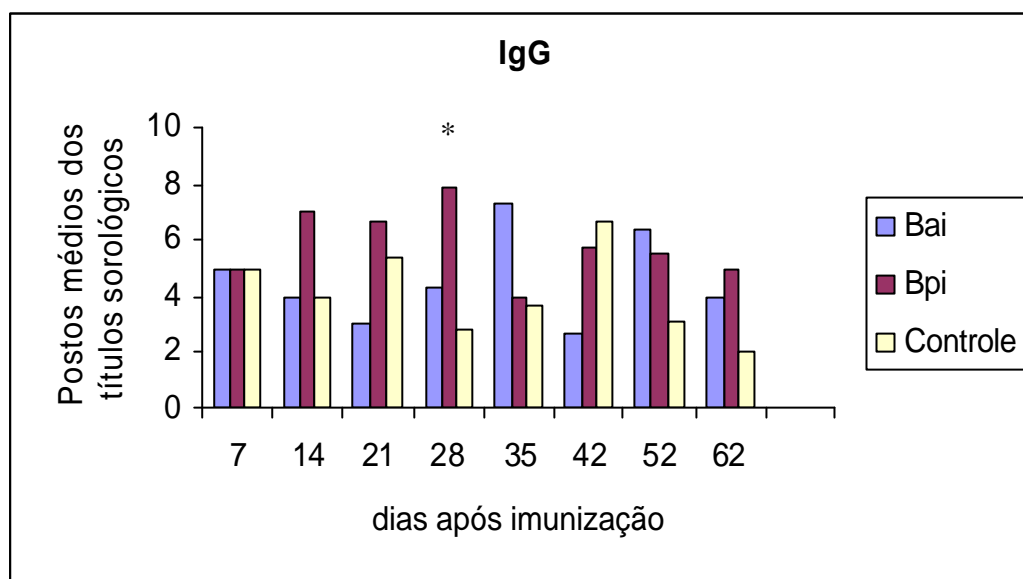


Figura 12. Postos médios (*Mean Rank*) dos títulos sorológicos de IgG, em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de *T. evansi* (Controle).

* Significância estatística. *Kruskal-Wallis Test*.

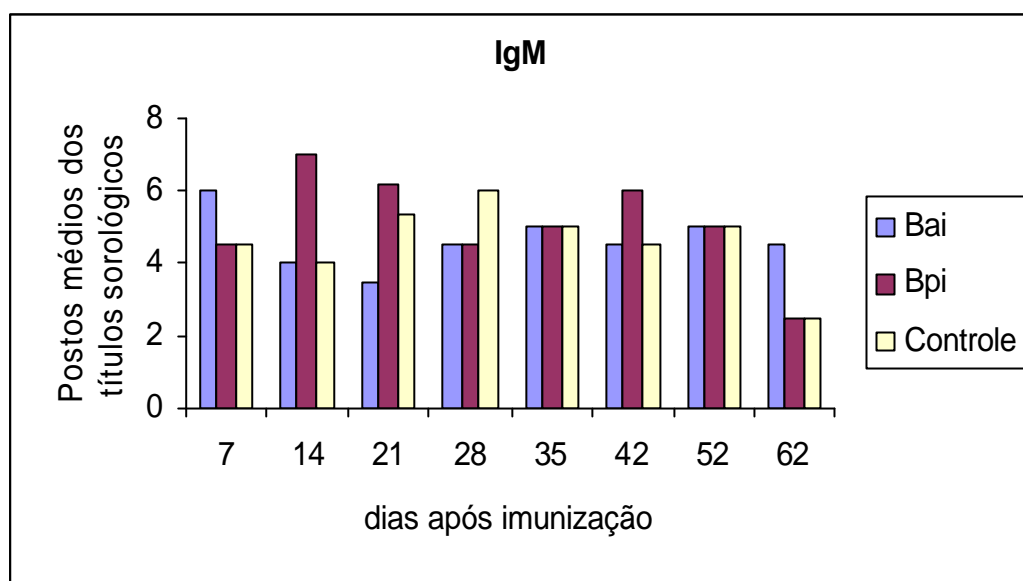


Figura 13. Postos médios (*Mean Rank*) dos títulos sorológicos de IgM, em camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de *T. evansi* (Controle) *Kruskal-Wallis Test*.

Tabela 4. Títulos de anticorpos IgG em soros de camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de *T. evansi* (Controle). * Significância estatística.

Grupos de tratamento	dias após imunização							
	7	14	21	28	35	42	52	62
Bai	neg	neg	neg	1:16	1:128	neg	1:128	1:32
	neg	neg	neg	neg	1:64	1:16	1:128	1:128
	neg	neg	neg	1:32	1:16	1:16	1:32	1:128
Bpi	neg	neg	neg	1:32*	1:8	1:64	1:128	1:128
	neg	1:4	1:64	1:64*	1:32	1:64	1:32	-
	neg	1:4	1:16	1:64*	1:4	1:8	1:64	-
Controle	neg	neg	1:8	neg	1:32	1:32	1:4	1:8
	neg	neg	neg	1:16	neg	1:64	1:64	1:64
	neg	neg	1:8	neg	1:8	1:64	1:32	-

- sem amostras para análise

Tabela 5. Títulos de anticorpos IgM, em soros de camundongos tratados com bioterápico antes da imunização (Bai), após imunização (Bpi) e tratados com soro fisiológico dinamizado antes e após imunização com extrato de *T. evansi* (Controle).

Grupos de tratamento	dias após imunização							
	7	14	21	28	35	42	52	62
Bai	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1:4
	1:4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1:4
Bpi	neg	neg	neg	neg	neg	1:4	neg	neg
	neg	1:4	1:4	neg	neg	neg	neg	-
	neg	1:4	1:4	neg	neg	neg	neg	-
Controle	neg	neg	1:8	neg	neg	neg	neg	neg
	neg	neg	neg	1:16	neg	neg	neg	neg
	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-

- sem amostras para análise

Observou-se que, em geral, os grupos Bai e Bpi apresentaram valores mais elevados em relação ao número global de leucócitos e valores absolutos de linfócitos, neutrófilos e monócitos, em relação ao Controle, exceto aos 52 dias pós-imunização. Além disso, maiores títulos de IgG foram observados nos grupos Bai e Bpi, embora significância estatística tenha sido observada apenas aos 28 dias pós-imunização, para Bpi em relação ao controle. A observação de que logo após a 1ª imunização, aos 7 dias p.i., o grupo previamente tratado com bioterápico 12DH tenha apresentado número de linfócitos superior ($p < 0,05$) em relação a Bpi e Controle, sugere imunomodulação devido ao tratamento prévio. Entretanto, de acordo com os resultados, não é possível distinção clara entre os resultados de Bai e Bpi, sugerindo que ambos os tratamentos modularam a resposta à imunização. Assim, novos estudos devem ser realizados, para que sejam avaliados os mecanismos específicos, os quais seriam determinantes de imunomodulação em ensaios envolvendo tratamento com bioterápico ultradiluído.

Weissman et al. (1992) observaram em seus estudos, que a administração de antígenos ultradiluídos é capaz de determinar modulação da resposta imune quando, posteriormente, o organismo for exposto ao referido antígeno. Os autores procederam a imunização com antígeno KLH (*hemocyanin*) em camundongos previamente tratados com o mesmo antígeno ultradiluído (7CH e 15CH) por via oral ou por via parenteral e observaram modulação da resposta imune específica humoral (IgG) e celular ao referido antígeno, mesmo quando empregada diluição acima do número de Avogrado, neste caso, 15CH.

4.3 Infecção Experimental de Camundongos por *Trypanosoma cruzi*

4.3.1 Estudo das imagens clínica e repertorial homeopáticas

Os sintomas da infecção por *T. cruzi* no homem e no modelo murino, citados na literatura, podem ser transcritos para as rubricas repertoriais as quais representam as imagem clínica e repertorial da infecção (quadro 1). A repertorização matemática destas rubricas resultou nos medicamentos apresentados (tabela 6), tendo sido selecionados 11 medicamentos, ordenados por cobertura dos sintomas e pontuação final. Observa-se que o medicamento homeopático *Phosphorus* representou a imagem repertorial da infecção por *T. cruzi*, cobrindo maior número de sintomas e alcançando maior pontuação.

A imagem patogênica do medicamento *Phosphorus* o associa aos indivíduos enfraquecidos pela perda de fluidos corporais, emagrecidos, desanimados e subitamente prostrados. Há presença de hemorragias decorrentes de ações irritativas, inflamatórias e degenerativas, com conseqüente comprometimento de vasos sanguíneos (BOERICKE, 1997). Tais aspectos caracterizam o *Phosphorus* como um medicamento da diátese sifilínica (CARILLO Jr., 2000). De acordo com Andrade et al. (2005), as características clínicas e histopatológicas da Doença de Chagas podem ser explicadas e melhor entendidas pela teoria da diátese sifilínica de Carillo Jr. (2000). Em seus estudos sobre a origem diatésica da Doença de Chagas, Andrade et al. (2005) observaram relação estatisticamente significativa entre Diátese Sifilínica e Doença de Chagas. De acordo com os referidos autores, esta observação possibilita a adoção de novas medidas profiláticas e terapêuticas que favoreçam melhor prognóstico, através do tratamento homeopático diatésico.

Quadro 1. Rubricas Repertoriais dos sintomas da infecção por *T. cruzi* citados na literatura. Imagem clínica da infecção por *T. cruzi* no homem e no modelo murino.

Seção	Rubrica	Sub-rubrica
Peito	<i>congestão coração</i>	
Peito	inflamação coração	
Peito	<i>inflamação coração</i>	<i>miocárdio</i>
Peito	afecções coração	
Peito	<i>afecções coração</i>	<i>crônicas</i>
Peito	dilatação coração	
Abdome	<i>aumentado baço</i>	
Abdome	inchação baço	
Garganta	<i>inflamação esôfago</i>	
Cabeça	inflamação cérebro	
Generalidades	<i>inflamação gânglios</i>	
Generalidades	inflamação músculos	

Tabela 6. Resultado da repertorização matemática das rubricas representativas da imagem clínica da infecção por *T. cruzi* no homem e no modelo murino experimental. Medicamentos ordenados por cobertura de sintomas e pontuação final.

Medicamentos	Cobertura	Pontos
PHOSPHORUS	10	20
ACON	7	17
ARS	7	14
IOD	7	13
PULS	7	13
SULPH	7	8
LACH	6	12
BRY	6	11
NAT-M	6	11
NUX-V	6	11
KALI-I	6	07

4.3.2 Parasitemia e curso da infecção

A partir do quinto dia pós-infecção experimental por *T. cruzi*, formas tripomastigotas sanguíneas foram detectadas no sangue dos animais infectados. Os resultados referentes aos períodos de pré-patência, patência, taxa de mortalidade aos 42 dias p.i. e dias p.i. em que ocorreu o óbito, para os grupos experimentalmente infectados, estão apresentados na tabela 7. De acordo com os resultados observou-se que não houve variação significativa entre os grupos, em relação ao período pré-patente. Em relação ao período de patência, observou-se que o grupo Bai apresentou valor significativamente menor em relação aos demais grupos ($p=0,026$). Os percentuais referentes à taxa de mortalidade aos 42 dias pós-infecção não variaram significativamente, porém, observou-se um menor percentual de mortalidade no grupo Bai em relação ao Controle, e no grupo *Phosphorus* em relação aos demais grupos, sendo o grupo Controle o qual apresentou maior índice de mortalidade.

Tabela 7. Valores médios dos períodos de pré-patência, patência e taxa de mortalidade aos 42 dias pós-infecção de camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados por *T. cruzi*, tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle).

Grupo Experimental	Pré-patência (dias)	Patência (dias)	Mortalidade aos 42 dias p.i.		
			(%)	valores	dias p.i.
Bai	5,0 ± 0,0	11,0 ± 3,5 *	12,5	1/8	13
Bpi	5,2 ± 0,8	16,4 ± 4,8	37,5	3/8	14±3
Phosphorus	5,3 ± 0,8	19,8 ± 2,9	0,0	0/8	-
Controle	5,5 ± 2,1	17,5 ± 7,5	42,8	3/7	21±7

* Estatisticamente significativo (ANOVA, 5% sig.).

Não foi detectada variação significativa entre os grupos experimentais em relação ao dia de parasitemia máxima (DMP), todos os grupos infectados apresentaram, em média, pico parasitêmico (máximo de parasitemia) aos 7 dias pós-infecção experimental (Figura 16). Em seguida, observou-se variação dos valores de parasitemia até o estabelecimento da parasitemia subpatente (figura 14). Os valores dos postos médios da parasitemia de cada grupo, assim como as variações significativas entre os grupos, em diferentes dias pós-infecção, estão apresentados na figura 15.

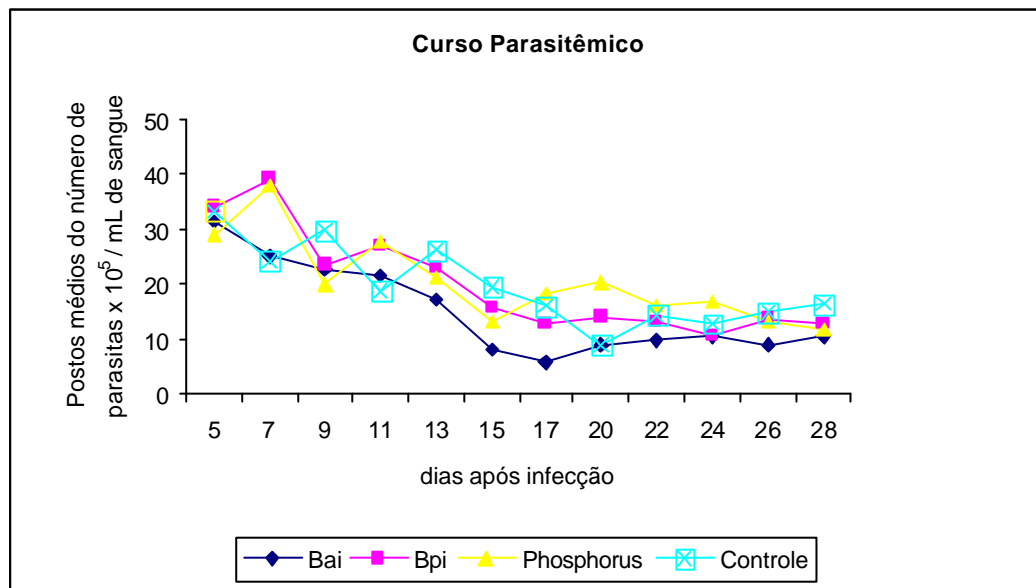


Figura 14. Curso da infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle). Postos médios (*Mean Rank*) dos valores de parasitemia. *Kruskal-Wallis Test*.

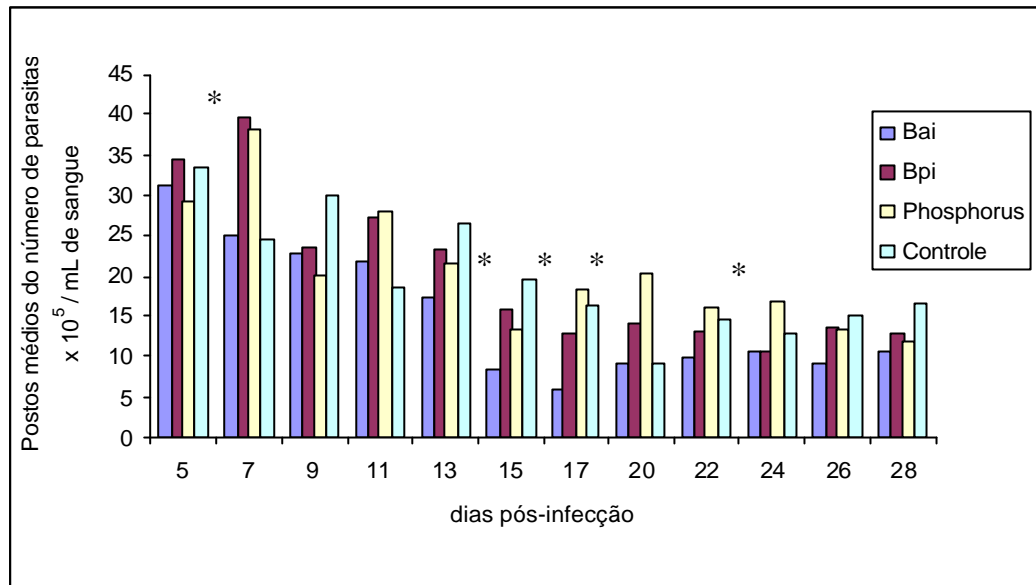
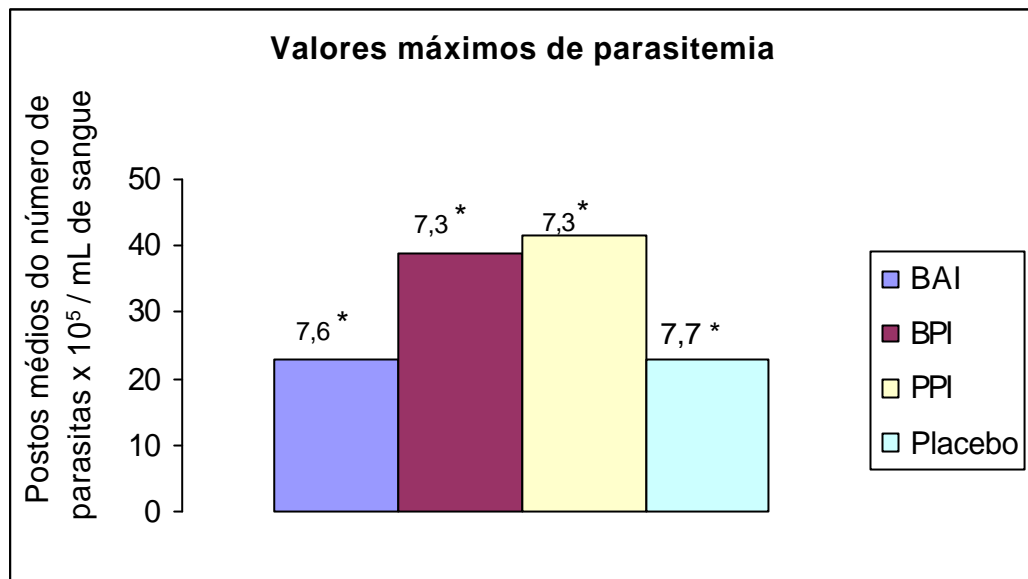


Figura 15. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores parasitêmicos, após infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle). Postos médios (*Mean Rank*) dos valores de parasitemia. *Significância estatística. *Kruskal-Wallis Test*.

Observou-se que o grupo Bai apresentou valores de parasitemia menores em relação ao Controle nos dias 09, 13, 15 ($p < 0,05$), 17 ($p < 0,05$), 22, 24 e 28 dias pós-infecção. Os animais pertencentes ao grupo *Phosphorus* apresentaram, em média, período de patência mais longo em relação aos demais grupos, assim como parasitemias mais elevadas nos dias 7 ($p = 0,05$) e 20 p.i. ($p < 0,05$) em relação ao Controle e, nos dias 07 ($< 0,05$), 17 ($< 0,05$), 20 ($< 0,05$), e 24 p.i. ($< 0,05$) em relação ao Bai. Observa-se também maior valor de parasitemia máxima no grupo *Phosphorus* em relação ao Controle ($p < 0,05$) (Figura 16). Entretanto, não foi observado nenhum óbito no grupo *Phosphorus*. De acordo com Brener et al. (2000), a mortalidade de camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* é um efeito tanto do parasita quanto da própria resposta imune do hospedeiro. A excessiva multiplicação parasitária no organismo do hospedeiro pode levar à morte animais susceptíveis. A sobrevivência de 100% observada no grupo tratado com medicamento *Phosphorus*, embora sem significância estatística, sugere uma ação sobre a resistência do hospedeiro à multiplicação excessiva do parasita, visto que todos os animais atingiram a fase crônica da infecção, apesar das elevadas parasitemias. De acordo com Hunter et al. (1997), elevadas parasitemias associadas à reduzida mortalidade em camundongos infectados por *T. cruzi*, pode indicar ação regulatória e anti-inflamatória, ou efeito sobre o balanço entre mediadores pró e anti-inflamatórios. De acordo com Brener et al. (2000) pode-se dizer que ‘uma fase aguda leve não é necessariamente seguida de uma fase crônica atenuada’, visto que os mediadores inflamatórios os quais poderiam deter efetivamente a multiplicação dos parasitas na fase aguda da infecção, determinando reduzidas parasitemias, teriam efeitos lesionais para os tecidos orgânicos na fase crônica da infecção. Daí a necessidade de modular a resposta orgânica à infecção.



* dia de parasitemia máxima pós-infecção.

Figura 16. Postos médios (*Mean Rank*) dos valores máximos de parasitemia, após infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle). *Kruskal-Wallis Test*.

De acordo com Dias et al. (1997); Storino et al. (1994) ‘citado por’ Brener et al. (2000), o período de parasitemia patente, o qual compreende os valores máximos de parasitemia, com multiplicação de parasitos, caracteriza a fase aguda infecção. O período sub-patente, estabelecido após redução da parasitemia caracteriza a fase crônica da infecção.

Observa-se, em relação à mortalidade dos animais, que independente do grupo experimental, os óbitos ocorreram na fase aguda, ou seja, quando ainda eram detectadas formas tripomastigotas sanguíneas circulantes por exame direto.

A multiplicação exagerada do parasita no hospedeiro pode levar à morte animais susceptíveis: esse efeito é prevenido por citocinas pró-inflamatórias do tipo 1 (IL-12, TNF- α e IFN- γ). No entanto, em situações em que certas cepas do parasita infectam hospedeiro resistente, a mortalidade é prevenida por uma combinação dos efeitos antiparasitários de citocinas tipo 1 com os efeitos antagônicos que citocinas regulatórias anti-inflamatórias, como TGF- β e a IL-10, exercem sobre as primeiras. As citocinas do tipo 1 são “armas de dois gumes”, sendo necessárias para controlar o parasitismo, mas exercendo também efeitos tóxicos letais para o hospedeiro, se produzidas em excesso. Dessa forma, o escape do parasita a esse primeiro nível de ataque poderia ser uma necessidade para a manutenção da integridade dos tecidos do hospedeiro (BRENER et al. 2000).

De acordo com os resultados, sugere-se que o tratamento prévio à infecção experimental com bioterápico modulou a resposta imune do hospedeiro controlando melhor a parasitemia. Entretanto, devem ser estudados e esclarecidos os mecanismos específicos os quais estariam envolvidos neste processo, como por exemplo, se a administração de antígenos ultradiluídos de *T. cruzi* poderia ter efeito sobre os anticorpos líticos, visto que é sabido até o momento que estes são capazes de reagir somente com formas vivas de *T. cruzi* e desempenham papel importante na proteção do hospedeiro (KRETTLI e BRENER, 1982).

Toledo et al. (2004) avaliaram os efeitos da quimioterapia com Benzinidazol e Itraconazol sobre parâmetros parasitológicos e histopatológicos de camundongos infectados

por diferentes clones de *T. cruzi*, obtendo diferentes resultados. Os autores afirmaram que a diversidade filogenética entre os clones deve ser considerada quando a quimioterapia for empregada. Assim, a possibilidade de emprego de bioterápico com o medicamento feito a partir do sangue individual do paciente infectado, deve ser considerada, uma vez que a reposta do hospedeiro pode influenciar a resposta ao tratamento específico (TOLEDO et al. 2004; FERRAZ, 2005).

4.3.3 Resposta imune humoral

No presente estudo, a resposta imune humoral adquirida ao *T. cruzi*, foi estudada através da detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* das classes IgM e IgG, nos dias 7, 14 e 42 pós-infecção. Na tabela 8 estão apresentados os percentuais de IgM e IgG reagentes de acordo com o grupo de tratamento nos referidos dias p.i. Na tabela 9 estão apresentados os percentuais de IgM reagentes, assim como os respectivos títulos sorológicos. De acordo com os resultados, observou-se que não houve variação significativa entre os grupos, em relação aos níveis séricos de IgM ($p > 0.05$), entretanto, aos 7 dias p.i., os grupos Bai, Bpi e *Phosphorus* se apresentavam reagentes para IgM, o que não foi observado no grupo controle. Aos 14 dias pós-infecção, observa-se que Bai e *Phosphorus* apresentavam menor número de reagentes para IgM (50%), seguido de Bpi (75%), enquanto todos os animais do controle (100%) ainda se apresentavam reagentes para IgM, o que foi observado também aos 42 dias p.i.

Embora seja observada variação entre o número de IgM reagentes, assim como entre os títulos sorológicos observados entre os grupos, todos os grupos apresentaram produção crescente de IgM ao longo do período avaliado, entretanto, o grupo Bai apresentou menor número de reagentes, assim como menores títulos, em relação ao controle. Os anticorpos IgM são os primeiros a serem produzidos em uma resposta imune humoral, sendo produzidos antes que as células B sofram hipermutação somática e, portanto, **tendem a ser de baixa afinidade**, sendo também produzidos nas respostas secundárias e subseqüentes, embora outros isotipos dominem as fases tardias da resposta de anticorpos (JANEWAY et al., 2002). De acordo com Brener et al. (2000), o desaparecimento da parasitemia, o decréscimo dos níveis de imunoglobulinas da classe M e o aumento dos níveis de IgG caracterizam a transição da fase aguda da infecção para a fase crônica, assim pode-se associar tal observação ao menor período de patência observado em Bai.

Na tabela 10 estão apresentados os percentuais de IgG reagentes, assim como os respectivos títulos sorológicos, nos referidos dias p.i. Não se observa variação significativa entre os grupos, em relação aos títulos de IgG aos 7 e 14 dias p.i. ($p > 0,05$), entretanto, aos 7 dias p.i., observa-se que 100% dos animais pertencentes ao grupo Bai apresentavam títulos sorológicos para IgG, sugerindo *switch* mais precoce das classes de imunoglobulinas neste grupo, em relação ao controle. Aos 14 dias p.i., observa-se que 100% dos animais dos grupos Bai, *Phosphorus* e Controle se apresentavam reagentes para IgG, entretanto, entre estes grupos, observa-se maior percentual de títulos sorológicos mais elevados (1:64) no grupo pré-tratado com bioterápico (Bai). De acordo com Brodskyn et al. (1989), o aparecimento de anticorpos específicos está relacionado com a queda da parasitemia e isotipos de IgG estão associados à eliminação de formas sanguíneas do parasita. Assim, pode-se associar a reposta secundária (IgG) mais precoce e intensa observada no grupo Bai ao melhor controle da parasitemia, observado na fase aguda da infecção, em relação ao Controle. Tal resposta assegurou a resistência à infecção, visto que 87,5% dos animais do grupo Bai atingiram a fase crônica da infecção, comparados a 57 % do grupo controle. Weissman et al. (1992) observaram que, camundongos pré-tratados com diluições homeopáticas (15CH) do antígeno KLH, 14 dias após receberem doses ponderais do antígeno, apresentaram resposta secundária

(IgG) mais precoce e intensa, enquanto o controle ainda apresentava baixos títulos de IgG e ainda elevados títulos de IgM. Entretanto, de acordo com os autores, quando foi empregada a ultradiluição 7CH, o efeito do pré-tratamento somente se apresentou mais intenso aos 30 dias p.i. Os autores observaram que a administração de antígenos ultradiluídos, por via oral ou por via parenteral determinou a modulação da resposta imune específica humoral (IgG) e celular, mesmo quando empregada diluição abaixo do número de Avogrado.

Aos 42 dias p.i., observa-se que 100% dos animais pertencentes ao grupo Controle apresentaram títulos sorológicos de IgG significativamente mais elevados ($p < 0,05$), em relação aos demais grupos. Tal observação pode demonstrar ineficiente ‘controle’ da resposta imune na fase crônica da infecção, o que normalmente associa-se à presença de lesões teciduais imunomediadas no organismo do hospedeiro, visto que nesta fase, não são requeridos elevados níveis de imunoglobulinas para controle da parasitemia.

Os linfócitos B são considerados importantes ferramentas de defesa do hospedeiro no controle da infecção, pela característica ativação clonal e hipergamaglobulinemia, que ocorrem na fase aguda, auxiliando na remoção dos parasitos circulantes (MARINO, 2005). Entretanto, Morgan et al. (1996) relacionaram os linfócitos B, mais especificamente as imunoglobulinas, ao possível mecanismo auto-imune da doença. Os autores observaram elevados níveis de IgG1 e IgG3 no soro de pacientes com a forma crônica sintomática da Doença de Chagas.

Estudos realizados demonstraram que a produção de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* (IgG) tem importância na resistência à infecção, entretanto, estão associados à patogenia da doença (MORGAN et al, 1996; ZAUZA e BORGES-PEREIRA, 2001; HERNANDEZ-BECERRIL et al., 2001).

De acordo com Janeway et al (2002), a administração de antígenos protéicos solúveis pela via oral pode resultar em tolerância, a qual constitui mecanismo a ser explorado para reduzir as respostas imunes indesejadas. Assim, este deve ser outro aspecto a ser melhor estudado em relação à possibilidade de melhor controle de mecanismos imunopatológicos na fase crônica da infecção por *T. cruzi*, visto que, nesta fase, um tratamento o qual pudesse ter efeito sobre a tolerância imunológica aos antígenos do parasita teria relevante importância. A resposta imune normalmente observada na fase crônica da infecção pode ser “desproporcional” aos antígenos residuais de *T. cruzi* presentes, caracterizando assim os aspectos imunopatogênicos da doença.

Tabela 8. Percentual (%) de reagentes IgG e IgM (IFI), em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle).

Grupo de tratamento	7 dias PI		14 dias PI		42 dias PI	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
BAI	100,0	25,0	100,0	50,0	100,0	56,0
BPI	25,0	50,0	75,0	75,0	*	*
Phos	75,0	25,0	100,0	50,0	100,0	75,0
Controle	50,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* Amostras comprometidas, não foi possível determinar os resultados.

Tabela 9. Percentuais de títulos sorológicos (%) de anticorpos IgM, em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle).

Título sorológico	7dias PI				14 dias				42 dias			
	Bai	Bpi	Phos	Contr	Bai	Bpi	Phos	Contr	Bai	Bpi*	Phos	Contr
1:4	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	14,0		0,0	0,0
1:8	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	25,0	25,0	0,0		0,0	0,0
1:16	0,0	25,0	0,0	0,0	25,0	25,0	0,0	75,0	14,0		25,0	25,0
1:32	25,0	0,0	25,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	14,0		12,5	50,0
1:64	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	14,0		25,0	25,0
1:128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		12,5	0,0

* Amostras comprometidas, não foi possível determinar os resultados.

Tabela 10. Percentuais (%) de títulos sorológicos de anticorpos IgG, em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção e tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle).

Título sorológico	7dias PI				14 dias				42 dias			
	Bai	Bpi	Phos	Contr	Bai	Bpi	Phos	Contr	Bai	Bpi*	Phos	Contr
1:4	50,0	0,0	0,0	25,0	25,0	0,0	25,0	0,0	14,0		0,0	0,0
1:8	25,0	0,0	25,0	25,0	0,0	0,0	25,0	25,0	0,0		0,0	0,0
1:16	0,0	0,0	25,0	0,0	25,0	25,0	25,0	25,0	14,0		0,0	0,0
1:32	25,0	25,0	25,0	0,0	0,0	25,0	25,0	50,0	29,0		0,0	0,0
1:64	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	25,0	0,0	0,0	43,0		63,0	0,0
1:128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		25,0	100**

* Amostras comprometidas, não foi possível determinar os resultados. ** Significância Estatística.

4.2.4 Resposta Leucocitária

Com o objetivo de avaliar aspectos da imunidade inata (inespecífica) e adquirida (específica) à infecção por *T. cruzi* em camundongos tratados com homeopatia, soro fisiológico e, em animais controle não infectados, foi realizado leucograma nos dias 0, 7, 14 e 42 pós-infecção. As variações entre os grupos experimentais, em relação aos valores absolutos de leucócitos estão apresentadas na figura 17. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que todos os animais dos grupos experimentalmente infectados apresentaram redução do número de linfócitos aos 7 dias pós-infecção (figura 18), evidenciando imunossupressão induzida pelo *T. cruzi*.

Parasitas protozoários são altamente adaptados para escapar dos efeitos da imunidade humoral e celular, sendo um dos principais mecanismos de evasão do *T. cruzi*, a anergia de células T (SILVA et al., 1998 ‘citado por’ PEREIRA, 2003) e aumento da apoptose linfocitária (BRENER e GAZZINELLI, 1997) levando à imunossupressão. De acordo com Curoto de Lafaille et al. (1990), a intensa imunossupressão presente na fase aguda da infecção é característica da infecção pelo *T. cruzi*, com recuperação parcial no início da fase crônica.

No presente trabalho, após o período inicial de imunossupressão característico da infecção, apenas o grupo pré-tratado com bioterápico (Bai) apresentou aumento significativo no número de linfócitos ($p < 0,05$) ao longo do curso da infecção, até 42 dias p.i., (Figura 18 e 19) assim como significativo aumento no número de neutrófilos ($p < 0,05$) (Figuras 20 e 21). Os valores médios absolutos de neutrófilos dos animais de todos os grupos infectados tenderam a um declínio no período entre dia 0 e 7 p.i. com exceção do grupo Bai o qual aumentou significativamente ($p < 0,05$). No grupo Controle, observou-se redução significativa no número de neutrófilos até os 42 dias p.i. ($p < 0,05$).

Tais resultados sugerem efeito imunomodulador associado à administração prévia do bioterápico (Bai), com ação sobre a imunidade inata e adquirida na fase aguda da infecção, uma vez que foi observado melhor controle da parasitemia, ou seja, melhor resistência à infecção, assim como menor taxa de mortalidade em relação ao grupo Controle. Aos 42 dias p.i., quando não mais se detectava parasitemia patente, observou-se que Bai apresentou número de linfócitos significativamente mais elevado ($p < 0,05$), em relação ao Controle (Figura 19), entretanto, apesar da intensa ativação linfocitária, pode ser sugerido possível efeito imunomodulador, determinando balanço Th1/Th2, visto que, a análise histológica de músculo cardíaco aos 42 dias p.i. revela que 71,4 % dos animais do grupo Bai não mais apresentavam alteração inflamatória, enquanto todos os animais do grupo controle ainda apresentavam lesões, embora discretas. Mais experimentos são necessários para elucidar os possíveis mecanismos imunomoduladores que os bioterápicos possam determinar na infecção pelo *T. cruzi*, principalmente em relação ao balanço Th1/Th2 e, conseqüentemente, ao equilíbrio entre a produção de citocinas pró e antiinflamatórias, visto que, na fase aguda da infecção são necessários mediadores da inflamação e ativação de linfócitos B para controle da parasitemia, entretanto, na fase crônica é necessário “frear” tais mecanismos, evitando assim lesões teciduais imunomediadas. A resposta imune no princípio da infecção visa redução e controle da multiplicação do parasito, além do preparo e otimização do sistema imune para gerar a resposta imune adquirida Th1 (REIS e LOPES, 2000), entretanto, na fase crônica da infecção chagásica, este perfil de citocinas (Th1) tem sido associado à cronificação da inflamação (FRESNO et al., 1997; BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; DOS SANTOS et al., 2001, GOMES et al., 2003 ‘citados por’ MARINO, 2005).

Estudos realizados relatam que antígenos homeopáticos (ultradiluídos) podem “transferir sinais” ao sistema imune, modulando assim sua resposta quando o organismo for exposto ao respectivo antígeno (BASTIDE, 1994; JONAS, 2000; MACHADO, 2003).

Bastide e Boudard (1995) propuseram um novo conceito de imunomodulação, baseado em uma nova habilidade de resposta do organismo, ao invés de novas moléculas. De acordo

com os autores, visto que o sistema imune é submetido à complexa rede de interações celulares e moleculares, é possível que o aspecto qualitativo possa ser mais importante que o quantitativo, e que uma simples “informação” de um imunomediador possa ser ‘entendida’ pelo organismo.

As relações parasito / hospedeiro, na infecção de vertebrados pelo *T. cruzi*, são caracterizadas pela multiplicação intracelular e evolução das formas parasitárias, pelas alterações das células parasitadas e pela resposta imunológica, com o seu componente inflamatório. Mecanismos celulares inatos exercem efeito protetor, o qual antecede o aparecimento de anticorpos (BRENER et al., 2000). Posteriormente, ao longo da fase aguda da infecção, mecanismos inatos e adquiridos podem cooperar entre si para determinar a proteção do hospedeiro (PLATA et al., 1987).

Os mesmos efeitos não foram observados quando o bioterápico foi empregado após a infecção experimental (Bpi). De acordo com Janeway et al. (2002), a modulação do sistema imune pode ser empregada para inibir as respostas imunopatológicas a agentes infecciosos, entretanto, é mais efetivo **prevenir** uma resposta imunopatogênica, do que **tratar** uma resposta já estabelecida.

Em relação ao número de monócitos, houve um aumento significativo no grupo *Phosphorus* no período de 0 a 42 dias p.i. ($p < 0,05$) (Figura 22). Nos demais grupos, não houve diferença significativa em relação a esse tipo celular.

Embora os monócitos sejam células hospedeiras de alta afinidade para a multiplicação do *T. cruzi*, os macrófagos têm sido considerados elemento-chave no controle do parasita, desde que ativados (HOFF, 1975 ‘citado por’ JORGE e CASTRO, 2000), apresentando papel decisivo na multiplicação parasitária (MONTÈON et al., 1996 ‘citado por’ JORGE e CASTRO 2000).

A redução significativa no número de linfócitos observada no grupo *Phosphorus* aos 42 dias p.i. ($p < 0,05$) (Figuras 18 e 19) pode estar associada às elevadas parasitemias observadas neste grupo na fase aguda da infecção. A produção excessiva de óxido nítrico (NO) por macrófagos no curso da infecção por *T. cruzi* apresenta efeito supressivo sobre células T. (ABRAHAMSHON e COFFMAN 1995). Entretanto, na fase crônica da infecção, a redução da população de linfócitos pode ser importante prevenindo lesões imunomediadas. Pereira et al. (2005) estudaram os efeitos do medicamento homeopático Canova na infecção por *Leishmania amazonensis in vitro* e *in vivo* e observaram aumento significativo na produção de óxido nítrico, sugerindo que o tratamento homeopático teve efeito sobre a ativação de macrófagos.

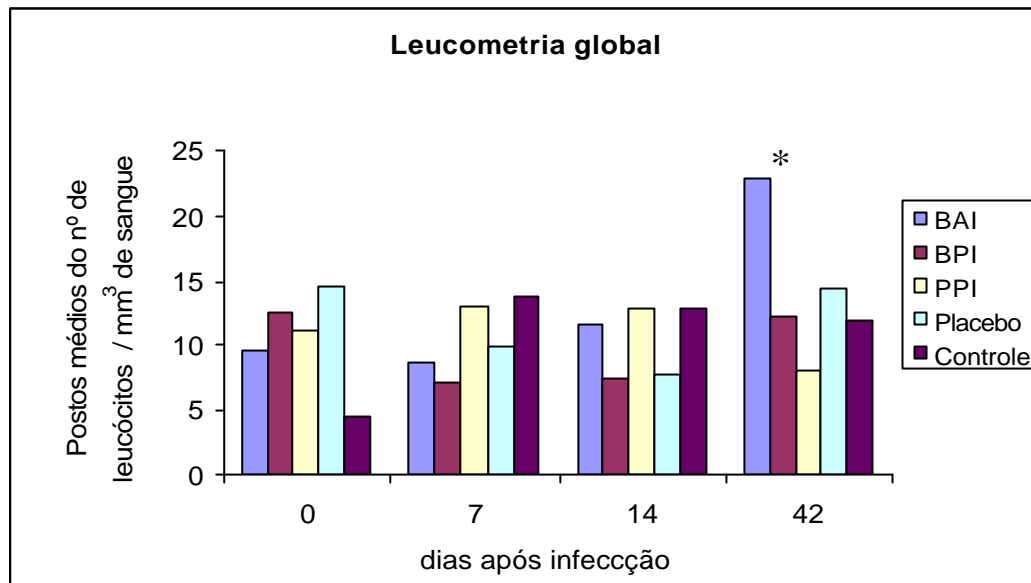


Fig. 17. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) do número de leucócitos, entre os grupos de tratamento, após infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infectado (s/ infec.). *Kruskal-Wallis Test*

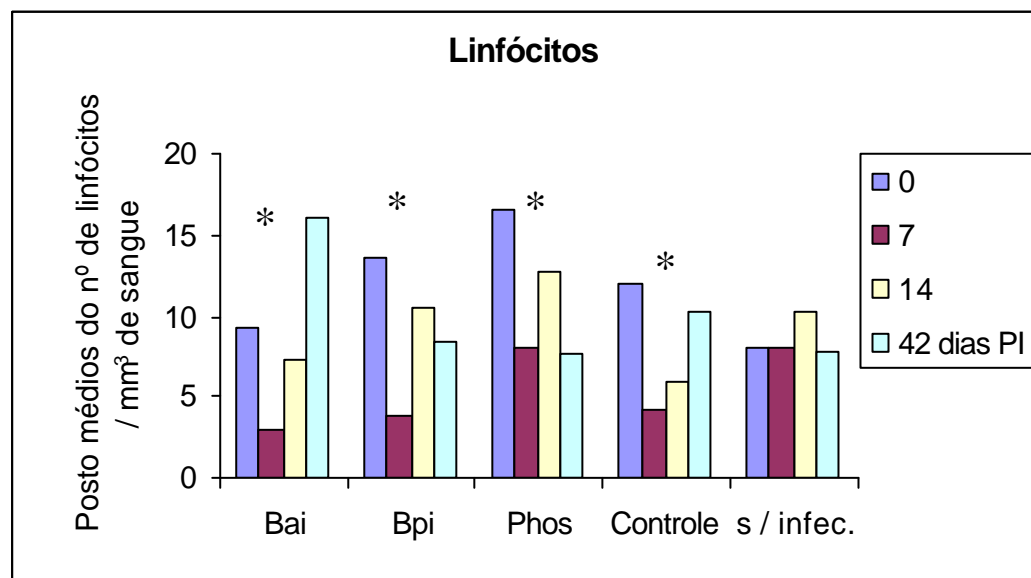


Fig 18. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de linfócitos, entre dias após infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infectado (s/ infec.). *Kruskal-Wallis Test*.

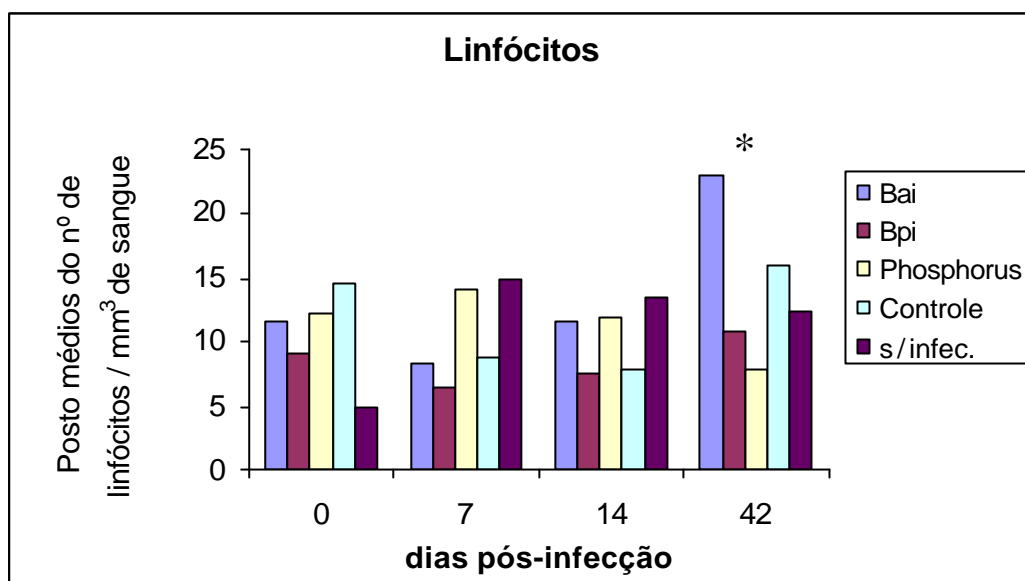


Fig 19. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de linfócitos, entre os grupos de tratamento, após infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infectado (s/ infec.). *Kruskal-Wallis Test*.

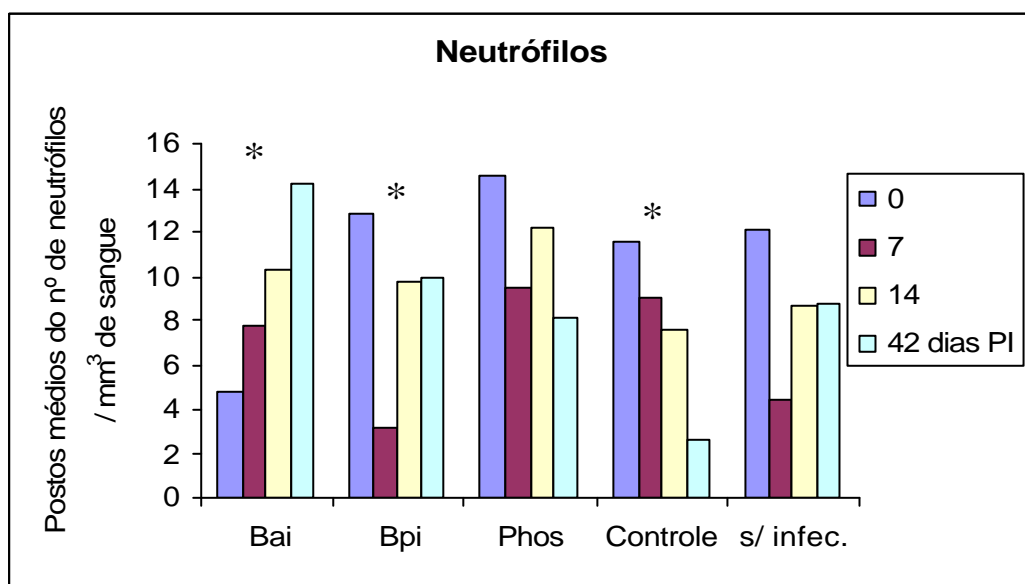


Fig 20. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de neutrófilos, entre dias após infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infectado (s/ infec.). *Kruskal-Wallis Test*.

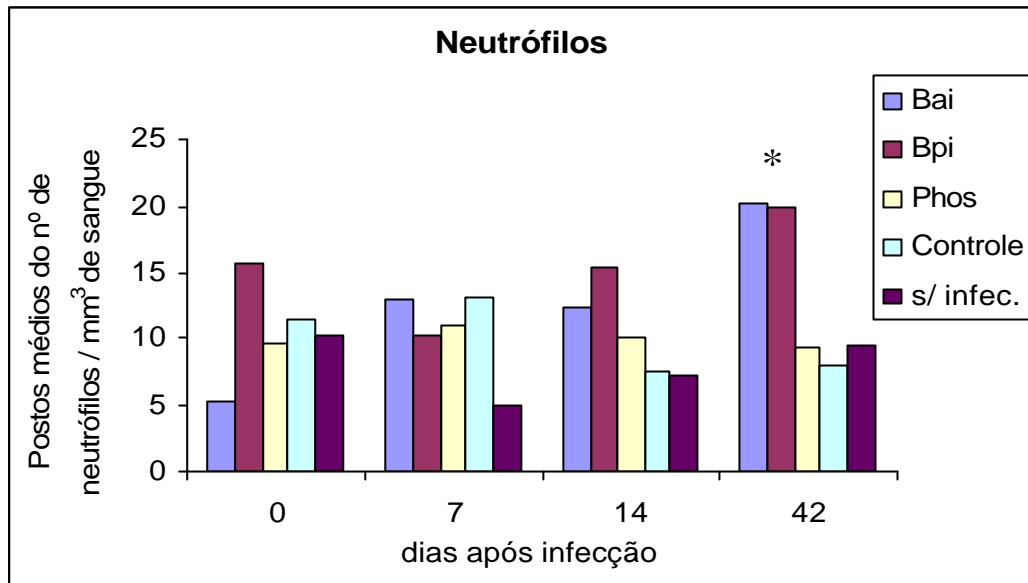


Fig 21. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de neutrófilos, entre os grupos de tratamento, após infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infectado (s/ infec.). *Kruskal-Wallis Test*.

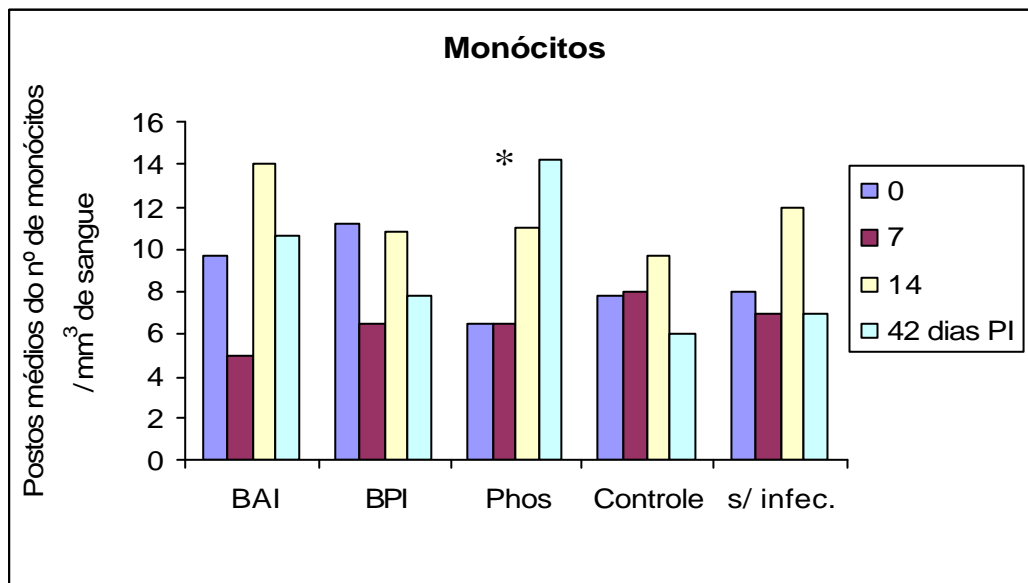


Fig 22. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de monócitos, entre dias, após infecção experimental por *T. cruzi*, em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infectado (s/ infec.). *Kruskal-Wallis Test*.

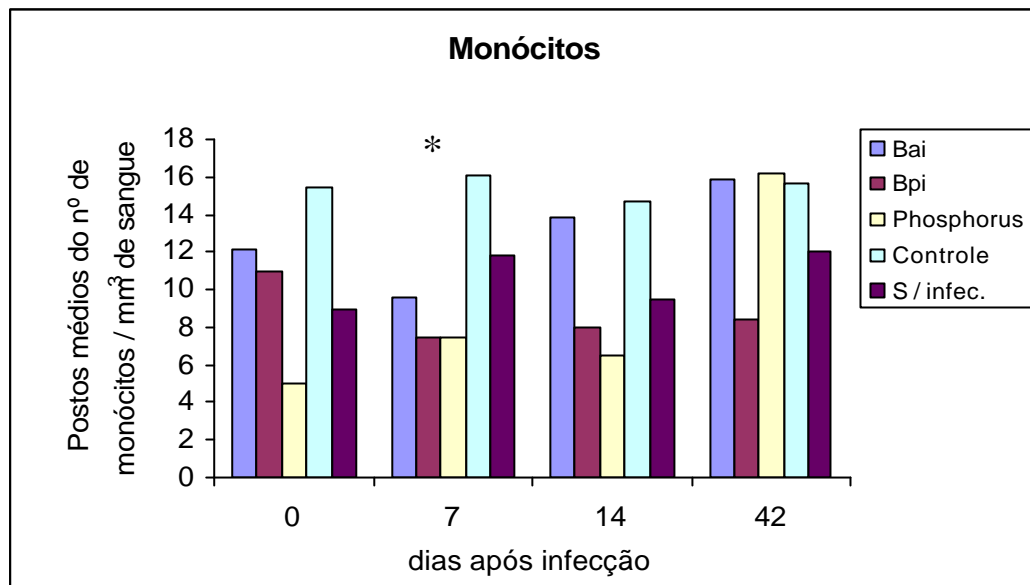


Fig 23. Variação dos postos médios (*Mean Rank*) dos valores absolutos de monócitos entre os grupos de tratamento após infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* após infecção, tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e controle não infectado (s/ infec.). *Kruskal-Wallis Test*.

4.2.5 Avaliações histopatológicas

Com objetivo avaliar a patogênese da infecção por *T. cruzi* em camundongos tratados com bioterápico antes e após infecção (Bai e Bpi, respectivamente), tratados com *Phosphorus* pós-infecção (*Phosphorus*), tratados com soro fisiológico antes e após infecção (Controle) e em camundongos controle não infectados (s/ infec.), foi conduzido estudo histopatológico aos 0, 7, 14 e 42 dias pós-infecção. As lesões inflamatórias observadas durante as fases agudas e crônicas foram classificadas como: infiltrado inflamatório mononuclear discreto, de caráter focal; infiltrado inflamatório mononuclear moderado, de caráter confluyente; infiltrado inflamatório mononuclear intenso, de caráter difuso e, sem alterações.

A inflamação é o processo patológico básico da Doença de Chagas, ocorrendo dois tipos de reação associada ao *T. cruzi*: reação focal – parasito dependente, que surge aonde ocorre multiplicação do parasita, causando ruptura da célula parasitada; reação difusa, que ocorre apenas no miocárdio, durante as fases aguda e crônica da infecção (BRENER et al. 2000).

No presente trabalho observou-se que as características das lesões nos tecidos do hospedeiro não variaram qualitativamente, ou seja, em geral, as lesões foram de caráter inflamatório com predominância de células mononucleares.

Músculo cardíaco (Tabela 11, Figura 24))

Aos 07 dias pós-infecção, a análise de cortes histológicos de músculo cardíacos dos animais pertencentes aos grupos experimentais não revelou nenhuma alteração de caráter inflamatório.

Aos 14 dias pós-infecção, quando ainda se detectava parasitemia patente nos animais infectados, observou-se que, em geral, o grupo *Phosphorus* apresentou maior número de animais com lesões intensas, seguido do grupo Controle, enquanto os animais do grupo Bai apresentavam lesões discretas. Aos 42 dias pós-infecção, já eram observados animais sem qualquer alteração inflamatória cardíaca, sendo estes em maior número em Bai (71,4%), seguido de Bpi (60%) e *Phosphorus* (25%), enquanto todos os animais do grupo controle ainda apresentavam lesões inflamatórias, embora discretas, sugerindo a cronificação do processo inflamatório neste grupo. Tal observação pode ser associada aos maiores títulos de IgG observados neste grupo, aos 42 dias p.i. ($p < 0,05$). De acordo com JANEWAY (2002), os complexos imunes são produzidos em todas as respostas de anticorpos, devendo ser removidos da circulação pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM), sendo seu potencial patogênico associado à ativação leucocitária e conseqüente lesão tecidual. Assim, uma vez que a diátese sífilínica, a qual é associada à patogenia da infecção por *T. cruzi*, é caracterizada por comprometimento do SFM (CARILLO Jr. 2000), o tratamento diatésico com o medicamento *Phosphorus* pode ter determinado melhor re-organização da resposta celular a este nível, refletindo na regressão das lesões e na ausência de mortalidade, observada neste grupo. Sugere-se assim, efeito do referido tratamento sobre a patogenia da infecção.

Músculo esquelético (Tabela 12, Figura 25)

Aos 7 dias pós-infecção, não observou-se nenhuma alteração em músculo esquelético dos animais pertencentes aos grupos experimentais.

Aos 14 dias pós-infecção, 75, 75, 25 e 50% dos animais dos grupos Bai, Bpi, *Phosphorus* e Controle apresentaram, respectivamente, lesões inflamatórias focais discretas; 0, 25, 50 e 25% dos animais dos respectivos grupos apresentaram lesões inflamatórias de caráter moderado (miosite moderada); 25% dos animais dos grupos *Phosphorus* apresentaram lesões inflamatórias difusas intensas (miosite difusa intensa) e 25% dos animais dos grupos Controle e Bai não apresentaram nenhuma alteração inflamatória.

Aos 42 dias pós-infecção, observou-se que 43; 60; 57 e 25% dos animais dos grupos Bai, Bpi, *Phosphorus* e Controle, respectivamente, apresentavam miosite focal discreta, 29; 0; 14 e 50% dos animais dos respectivos grupos apresentavam miosite moderada, enquanto 29; 40; 29 e 0%, respectivamente, não apresentavam nenhuma alteração inflamatória. Neste período, 25% dos animais do grupo Controle apresentavam miosite intensa de caráter difuso.

Apesar da maior intensidade das lesões em músculo esquelético, observadas, em geral, no grupo *Phosphorus* aos 14 dias p.i., aos 42 dias pós-infecção, lesões intensas eram ainda observadas no grupo Controle, enquanto em Bai, Bpi e *Phosphorus* já eram observados animais sem qualquer alteração, sugerindo, mais uma vez, a cronificação do processo no grupo Controle.

Fígado (Tabela 15, Figura 26)

As lesões hepáticas observadas foram representadas por áreas de inflamação no parênquima e nos espaço-porta (infiltrado inflamatório mononuclear).

Aos 7 dias pós-infecção, 25% dos animais do grupo *Phosphorus* apresentavam infiltrado inflamatório discreto no parênquima hepático. Infiltrado inflamatório de caráter moderado foi notado em 75, 100, 75 e 100% dos animais dos grupos Bai, Bpi, *Phosphorus* e Controle, respectivamente. Não foram observadas alterações em 25% dos animais do grupo Bai.

Aos 14 dias p.i., 100; 100; 50 e 100% dos animais dos grupos Bai, Bpi, *Phosphorus* e Controle apresentavam infiltrado inflamatório intenso. No grupo *Phosphorus*, 50% dos animais apresentavam hepatite moderada.

Aos 42 dias p.i., 100% dos animais dos grupos Bai, Bpi e *Phosphorus* apresentavam infiltrado inflamatório discreto, enquanto no grupo Controle, 60% dos animais tinham infiltrado discreto e 40% moderado.

Intestino grosso (Tabela 13, Figura 27)

As lesões inflamatórias observadas na camada muscular do intestino grosso apresentavam caráter focal, associadas à destruição de fibras, variando apenas em intensidade.

Aos 7 dias pós-infecção, fragmentos de intestino grosso dos animais pertencentes aos grupos experimentais revelaram que 25 e 33 % dos animais dos grupos *Phosphorus* e Controle, respectivamente, apresentavam alterações inflamatórias focais discretas. Nos demais grupos experimentais não foram observadas alterações.

Aos 14 dias pós-infecção, observou-se que 100, 100 e 25 % dos animais dos grupos Bai, Bpi e Placebo, apresentavam, respectivamente, lesões inflamatórias moderadas na, enquanto, 100 e 75% dos animais dos grupos *Phosphorus* e Controle, lesões inflamatórias intensas.

Aos 42 dias p.i., notou-se que 43 e 57 %; 0 e 20%; 57 e 13% dos animais dos grupos Bai, Bpi, e *Phosphorus* exibiam lesões inflamatórias discretas e moderadas na muscular do órgão, respectivamente. Foram observadas lesões inflamatórias intensas em 80; 88 e 100% dos animais dos grupos Bpi, *Phosphorus* e Controle, respectivamente.

Intestino delgado (Tabela 14).

As lesões inflamatórias observadas na camada muscular do intestino delgado apresentavam caráter focal, associadas à destruição de fibras, variando apenas em intensidade.

Aos 7 dias pós-infecção, a análise de fragmentos de intestino delgado revelou que 25 % dos animais do grupo *Phosphorus* tinham lesões inflamatórias discretas, enquanto nos demais grupos experimentais não foram observadas alterações.

Aos 14 dias pós-infecção, verifica-se que 50 e 100% dos animais dos grupos Bpi e Controle apresentavam infiltrado inflamatório moderado, enquanto 100; 50 e 100% dos animais dos grupos Bai, Bpi e *Phosphorus*, infiltrado inflamatório intenso, respectivamente.

Aos 42 dias p.i., observou-se que 57; 71 e 50% dos animais dos grupos Bai, *Phosphorus* e Controle, respectivamente, não apresentavam alterações. Infiltrado inflamatório de caráter moderado foi observado em 43; 60; 14 e 50% dos animais dos grupos Bai, Bpi, *Phosphorus* e Controle, respectivamente, enquanto de grande intensidade foi encontrado em 40% dos animais do grupo Bpi.

Rins

Fragmentos renais de animais infectados por *T. cruzi* e submetidos a tratamento com homeopatia e soro fisiológico não revelaram nenhuma alteração.

De acordo com os resultados obtidos à avaliação histopatológica observou-se em músculo cardíaco e esquelético que, em geral, aos 14 dias pós-infecção, Bai apresentou lesões de menor intensidade, em relação aos demais grupos. As lesões mais intensas, conforme relatado, foram observadas no grupo *Phosphorus*. Segundo BOUNAN (1989), as doenças infecciosas resultam da penetração de um agente infeccioso, quer natural ou experimentalmente, e de um 'terreno mórbido' ou 'diátese' ou 'pré-disposição', o qual determinará os 'mecanismos reacionais' responsáveis pelas manifestações clínicas com significado para a semiologia médica, porém, qualificados por características genéticas, história patológica pregressa do indivíduo, além de fatores ambientais. A partir daí tem-se como possibilidades terapêuticas: a destruição do agente microbiano (terapia anti-infecciosa) e/ou a correção do 'terreno mórbido'. Em relação à importância da diátese no curso de um quadro infeccioso tem-se: 1. a infecção propriamente dita, ou seja, à predisposição à infecção, visto que mesmo sob condições idênticas alguns indivíduos escapam de uma infecção; 2. A evolução da infecção, a qual dependente do processo reacional, determinado pela diátese, caracterizando a intensidade de certas fases do processo reacional, assim como os aspectos lesionais associados. De acordo com o autor, durante a manifestação de insuficiência dos mecanismos defensivos, o tratamento homeopático da diátese permite amplificar o processo reacional no momento de sua expressão clínica (agravação) possibilitando a regressão das lesões.

No presente trabalho, a menor intensidade de lesões inflamatórias observadas em Bai sugere, mais uma vez, efeito imunomodulador associado ao tratamento, com melhor controle de respostas imunopatológicas na fase crônica da infecção.

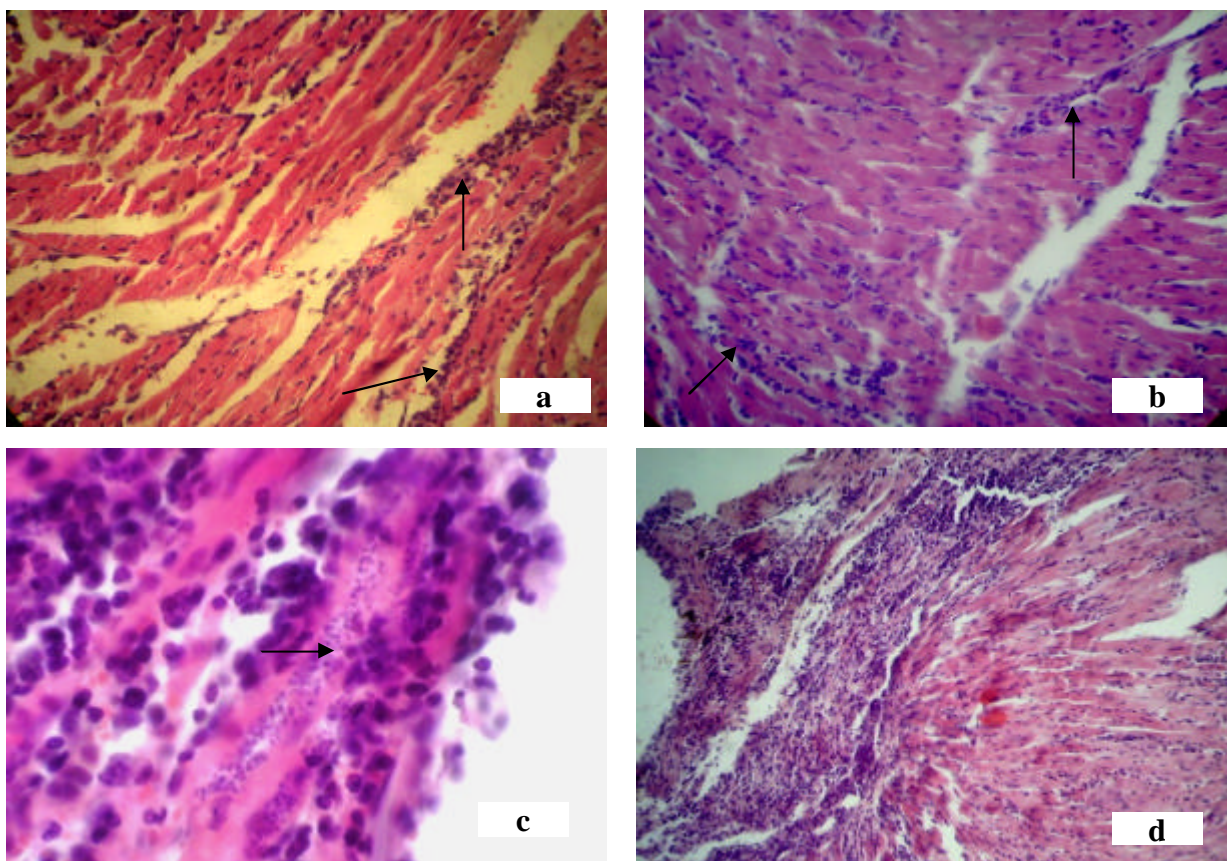


Figura 24. Aspectos microscópicos de **músculo cardíaco** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. 14 dias p.i. (a) Grupo Bai. Miocardite multifocal coalescente moderada mononuclear (seta) (H.E. obj. 40x.). (b) Grupo Bpi. Miocardite multifocal coalescente moderada mononuclear (seta) (H.E. obj. 40x.). (c) Grupo Phosphorus. Miocardite intensa mononuclear em torno de pseudocisto de *T. cruzi* (seta) (H.E. obj. 40x.). (d) Grupo Controle. Miocardite difusa intensa mononuclear (seta) (H.E. obj. 10x.).

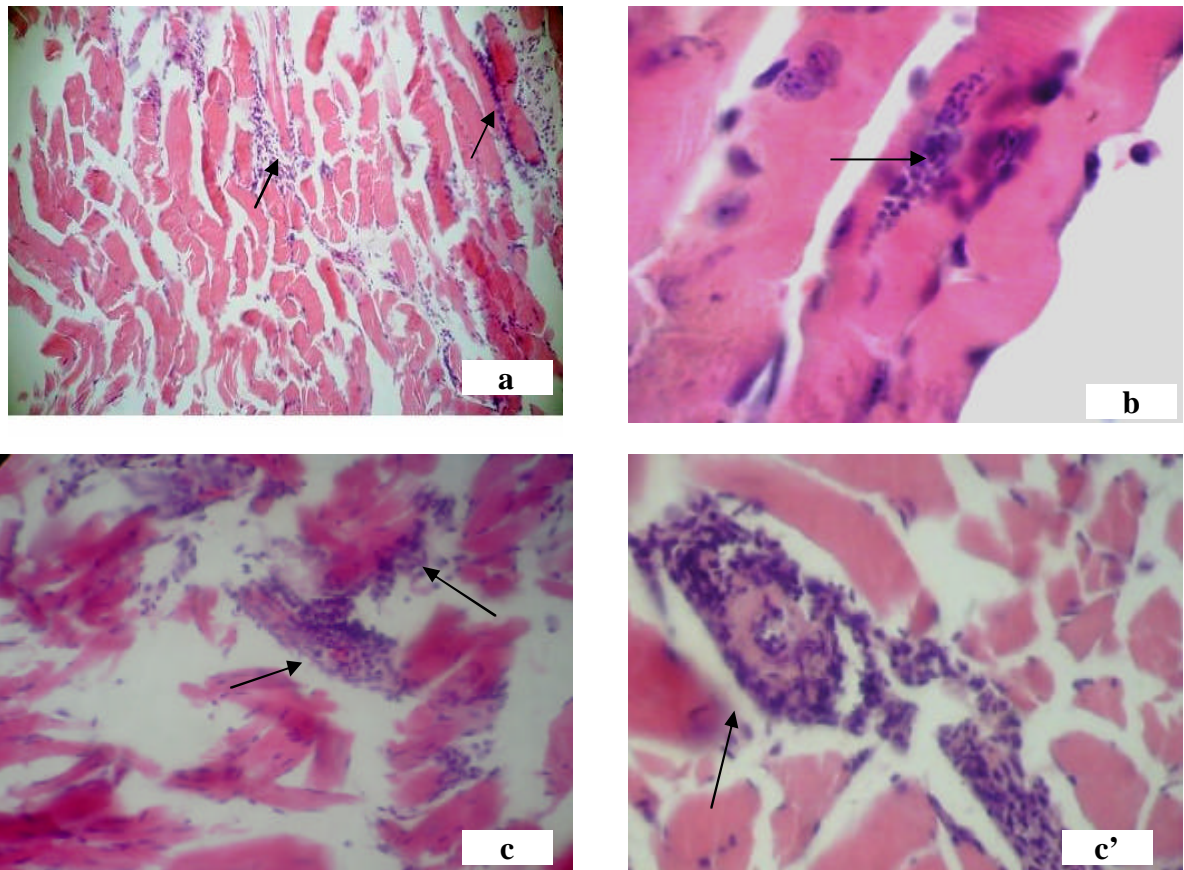
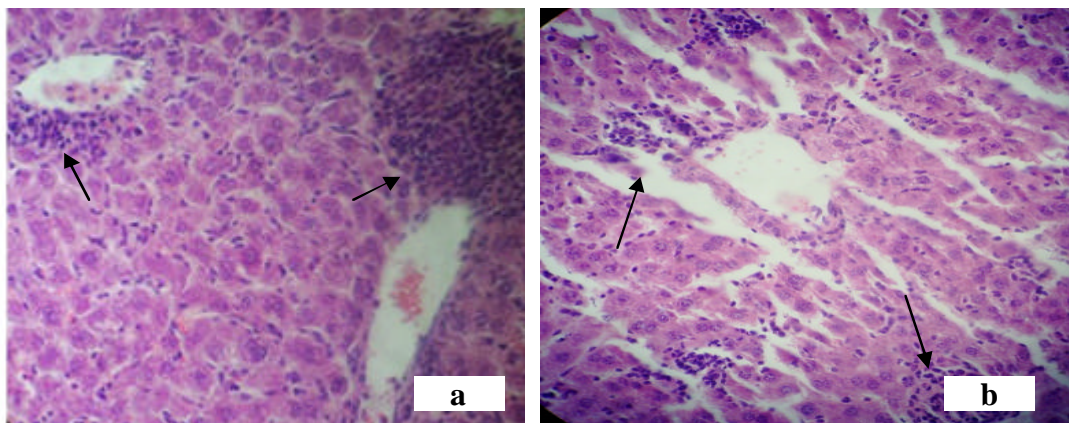


Figura 25. Aspectos microscópicos de **músculo esquelético** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. 42 dias p.i. (a) Grupo Bai. Miosite moderada multifocal coalescente mononuclear (seta) (H.E. obj. 40x.). (b) Grupo *Phosphorus*. Miosite focal discreta mononuclear em torno de pseudocisto de *T. cruzi* (seta) (H.E. obj. 40x.). (c) Grupo Controle. Miosite difusa intensa mononuclear; (c') hialinização da parede vascular associada a infiltrado mononuclear (seta) (H.E. obj. 40x.).



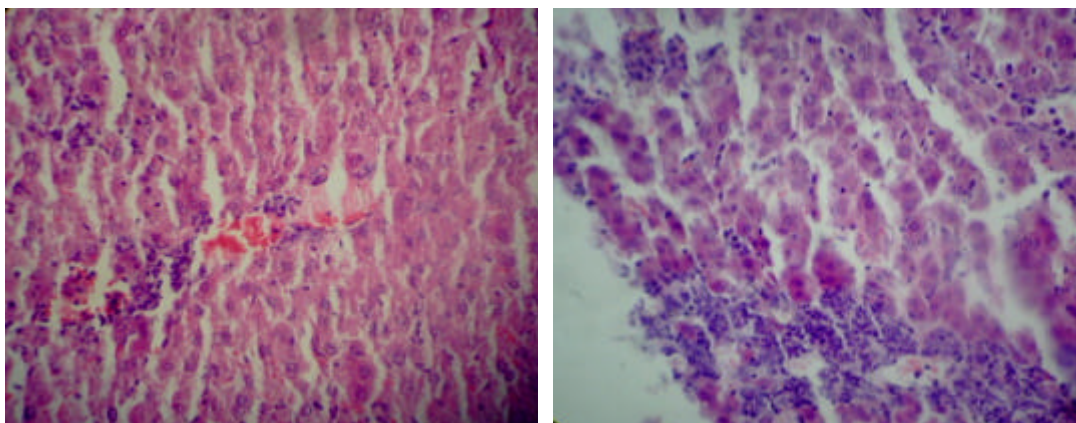


Figura 26. Aspectos microscópicos de **fígado** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. Fase crônica da infecção, 42 dias p.i. (a) Grupo Bai. Hepatite multifocal mononuclear intensa (H.E. obj. 40x.). (b) Grupo Bbi. Hepatite multifocal mononuclear intensa (H.E. obj. 40x.). (c) Grupo *Phosphorus*. Hepatite multifocal mononuclear moderada (H.E. obj. 40x.). (d) Grupo Controle. Hepatite difusa mononuclear intensa (H.E. obj. 40x.).



c



d

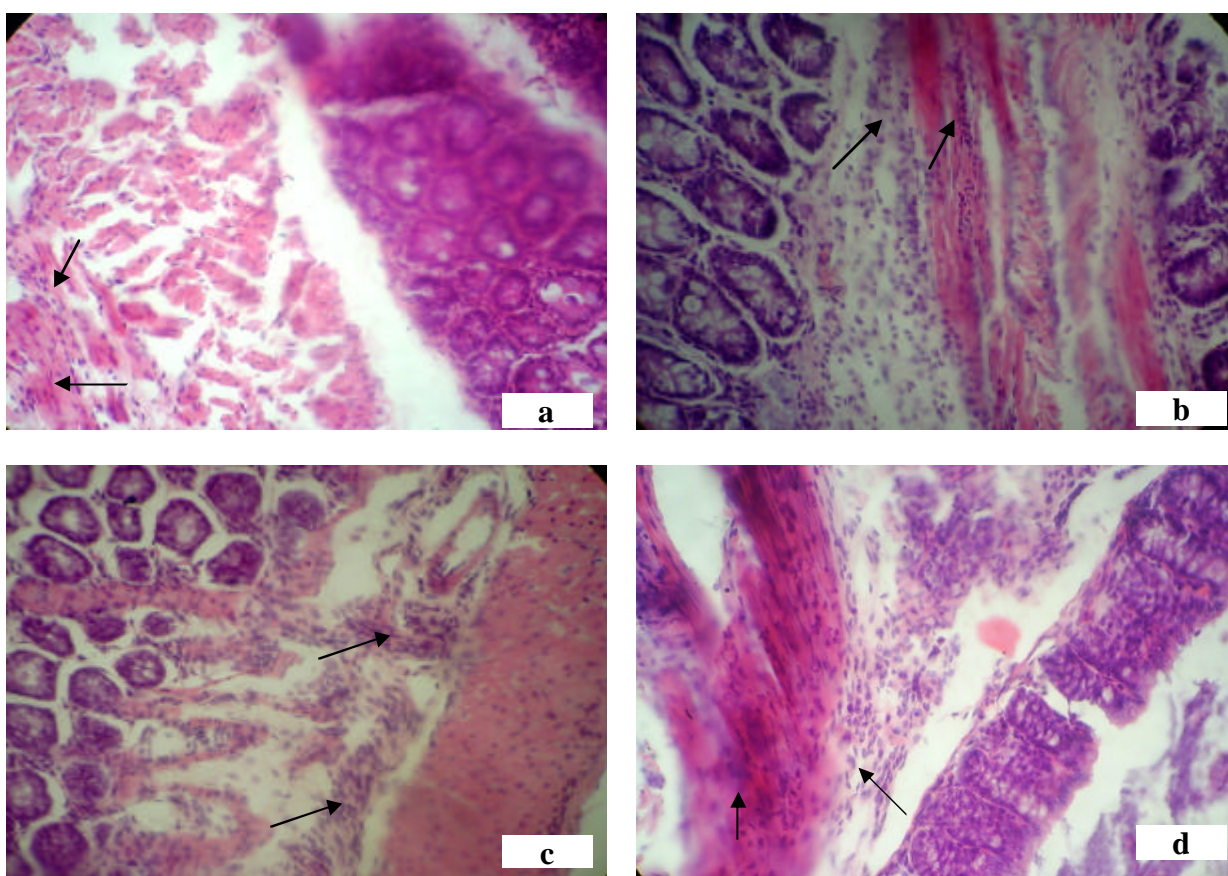


Figura 27. Aspectos microscópicos de **intestino grosso** de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, cepa Y. Fase crônica da infecção, 42 dias p.i (a) Grupo Bai. Infiltrado inflamatório coalescente mononuclear moderado, camada muscular (H.E. obj. 40x.). (b) Grupo Bbi. Infiltrado inflamatório difuso mononuclear intenso, camada muscular (H.E. obj. 40x.). (c) Grupo *Phosphorus*. Infiltrado inflamatório difuso mononuclear intenso, camada muscular (H.E. obj. 40x.). (d) Grupo Controle. Infiltrado inflamatório difuso mononuclear intenso, camada muscular (H.E. obj. 40x.).

Tabela 11. Percentual de lesões inflamatórias no **músculo cardíaco**, em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com homeopatia, soro fisiológico e controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.

Dias p.i.	Infiltrado inflamatório	Bai	Bpi	<i>Phosphorus</i>	Controle	s/ infec.
7 dias	Discreto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Moderado	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	100,0	100,0	100,0	100,0	100
14 dias	Discreto	25	0,0	0,0	0,0	0,0
	Moderado	75	100	50	50	0,0
	Intenso	0,0	0,0	50	25	0,0
	s/ alterações	0,0	0,0	0,0	25	100
42 dias	Discreto	28,6	20	75	100	0,0
	Moderado	0,0	20	0,0	0,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	71,4	60,0	25,0	0,0	100

Tabela 12. Percentual de lesões inflamatórias em **músculo esquelético**, em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com homeopatia, soro fisiológico e controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.

Dias p.i.	Infiltrado inflamatório	Bai	Bpi	<i>Phosphorus</i>	Controle	s/ infec.
7 dias	Discreto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Moderado	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	100,0	100,0	100,0	100,0	100
14 dias	Discreto	75	75,0	25,0	50,0	0,0
	Moderado	0,0	25,0	50	25,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0
	s/ alterações	25,0	0,0	0,0	25,0	100
42 dias	Discreto	42,9	60,0	57,1	25,0	0,0
	Moderado	28,6	0,0	14,3	50,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0
	s/ alterações	28,6	40,0	28,6	0,0	100

Tabela 13. Percentual de lesões inflamatórias em **intestino grosso**, em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com homeopatia, soro fisiológico e controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.

Dias p.i.	Infiltrado inflamatório	Bai	Bpi	<i>Phosphorus</i>	Controle	s/ infec.
7 dias	Discreto	0,0	0,0	25,0	33,3	0,0
	Moderado	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	100,0	100,0	75,0	66,7	100
14 dias	Discreto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Moderado	100,0	100,0	00	25,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	100,0	75,0	0,0
	s/ alterações	0,0	0,0	0,0	0,0	100
42 dias	Discreto	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	Moderado	57,1	20,0	12,5	0,0	0,0
	Intenso	0,0	80,0	87,5	100,0	0,0
	s/ alterações	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Tabela 14. Percentual de lesões inflamatórias em **intestino delgado**, em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com homeopatia, soro fisiológico e controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.

Dias p.i.	Infiltrado inflamatório	Bai	Bpi	<i>Phosphorus</i>	Controle	s/ infec.
7 dias	Discreto	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0
	Moderado	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	100,0	100,0	75,0	100,0	100,0
14 dias	Discreto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Moderado	0,0	50,0	0,0	100,0	0,0
	Intenso	100,0	50,0	100,0	0,0	0,0
	s/ alterações	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
42 dias	Discreto	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0
	Moderado	42,9	60,0	14,3	50,0	0,0
	Intenso	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	57,1	0,0	71,4	50,0	100,0

Tabela 15. Percentual de lesões inflamatórias em **fígado**, em camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* e tratados com homeopatia, soro fisiológico e controle não infectado, nas fases aguda e crônica da infecção.

Dias p.i.	Infiltrado inflamatório	Bai	Bpi	<i>Phosphorus</i>	Controle	s/ infec.
7 dias	Discreto	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0
	Moderado	75,0	100,0	75,0	100,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	25,0	0,0	0,0	0,0	100,0
14 dias	Discreto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Moderado	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0
	Intenso	100,0	100,0	50,0	100,0	0,0
	s/ alterações	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
42 dias	Discreto	100,0	100,0	100,0	60,0	0,0
	Moderado	0,0	0,0	0,0	40,0	0,0
	Intenso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	s/ alterações	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

5 CONCLUSÕES

- Não foram observados efeitos profiláticos e/ou terapêuticos decorrentes da administração de bioterápico ultradiluído preparado a partir de sangue infectado, quando foi empregado modelo experimental de elevada virulência e curso agudo, infecção experimental de camundongos por *Trypanosoma evansi*.
- O tratamento com bioterápico antes e após imunização de camundongos com extrato de *T. evansi* determinou efeito imunomodulador.
- Correspondendo à imagem clínica e repertorial da infecção por *T. cruzi*, no homem e no modelo murino, o medicamento *Phosphorus* demonstrou ser o que melhor caracteriza a enfermidade.
- O tratamento com bioterápico *T. cruzi* 12 DH, previamente à infecção experimental por *T. cruzi*, determinou efeito imunomodulador.
- O medicamento homeopático *Phosphorus* apresentou efeito sobre a patogenia da infecção por *T. cruzi*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, v. 155, p. 3955-3963, 1995.
- ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-g and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology*, v. 84, p. 231, 1996.
- ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. A. G. ; MARTINS, G. A. ; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live tripomastigotes. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 1961-1967, 1996.
- ANDRADE, A. L.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA SILVA, S.; LUGUETTI, A.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C.; ANDRADE, S. S.; ANDRADE, J. G.; MARTELLI, C. M. Ransomised trial of efficacy of Benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, v. 348, n. 9039, p. 1407-13, 1996.
- ANDRADE, M. A. M.; NASCIMENTO, M. M.; CARILLO Jr, R. Estudo da Origem Diatésica da Doença de Chagas. In: IV Congresso da Associação Brasileira de Reciclagem e Assistência em Homeopatia, 2005. *Anais...*São Paulo, 2005.
- BASTIDE, M. Immunological examples on ultra high dilution research. In: *Ultra High Dilution, Physiology and Physics*. Dordrecht: Endler and Schulte Eds, Kluwer Academic Publisher, 1994. pp 27-33.
- BASTIDE, M.; LAGACHE, A. A communication process: a new paradigm applied to high-dilution effects on the living body. *Althervative Therapies in Health and Medicine*, v. 3, n.4, p.35-39, 1997.
- BASTIDE M A; F. BOUDARD. A novel concept of immunomodulation. In: Forum sur l'Immunomodulation, 1995. *Anais....* Paris, 1995.
- BELON, P. *Recherche en Homéopathie*. France: Editions Boiron, 1999. 133p.
- BELLAVITE, P.; SIGNORINI, A. Pathology, Complex Systems and Resonance. In: SCHUTE, J.; ENDLER, P. C. *Fundamental Research in Ultra High Dilution and Homeopathy*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 105-116.
- BHATIA, V.; SINHA, M.; LUXON, B.; GARG, N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 6245-6254, 2004.
- BOERICKE, W. *Manual de Matéria Médica Homeopática*. São Paulo: Robe Editorial, 1997. 429p.

BONAMIN, L. V. A homeopatia sob a ótica dos novos paradigmas da ciência: revisão bibliográfica. *Revista Homeopatia (APH)*, v. 66, n. 1, p. 27-32, 2001.

BONAMIN, L. V.; MARTINHO, K. S.; NINA, A. L.; CAVIGLIA, F.; DO RIO, R. G. W. Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects *in vivo*. *British Homeopathic Journal*, v. 90, p. 198-203, 2001.

BOUNAN, M. Fondements théoriques du traitement homéopathique des infections 1^a partie : Les défenses anti-microbiennes naturelles. *Homéopathie Française*, v. 77, n. 2, p. 46-51, 1989.

BRANDÃO, L. P.; LARSSON, M. H. M. A.; BIRGEL, E. H.; HAGIWARA, M. K.; VENTURA, R. M.; TEIXEIRA, M. M. G. Infecção natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – relato de caso. *Clínica Veterinária*, v. 36, p. 23-26, 2002.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; FUMAROLA, L.; LEOGRANDE, D.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia*, v. 43, suppl. 1, p. 1-6, 2001.

BRENER, Z.; CAMARGO, E. P. Perspectives of vaccination in Chaga's disease. *Pontifícia Acadêmica. Scientiarum Scripta Varia*, v. 47, p. 145-186, 1982.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

BRENER, Z.; ANDARADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 431p.

BRODSKY, C.I.; SILVA, A.M.; TAKEHARA, H.A.; MOTA, I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology and Cellular Biology*, v. 67, p. 343-348, 1989.

BRUNINI, C.; SAMPAIO, C.; SALAMA, L.C. *Homeopatia: princípios, doutrina e farmácia*. São Paulo: Ed. Mythos, 1993. p.13-26.

BUFFA, J. A.; AUBAGNA, M. D. Eficácia de los autosodes en el tratamiento de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina. *Revista Homeopática*, v. 29, p. 25-27, 1995.

BUKSH, A. R. K. Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 253, p. 339-345, 2003.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis for toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.3, p. 117-118, 1964.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. In: CHUSTER, M. *Cardiopatía Chagásica*. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985. p. 327-355.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl. 11, p. 331-335, 1999.

CARDOSO, L. G.; ECHEVARRIA, A.; ALVES, F. A.; JANSEN, A M.; LEON, L. L. Amidine derivates are highly effective against *Trypanosoma evansi* trypomastigotes. *Microbios*, v. 100, p. 181-187, 1999.

CARILLO Jr, R. *Homeopatia, Medicina Interna e Terapêutica*. São Paulo: Ed. Santos, 2000. 184p.

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

CITRO, M.; ENDLER, P.C.; PONGRATZ, W.; VINIATTERI, C.; SMITH, C.W.; SHULTE, J. Hormone effects by electronic transmission (abstract). *Faseb Journal*, p.12161, 1995.

COSTA, Roberto Andrade. *Homeopatia Atualizada*. Petrópolis: Editora Vozes,1988. 274p.

COSTA, F.; FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; RIBEIRAO, M.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*, v. 16, p. 768-774, 1998.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. *Revista Ciência e Cultura*, v. 55, p. 30-33, 2003.

CUROTTO de LAFAILLE, M.A.; BARBOSA de OLIVEIRA, L.C.; LIMA, G.C.; ABRAHAMSOHN, I.A. *Trypanosoma cruzi*: maintenance of parasite-specific T cell responses in lymphnodes during the acute phase of the infection. *Experimental Parasitology*, v. 70, n. 2, p. 164-174, 1990.

DIAS, E.; LARANJA, F. S.; MIRANDA, A.; NOBREGA, G. Chaga's disease, a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, v. 14, p. 1035-1060, 1956.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BREMER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48-74.

D'IEITEREN, G. D.; AUTHIE, E.; WISSOCQ, N.; MURRAY, M. Trypanotholerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomosis. *Revue Scientifique et Technique*, v. 17, n. 1, p. 154-175, 1998.

FERRAZ, M. L. *Influência de citocinas e células do sistema imune sobre a atividade do inibidor da biosíntese de ergosterol (Pozaconazol) na infecção experimental pelo T. cruzi*. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2005.

FILHO, A. R. *Novo Repertório de Sintomas Homeopáticos*. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Monitoring of clinical, parasitological and serological parameters during an experimental infection of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) with *Trypanosoma evansi*. *Acta Tropica*, v. 58, p. 171-174, 1994.

GARCIA, G. A.; ARNAIZ, M. R.; LAUCELLA, S. A.; ESTEVA, M. I.; AINCIART, N.; RIARTE, A.; GARAVAGLIA, P. A.; FICHERA, L. E.; RUIZ, A. M. Immunological and pathological responses in BALB/c mice induced by genetic administration of Tc 13 Tul antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, v. 132, p. 855-66, 2006.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Fisiopatologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDARADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 431p.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-g treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-b. *European Journal of Immunology*, v. 22, p. 2501, 1992.

GOMES, Y. M. PCR and serodiagnosis of chronic Chaga's disease. Biotechnological advances. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 66, p. 107-119, 1997.

GUEDES, J. R. P. *Glândula Tireoidiana de Rana catesbeiana em ultradiluição homeopática altera a velocidade de metamorfose de girinos da mesma espécie*. 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GRIMAUD, J. A.; ANDRADE, S. A. *Trypanosoma cruzi*: intracellular host-parasite relationship in murine infection. *Cellular and Molecular Biology*, v. 30, n. 1, p. 49-65, 1984.

HAHNEMANN, S. *Doenças Crônicas*. São Paulo: GEHSP "Benoit Mure", 1835. 202p.

HERNANDEZ-BECERRIL N.; NAVA, A.; REYES, P.A.; MONTEON, V. M. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Archivos de Cardiología de México*, v. 71, n. 3, p. 199-205, 2001.

HERRERA, H. M. *Infecção experimental em quatis (Nasua nasua) com Trypanosoma evansi (Steel, 1885) Balbiani, 1888*. 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

HIGUCHI, M.L.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Archives A, Pathological Anatomy and Histology*, v. 423, p. 157-160, 1993.

HOARE, C. A. *The tripanosomes of mamals*. Oxford: Backwell Scientific Publications, 1972. 749p.

HOLLAND, W. G.; DO, T. T.; HUONG, N. T.; DUNG, N. T.; THANH, N. G.; VERCRUYSSSE, J.; GODDEERIS, B. M. The effect of *Trypanosoma evansi* infection on pig performance and vaccination against classical swine fever. *Veterinary Parasitology*, v. 111, n. 2/3, p. 115-123.

HUNTER, C. A. ; ELLIS-NEYES, L. A. ; SLIFER, T. ; LANALY, S. ; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAÚJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, v. 158, p. 3311-3316, 1997.

ITARD, J. African Animal Trypanosomoses. In: *Manual of Tropical Veterinary Parasitology*. Wallingford: CAB International, 1989.

IGBOKWE, I. O.; NWOSU, C. O. Lack of correlation of anaemia with splenomegaly and hepatomegaly in *Trypanosoma brucei* and *T. congolense* infections of rats. *Journal of Comparative Pathology*, v. 117, n. 3, p. 261-265, 1997.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia: sistema imune na saúde e na doença*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 767p.

JONAS, W. B. Does homeopathic nosodes protect against infection? An experimental test. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, v. 5, n. 5, p. 36-40, 1999.

JONAS, W. B.; DILNNER, D. K. Protection of mice from tularemia infection with ultra-low, serial agitated dilution prepared from *Fransicella tularensis* infected tissue. *Journal of Scientific Exploration*, v. 14, n.1, p. 35-52, 2000.

JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L. *Doença de Chagas Manual para Experimentação Animal*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz / Instituto Oswaldo Cruz, 2000. 368p.

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Autoimmunity in Chagas' disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitology Today*, v. 12, p. 396-398, 1996.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology*, v. 116, n. 3, p. 755-760, 1976.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of Immunology*, v. 128, n. 5, p. 2009-2012, 1982.

KUMAR, S. ; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ cells function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, v. 20, 207-216, 1998.

KUMAR, V.; JOSHI, H. C.; KUMAR, M. Therapeutic trials in buffaloes naturally infected with microfilariae of *Setaria cervi*. *Journal of Veterinary Parasitology*, v. 3, p. 125-129, 1989.

LABRE, P. *Homéopathie Vétérinaire chez les Ovins, Bovins et Caprins*. Villeurbanne: Formation et Edition en Médecines Naturelles Vétérinaires, 2001a. 280 p.

LANHAM, S. M.; GODFREY, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, v. 28, p. 521-534, 1970.

LAUCELLA, S. A.; POSTAN, M.; MARTIN, D.; HUBBY FRALISH, B.; ALBAREDA, M.C.; ALVAREZ; M.G.; LOCOCO, B.; BARBIERI, G.; VIOTTI, R.J.; TARLETON, R.L. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *Journal of Infectious Diseases*, v. 189, n. 5, p. 909-918, 2004.

LICON-TRILLO, A.; PEREZ –REYES, R. Kinetics of the humoral immune response in mice immunized against and inoculated with *Trypanosoma cruzi*. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 16, n. 2, p. 119-125, 1994.

LOSOS, G. J. *Infectious tropical diseases of domestic animals*. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, 1986. 983p.

MACHADO, H. H. S. *Eficácia anti-helmíntica de Medicamentos Convencional e Homeopáticos sobre Trichostrongylus colubriformis em coelhos infectados experimentalmente*. 2003. 55 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

MARINO, A. P. M. P. *Migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco durante a fase precoce da infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi: identificação de alvos terapêuticos*. 2005. 100 p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005.

MARTINEZ, J. Patogenesis Homeopática. *Homeopatia (Buenos Aires)*, v. 49, n. 3, p. 168-175, 1997.

MAYER, M.; ROCHA LIMA, H. El comportamiento del Schizotrypanum cruzi in animals homeotermicos y artropodos. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica*, v. 2, p. 9-49, 1954.

MENEZES, V. T.; QUEIROZ, A. O.; GOMES, M. A. M.; MARQUES, M. A. P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitology Research*, v. 94, n. 3, p. 193-200, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Farmacopéia Homeopática Brasileira*. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1997.

MORGAN, J.; DIAS, J.C.; GONTIJO, E.D.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D.G.; POWELL, M.R. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55, p. 355-359, 1996.

NASI, A. M. T. T.; RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A. Emploi de biotherapiques dans le traitement de souris infectées par *Trypanosoma cruzi* resultats preliminaires. *Annales Homeopathiques Françaises*, v. 24, n. 3, p. 53-64, 1982.

NEILL, H. Homeopathic nosodes. *Veterinary Record*, v. 133, p. 48, 1993.

NELSON, R. G.; PARSONS, M.; SELKIRK, M.; NEWPORT, G.; BARR, P. J.; AGABIAN, N. Sequences homologous to variant antigen mRNA spliced leader in Trypanosomatidae which do not undergo antigenic variation. *Nature*, v. 308, n. 5960, p. 665-667, 1984.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Experimental Medicine*, v. 142, n. 1, p. 224-229, 1975.

OLIVEIRA, T. C. G.; MENEGUIN, J. M. Comportamento do *Trypanosoma evansi* (*T. equinum*) em animais de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 41, n. 4, p. 271-277, 1989.

ONAH, D.N.; HOPKINS, J.; LUCKINS, A.G. Effects of *Trypanosoma evansi* on the output of cells from a lymphnode draining the site of *Pasteurella haemolytica* vaccine administration. *Journal of Comparative Pathology*, v. 117, n. 1, p. 73-82, 1997.

PEREIRA, V. R. A. *Imunogenicidade dos antígenos recombinantes CRA e FRA de Trypanosoma cruzi*. 2003. 175 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

PEREIRA, W. K. V.; LONARDONI, M. V. C.; GRESPAN, R.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Infection*, v. 51, p. 157-164, 2005.

PINTO, L. F. *Curso de Formação de Especialista em Homeopatia*. Rio de Janeiro: Instituto Hahnemanniano do Brasil, 2001. Apostila.

PIRMEZ, C.; RIBEIRO dos SANTOS, R. Autoreactivity in chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Ciência e Cultura*, v. 46, p. 418-422, 1994.

PLATA, F.; GARCIA-PONS, F.; WIETZERBIN, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Annales del' Institut Pasteur. Immunologie*, v. 138, n. 3, p. 397-415, 1987.

PUSTIGLIONE, M.; CARILLO Jr. Romeu. *Organon de Samuel Hahnemann*. São Paulo: Homeopatia Hoje, 1994.

QUEIROZ, A. O.; NEHME-RUSSEL, N. S.; BRANDÃO, A.; JANSEN, A. M. Homogeneity of *Trypanosoma evansi* isolates from domestic and sylvatic mammals from the Pantanal of Mato Grosso. *Microbios*, v. 103, p. 27-30, 2000.

QUEIROZ, A. O.; LEGEY, A. P.; XAVIER, S. C. C.; JANSEN, A. M. Specific antibody levels and antigenic recognition of Wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p. 965-972, 2001.

RAHMAN, S. H. A.; KHALID, H. S.; ELMALIK, K. H. In vivo evaluation of *Argemone mexicana* extract on rats inoculated with *Trypanosoma evansi*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 1, n. 4, p. 180-182, 2002.

REIS, G.A.; LOPES, M. F. Resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 153-169.

REVELLI, S.; GOMEZ, L.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O.; BASOMBRI, M.A. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4, 6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 85, n. 2, p. 147-150, 1999.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; CARMO, T. A.; GARCIA, T. A. R.; ALBUQUERQUE, S.; TOLDO, P. R. A. Estudo comparativo dos índices de camundongos tratados com quimioterápicos e trypanosominum (TC D30). *Pesquisa Homeopática*, v. 3, p. 45-49, 1987.

RIBEIRO dos SANTOS R.; ROSSI, M. A.; LAUS, J.L.; SILVA J.S.; SAVINO, W.; MENGEL J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Experimental Medicine*, v. 175, p.29-39, 1992.

SANTOS LIMA, E. C.; MINOPRIO, P. Chaga's disease is attenuated in mice lacking γ T cells. *Immunology and Infectious Disease*, v. 64, p. 215-221, 1996.

SAVI, M. A. *Dinâmica Não-linear e Caos*. Rio de Janeiro: E-papers Editora, 2006. 306 p.

SEIDL, A. F.; MORAES, A. S. ; SILVA, R. A. M. S. *Trypanosoma evansi* control and horse mortality in the Brazilian Pantanal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 5, p. 599-602, 2001.

SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T. *Parasitologia Animal: animais de produção*. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. 158 p.

SILVA, R. A. M. S.; DAVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. In: EMBRAPA. *Carrapato, Tristeza Parasitaria e Tripanossomose dos Bovinos*. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998. p. 122-145.

SINGLA, L. D.; JUYAL, P. D.; AHUJA, S. P. Blood brain barrier status in experimental *Trypanosoma evansi* infected and levamisole treated cow-calves. *Indian Veterinary Journal*, v. 75, n. 2, p. 109-112.

SIZEMORE, R. C.; MANSFIELD, J. M. Lymphocyte function in experimental African trypanosomiasis. VII. Loss of antigen-nonspecific suppressor-T-cell activity. *Cellular Immunology*, v. 87, n. 2, p. 584-591, 1984.

SOARES, M.B.; LIMA, R.S.; ROCHA, L.L.; TAKYIA, C.M.; PONTES-DE-CARVALHO L.; de CARVALHO, A.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS; R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *American Journal of Pathology*, v. 164, p. 441-447, 2004.

SOULSBY, E. J. L. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. Philadelphia: Lea & Fibiger, 1982. 809p.

SUDARTO, M. W.; TABEL, H.; HAINES, D. M. Immunohistochemical demonstration of *Trypanosoma evansi* in tissues of experimentally infected rats and a naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Parasitology*, v. 76, n. 2, p. 162-167, 1990.

TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-12 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *Journal of Immunology*, v. 140, p. 2769-2773, 1988.

TARLETON, R. L. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, v. 73, 106-109, 1991.

TARLETON, R.L., GRUSKY, M. J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L. H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I-and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *International Immunology*, v. 8, p. 13-22, 1996.

TAYLOR, S. M. et al. Efficacy of a homeopathic prophylaxis against experimental infection of calves by the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Veterinary Record*, v. 124, n.1, p. 15-17, 1989.

TOLEDO, M. J. O.; BAHIA, M. T.; VELOSO, M. V.; CARNEIRO, C. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ALVES, C. F.; MARTINS, H. R.; CRUZ, R. E.; TAFURI, W. L.; LANA, M. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, p. 1045-1053, 2004.

UCHE, U.; JONES, T. W. Protection conferred by *Trypanosoma evansi* infection against homologous and heterologous trypanosome challenge in rabbits. *Veterinary Parasitology*, v. 52, p. 21-35, 1994.

UMEDA, M. Experimental studies on pathogenesis of tissue lesions in *Trypanosoma evansi* infection. *Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College*, n. 37, p. 137-139, 1988.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNN, A. M.; JENNINGS. *Parasitologia Veterinaria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273p.

WEISSMAN Z, OBERBAUM M, TOPPER R, BENTWICH Z. Immuno-modulation of the specific immune response to KLH by high dilutions of antigen. In: 6th GIRI Meeting, 1992. *Anais...* Munich, 1992.

WOO, P. T. K. The African trypanosomiasis. Technical report for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Tropica*, v. 27, p. 384-386, 1977.

WYNN, S. G. Studies on use of homeopathy in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 212, n.5, p. 719, 724, 1998.

ZHANG, L.; TARLETON, R. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunohistochemistry: lack of dissociation between susceptibility and type 2 cytokine production. *European Journal of Immunology*, v. 26, p. 102-109, 1996.

ZAPATA-ESTRELLA, H.; HUMMEL-NEWELL, C.; SANCHEZ-BURGOS, G.; ESCOBEDO-ORTEGON, J.; RAMIREZ-SIERRA, M. J.; ARJONA-TORRES, A.; DUMONTEIL, E. Control of *T. cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. *Immunology Letters*, v. 103, n. 2, p. 186-191, 2006.

ZAUZA, P.L.; BORGES-PEREIRA, J. Sera levels of anti-*Trypanosoma cruzi* IgG in the course of chronic chagasic cardiopathy in 10 years. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.

ZAMBRANO, V. S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J.C.; ORTIZ-ORTIZ L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 6, p. 271-278, 2002.

ZOBY, E. C. *Taxionomia Homeopática*. São Paulo: Robe Editorial, 1996. 414p.