

RATTUS NORVEGICUS INFECTADOS COM TRYPANOSOMA CRUZI: EFEITOS CLÍNICOS DO TRATAMENTO COM LYCOPodium CLAVATUM E PHOSPHORUS ULTRADILUÍDOS

Recebido em: 24/02/2023

Aceito em: 28/03/2023

DOI: 10.25110/arqsaude.v27i3.2023-003

Paula Fernanda Massini ¹
Silvana Marques de Araújo ²

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

PALAVRAS-CHAVE: Trypanosoma Cruzi; Doença de Chagas; Medicamentos Ultradiluídos; Ratos Wistar.

¹ Doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, Universidade Estadual de Maringá. E-mail: pfmvasconcelos2@uem.br

² Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Estadual de Maringá. E-mail: silvanamarquesdearaujo@gmail.com

RATTUS NORVEGICUS INFECTED WITH TRYPANOSOMA CRUZI: CLINICAL EFFECTS OF TREATMENT WITH HIGHLY DILUTED LYCOPODIUM CLAVATUM AND PHOSPHORUS

ABSTRACT: Chagas disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* affects millions of people worldwide and does not have an effective drug for its etiological treatment. The available drugs, nifurtimox and benznidazole, have low cure rates with side effects and toxicity that make it difficult for patients to adhere to therapy. This fact drives the search for treatment alternatives that are more effective and less aggressive. Therefore, this work aimed to evaluate the clinical effects presented by *Rattus norvegicus* infected by *T. cruzi* and treated with ultradiluted solutions of *Lycopodium clavatum* or *Phosphorus*. The study involved 93 forty five day old rats intraperitoneally infected with 5×10^6 blood trypomastigotes forms of the Y strain of *T. cruzi*, distributed in the following groups: Healthy SD (n=13) - non-infected and untreated control, CI group (n =27) - infected control and treated with 7% hydroalcoholic solution (ethanol – water), LY group dilution $1:1 \times 10^{26}$ (n=27) - infected and treated with *Lycopodium*, PH group dilution $1:1 \times 10^{26}$ (n=26) - infected and treated with *Phosphorus*. The animals were clinically evaluated through the parameters weight, temperature, water and feed consumption, amount of excreta, intestinal diameter and length, coat appearance and feces consistency. This study showed that the parameters used were important for the clinical definition of infection of *Rattus norvegicus*, Wistar lineage by *T. cruzi*. It showed that LY and PH drugs have beneficial effects on the clinical evolution of treated animals. The use of *Lycopodium clavatum* and *Phosphorus* diluted in the ratio of $1:1 \times 10^{26}$, showed different effects. Eight and six parameters out of fourteen analyzed showed positive effects for LY and PH, respectively. The parameters water and feed consumption, amount of excreta, diarrhea, diffuse alopecia and intestinal length showed significant differences in relation to the infected control, showing that more studies are needed with the use of ultradiluted drugs in *T. cruzi* infection.

KEYWORDS: Trypanosoma Cruzi; Chagas Disease; Ultra-Diluted Drugs; Wistar Rats.

RATTUS NORVEGICUS INFECTADO CON TRYPANOSOMA CRUZI: EFECTOS CLÍNICOS DEL TRATAMIENTO CON CLAVATUM LICOPODIO ALTAMENTE DILUIDO Y FÓSFORO

RESUMEN: La enfermedad de Chagas causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* afecta a millones de personas en todo el mundo y no cuenta con un fármaco eficaz para su tratamiento etiológico. Los fármacos disponibles, nifurtimox y benznidazol, presentan bajas tasas de curación con efectos secundarios y toxicidad que dificultan la adherencia terapéutica de los pacientes. Este hecho impulsa la búsqueda de alternativas de tratamiento más eficaces y menos agresivas. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos clínicos presentados por *Rattus norvegicus* infectados por *T. cruzi* y tratados con soluciones ultradiluidas de *Lycopodium clavatum* o Fósforo. En el estudio participaron 93 ratas de cuarenta y cinco días de edad infectadas intraperitonealmente con 5×10^6 formas tripomastigotes sanguíneas de la cepa Y de *T. cruzi*, distribuidos en los siguientes grupos: SD sano (n=13) - control no infectado y no tratado, grupo CI (n =27) - control infectado y tratado con solución hidroalcohólica al 7% (etanol - agua), grupo LY dilución $1:1 \times 10^{26}$ (n=27) - infectado y tratado con *Lycopodium*, grupo PH dilución $1:1 \times 10^{26}$ (n=26) - infectado y tratado con *Phosphorus*. Los animales fueron evaluados clínicamente mediante los parámetros peso, temperatura, consumo de agua y pienso, cantidad de excrementos, diámetro y longitud intestinal, aspecto del pelaje y consistencia

de las heces. Este estudio demostró que los parámetros utilizados eran importantes para la definición clínica de la infección de *Rattus norvegicus*, linaje Wistar por *T. cruzi*. Demostró que los fármacos LY y PH tienen efectos beneficiosos en la evolución clínica de los animales tratados. El uso de *Lycopodium clavatum* y *Phosphorus* diluidos en la proporción de 1:1x10²⁶, mostró efectos diferentes. Ocho y seis parámetros de los catorce analizados mostraron efectos positivos para LY y PH, respectivamente. Los parámetros consumo de agua y pienso, cantidad de excretas, diarrea, alopecia difusa y longitud intestinal mostraron diferencias significativas en relación al control infectado, mostrando que son necesarios más estudios con el uso de fármacos ultradiluidos en la infección por *T. cruzi*.

PALABRAS CLAVE: *Trypanosoma Cruzii*; enfermedad de Chagas; fármacos ultradiluidos; Ratas Wistar.

1. INTRODUÇÃO

Descrita por Carlos Chagas em 1901 (CHAGAS, 1909), a tripanossomíase americana causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* (COURA, 2003; WHO, 2000), é na atualidade uma das patologias tropicais mais importantes no Brasil e na América Latina. Cerca de oito milhões de pessoas estão infectadas pela zoonose e outros 50,000 novos casos são relatados anualmente nas Américas (SENIOR, 2007; WHO, 2002). Apesar disto, a doença é considerada negligenciada e não conta, até o momento, com uma droga de ação efetiva para o seu tratamento etiológico (COURA, 2003).

As primeiras e únicas drogas disponíveis para o tratamento da infecção chagásica humana, o nifurtimox e o benznidazol, contam com índices de cura muito baixos na fase crônica da doença e apresentam efeitos colaterais e toxicidade que reduzem a adesão dos pacientes ao tratamento (DE CASTRO, 1993; BRENER et al, 2000). Assim, a busca de um medicamento mais eficaz têm sido um dos principais objetivos dos pesquisadores constituindo esperança para a melhoria do tratamento da doença (FERRAZ et al, 2007; ALEIXO et al., 2008).

Estudos recentes relatam que alguns produtos de origem natural são eficazes no tratamento de doenças, promovendo uma ativação do sistema imune e consequente resistência a infecções (BIN- HAFFEZ et al., 2003; MUNGANTIWAR et al., 1999). Neste contexto, substâncias naturais ultradiluídas têm sido avaliadas (BONAMIN et al., 2008; BONAMIN, 2006), e constituem alternativa eficiente e segura de tratar ou contribuir na redução de toxicidade e de efeitos colaterais observados no tratamento de diversas doenças (TEIXEIRA, 2006). Ao longo dos anos, cresce progressivamente a quantidade de pacientes que utilizam este tipo de tratamento, assim como o número de

pesquisadores e experimentos científicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, buscando seus prováveis mecanismos de ação (FERRAZ et al., 2004; ALEIXO et al., 2008).

Em razão dos resultados observados, a organização mundial da saúde – WHO têm estimulado a utilização de medicamentos ultradiluídos, o que aumentou seu consumo e tornou esta opção um dos tratamentos complementares/ alternativos mais utilizados em todo o mundo. No Brasil, com o intuito de incentivar o desenvolvimento de projetos que visem incrementar a disponibilidade destas práticas, o Ministério da Saúde do Brasil aprovou uma “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde” (FERRAZ, 2011).

O rato de laboratório, *Rattus norvegicus*, têm sido um dos animais mais utilizados como modelos experimentais em centros de pesquisa no mundo todo, proporcionando condições ideais de estudos por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhantes à dos humanos (HARKNESS, 1993). Além disto, por seu maior porte em relação ao camundongo permite melhor manejo e coleta de maior quantidade de materiais biológicos o que proporciona a avaliação de maior número de parâmetros em estudos experimentais (WHO, 2002).

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

Embora possam ser identificados na literatura vários artigos (ALMEIDA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2006; ALEIXO et al., 2012; SANDRI et al., 2011) que estudaram o efeito de alguns medicamentos ultradiluídos na infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi*, até quanto nos foi possível avaliar, não foi possível encontrar artigos que mostrassem o efeito de substâncias naturais ultradiluídas sob o curso clínico da infecção de ratos pelo *T. cruzi*.

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná- Parecer 063/ 2012. Todas as

recomendações da lei nacional na experimentação animal (nº 6.638, 05 de novembro, 1979) foram respeitadas.

2.2 Delineamento Experimental

O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio e repetido duas vezes.

2.3 Animais

O estudo envolveu 93 ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) distribuídos em dois experimentos. Os animais eram machos, com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais chegaram ao biotério setorial e permaneceram por sete dias para um processo de adaptação antes do início do experimento. Foram acondicionados em caixas convencionais de polipropileno (dimensão de 30x20x13cm) com tampa de metal contendo divisórias para ração e água (Modelo GC 111 - Beiramar®) de modo que as médias dos pesos iniciais fossem estatisticamente iguais. As caixas permaneceram em biotério climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas. Receberam água e ração (Nuvilab Cr-1® da Nuvital®) ad libitum e o piso da gaiola (forração ou cama) utilizado foi a zeólita clinoptilolita (Zeocel®, Celta Brasil) pela sua alta capacidade de adsorção.

2.4 Infecção

Os animais foram infectados intraperitonealmente com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y, por animal (SILVA, 1953). O número de parasitos foi determinado de acordo com literatura (BRENER, 2000).

2.5 Grupos Experimentais e Tratamento

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

Todos os tratamentos foram oferecidos diluídos em água (10 mL / mL) e oferecidos *ad libitum* no segundo dia antes da infecção e no segundo, quinto e sétimo dia após a infecção. Foram disponibilizados aos animais por 16 horas consecutivas e o

período de tratamento baseou-se na relação entre a ação do medicamento e o efeito que este produz no sistema imunológico animal. Além disso, considerou a evolução específica do *T. cruzi* em roedores (SANDRI et al., 2010; ALMEIDA, 2007). Assim, os tratamentos realizados antes da infecção animal - CI, PH e LY simulam a ação do medicamento quando o sistema imunológico não está em contato com o parasito. Após a infecção, é possível observar a ação do medicamento e do sistema imunológico frente à presença dos parasitas nos períodos que antecedem o pico de parasitemia, exatamente durante o pico máximo e depois dele (SANDRI et al., 2010; ALMEIDA, 2007).

2.6 *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus*:

Substâncias naturais que apresentam efeitos biológicos importantes (QUEIROZ et al., 2006). Os medicamentos *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* foram propostos a partir de resultados observados em estudos anteriores (ALMEIDA et al., 2008; FALKOWISKI et al., 2010). O tratamento com *Lycopodium clavatum* apresentou benefícios em camundongos infectados pelo *T. cruzi* promovendo menores índices de parasitemia, melhor desenvolvimento clínico e maior sobrevida para os animais (FALKOWISKI et al., 2010). O tratamento pré-infecção de camundongos infectados pelo *T. cruzi* com *Phosphorus* modulou a resposta imune do hospedeiro aumentando significativamente a quantidade de linfócitos e atuou na patogenicidade da doença, reduzindo o período de parasitemia patente e o índice de mortalidade, principalmente durante a fase aguda da infecção (ALMEIDA et al., 2008).

As tinturas-mãe de *Lycopodium clavatum* (Doith Homeopathy Union, Alemanha) e de *Phosphorus* (Homeopatia Bento Muri, São Paulo, Brasil) foram preparadas através da maceração dos esporos secos da planta ou do mineral em etanol que atuou como insumo inerte de forma que o teor alcoólico durante e ao final da extração fosse de 90% (V/V). Para alcançar a diluição final (1:10²⁶) foram feitas 13 diluições sucessivas de 1:100. A homogeneização para cada diluição foi procedida com 100 agitações mecânicas (Agitador mecânico Denise 10-50, AUTIC, Brasil) Farmacopéia Homeopática brasileira (1997). Foi utilizado como solvente solução hidroalcoólica a 7%.

2.7 Parâmetros Analisados

Todos os animais foram avaliados clinicamente durante quatro dias antes da infecção, 14 dias consecutivos após a infecção e a cada três dias entre o 15º e 27º dia de

infecção (PEREIRA & NUSSENZWEIG, 1953) em horário fixo às 09h00min. Os dados obtidos eram registrados em fichas de desempenho animal.

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

Temperatura - expressa em grau centígrado, foi aferida individualmente inserindo cuidadosamente o termômetro na região do ânus utilizando termômetro Icel, modelo TD-920.0387.

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

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

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

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

Diâmetro e comprimento intestinal- Foram avaliados aspectos anatômicos do intestino grosso de cinco animais sorteados no grupo SD e CI, quatro animais tratados do grupo LY e quatro animais tratados do grupo PH no 125º dia de infecção. No 315º dia de infecção foram avaliados três animais de cada grupo. Os animais foram sedados (cloridrato de cetamina e xilasina- 1:1, via intramuscular), e submetidos a exames radiológicos com a administração retal de 5,0 ml de sulfato de bário (enema opaco) (OKUMURA, 1961). A dilatação do cólon (diâmetro intestinal) foi mensurada através da utilização de um paquímetro digital (Starret®) na radiografia obtida. Após os exames os animais sofreram eutanásia por aprofundamento anestésico (cloridrato de cetamina 50mg/kg e xilasina-10mg/kg, intraperitonealmente), e o comprimento do cólon foi mensurado com auxílio de uma fita métrica.

2.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados utilizando-se o programa Statistica 8.1 com nível de significância de 5%. Para verificação de normalidade o teste Shapiro-Wilk foi realizado. Quando os dados foram provenientes de distribuição normal, utilizou-se a

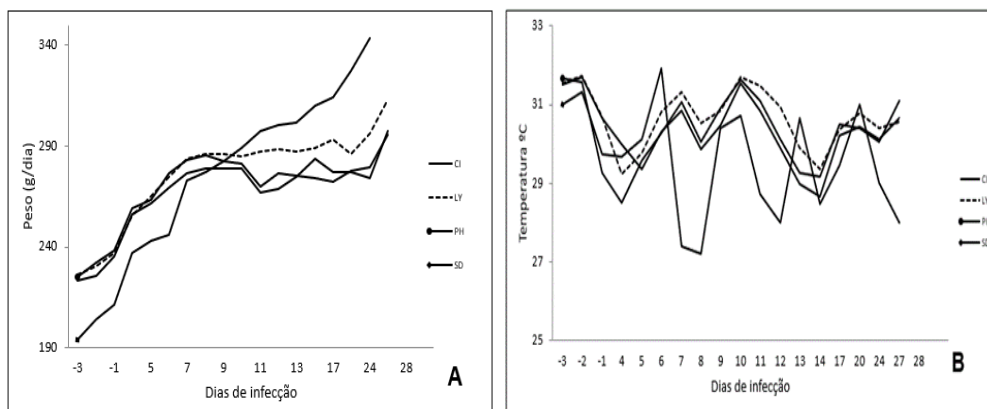
análise de variância (ANOVA) seguida do teste LSD (Least Significant Difference). Os dados não paramétricos foram analisados através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn e para a comparação de proporções foi utilizado o teste Z. Foram considerados os diferentes períodos: Menos 3° ao 4° dia de infecção- período pré-infecção com tratamento ou até o início da constatação da infecção pelo *T. cruzi*, 5° ao 10° dia de infecção- período em que ocorre o pico de parasitemia, 11° ao 27° dia de infecção- quando os níveis parasitemicos caem vertiginosamente com infecção subpatente.

3. RESULTADOS

A curva de peso apresentou evolução característica de animais infectados com menor ganho de peso após o 10° dia de infecção, sem diferença estatística entre os grupos. No entanto, foi possível observar tendência de melhor desempenho no grupo tratado com LY (Figura 1A).

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

Evolução do ganho de peso (A) e temperatura (B) em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* nos diferentes grupos experimentais CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com Lycopodium diluição 1:1x1026, grupo PH- infectado e tratado com Phosphorum diluição 1:1x1026, grupo SD- animais sadios.



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

A figura 2A evidencia o decréscimo do consumo de água de forma contínua e progressiva nos grupos infectados até o 24° dia de infecção quando é possível observar a

recuperação de todos os grupos. No segundo período, 3º ao 10º dia de infecção, o tratamento, independente dos grupos LY ou PH o consumo de água diminuiu ($p=0.0011$, Tabela 1). Do 11º ao 27º dia de infecção o grupo tratado com LY apresentou melhor desempenho já que não foi observada diferença significativa em relação ao controle sadio ($p=0.0003$, Tabela 1).

Tabela 1 - Consumo de água avaliado em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalcolica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorus* 1:1x10²⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Três (3) dias antes da infecção (- 3º) ao 4º dia de infecção, 5º ao 10º dia de infecção, 11º ao 27º dia de infecção. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes números em parênteses representam médias estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

Consumo de água										
Grupo	Menos 3º ao 4º dias			5º ao 10º dia			11º dia ao 27º dia			<i>p</i> **
	n	Média \pm Desvio Padrão	<i>p</i> *	n	Média \pm Desvio Padrão	<i>p</i> *	n	Média \pm Desvio Padrão	<i>p</i> **	
<i>Controle infectado</i>	27	46,4 \pm 5,3		27	43,2 \pm 3,7		19	33,2 \pm 4,4		
<i>Lycopodium</i>	26	43,1 \pm 3,9	0,03691 ⁽¹⁾	25	38,4 \pm 4,0	0,0011 ⁽²⁾	16	34,4 \pm 1,7	0,0003 ⁽³⁾	
<i>Phosphorus</i>	26	44,2 \pm 2,0		26	40,2 \pm 4,0		17	31,4 \pm 3,6		
<i>Sadio</i>	13	47,1 \pm 0,0		3	41,1 \pm 0,0		3	41,8 \pm 0,0		

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

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

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

Evolução do consumo de água (A) e ração (B) em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* nos diferentes grupos experimentais: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶, grupo SD- animais sadios.

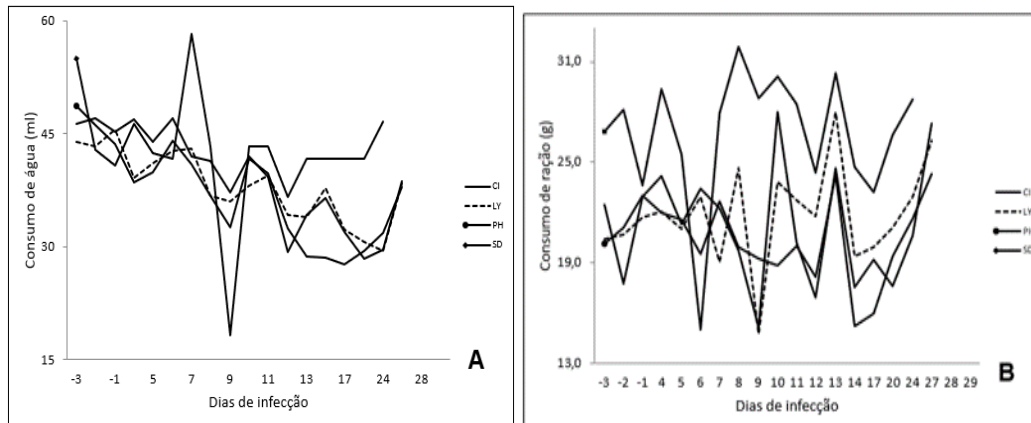


Tabela 2 - Consumo de ração avaliado em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Três (3) dias antes da infecção (- 3°) ao 4° dia de infecção, 5° ao 10° dia de infecção, 11° ao 27° dia de infecção. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes números em parênteses representam médias estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

Grupo	Menos 3° ao 4° dias			5° ao 10° dia			11° dia ao 27° dia		
	n	Média	\pm Desvio Padrão	n	Média	\pm Desvio Padrão	n	Média	\pm Desvio Padrão
Controle infectado	27	21,8	\pm 3,5	27	20,5	\pm 3,1	19	20,1	\pm 3,2
<i>Lycopodium</i>	26	21,4	\pm 4,3	25	19,8	\pm 4,0	16	22,6	\pm 1,7
<i>Phosphorus</i>	26	21,6	\pm 4,5	26	19,8	\pm 2,6	17	19,3	\pm 3,9
Sadio	13	26,9	\pm 3,9	12	26,8	\pm 1,1	3	26,6	\pm 0,1

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

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

Tabela 3 - Quantidade de excretas avaliada em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalcolica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com Phosphorum diluição 1:1x10²⁶. Os animais foram observados em períodos distintos da infecção: Menos 3° ao 4° dia de infecção, 5° ao 10° dia de infecção, 11° ao 27° dia de infecção. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes números em parênteses representam médias estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

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

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

A Tabela 4 mostra os dados para ocorrência de diarreia, piloereção e alopecia difusa para os parâmetros aspecto das fezes e da pelagem obtidos durante todo período de infecção. O tratamento com o LY proporcionou menores índices de diarreia e de alopecia difusa ($p = 0.0404$, Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros clínicos avaliados em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalcolica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com Phosphorum diluição 1:1x10²⁶. *significância estatística ($p < 0.05$).

Grupo	Diarreia		Piloereção		Alopecia difusa	
	n/N (%)	p	n/N (%)	p	n/N (%)	P
CI	9/27 (33,3)	Referência	14/28 (50,0)	Referência	21/28 (75,0)	Referência
SD	0/13 (0,0)	0,0233*	0/13 (0,0)	0,0032*	0/13 (0,0)	0,0001*
LY	1/26 (7,7)	0,0001*	11/26 (42,3)	0,5732	11/26 (42,3)	0,0404*
PH	2/26 (15,0)	0,1321	11/26 (42,3)	0,5732	14/26 (53,8)	0,1729

* p significativo pelo teste Z

O parâmetro diâmetro intestinal (medida utilizando o enema opaco) não apresentou diferença estatística tanto aos 123° dias quanto aos 315° dias de infecção (figura 3). O comprimento intestinal total aos 123° dias de infecção não apresentou diferença estatística, porém aos 315° dias os grupos tratados LY e PH diferiram entre si significativamente ($p = 0,01862$, Tabela 5) com o grupo tratado LY apresentado maior comprimento do que o grupo tratado PH. O comprimento do cólon distal também foi significativamente diferente do grupo tratado com LY para CI ($p = 0,04173$, Tabela 7) com

aumento no comprimento observado no grupo tratado LY. A figura 3, 4 e 5 ilustram os resultados obtidos para os 315º dias após a infecção.

Figura 3- Medidas do comprimento intestinal total, cólon proximal e distal, em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*. A- Medida do comprimento total intestinal, B- cólon proximal e C- cólon distal em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* aos 315 dias de infecção para os grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x1026, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x1026.

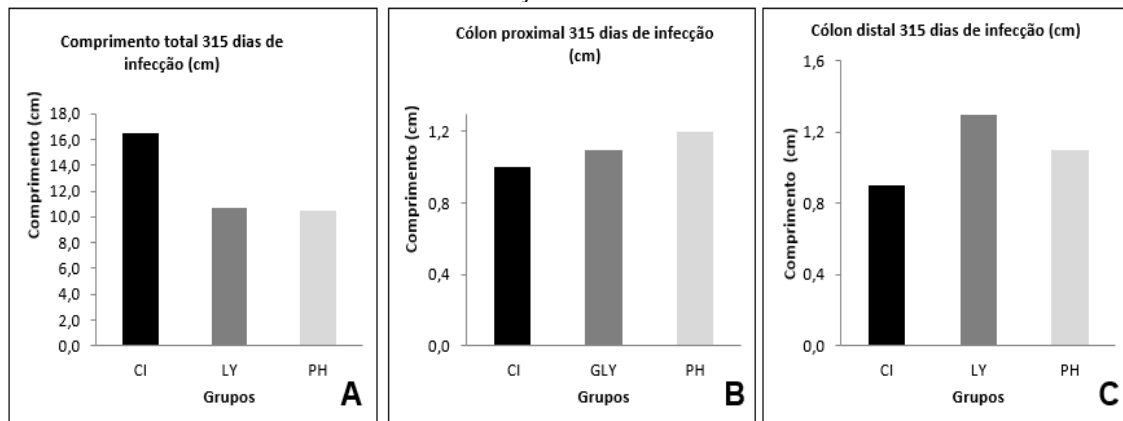


Tabela 5- Avaliação do comprimento intestinal em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Avaliação do comprimento intestinal- Comprimento total, comprimento do cólon proximal, comprimento do cólon distal aos 315 dias de infecção para os diferentes grupos: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium*, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorus* 13CH. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. Os números diferentes representam significância estatística ($p < 0,05$).

Comprimento intestinal												
Grupo	Total (cm)			p^*	Cólon proximal (cm)			p^*	Cólon distal (cm)			p^*
	n	Média	Desvio Padrão		n	Média	Desvio Padrão		n	Média	Desvio Padrão	
Controle infectado	4	16,5	$\pm 1,1$	0,01862 ⁽¹⁾	4	1,0	$\pm 0,1$	0,41293	4	0,90000	$\pm 0,1$	0,04173 ⁽²⁾
<i>Lycopodium</i>	3	18,5	$\pm 1,4$		3	1,1	$\pm 0,0$		3	1,26667	$\pm 0,3$	
<i>Phosphorus</i>	3	13,8	$\pm 2,9$		3	1,2	$\pm 0,3$		3	1,06667	$\pm 0,1$	

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

Figura 4- Enema opaco em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi* aos 315 dias de infecção. Enema opaco em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* aos 315 dias de infecção nos diferentes grupos experimentais: CI- Controle infectado e tratado com solução hidroalccólica 7% (etanol – água), grupo LY- infectado e tratado com *Lycopodium* diluição 1:1x10²⁶, grupo PH- infectado e tratado com *Phosphorum* diluição 1:1x10²⁶. A- CI animal 10, B- LY animal 12, C- PH animal 7. Imagem de duplo contraste de intestino grosso.

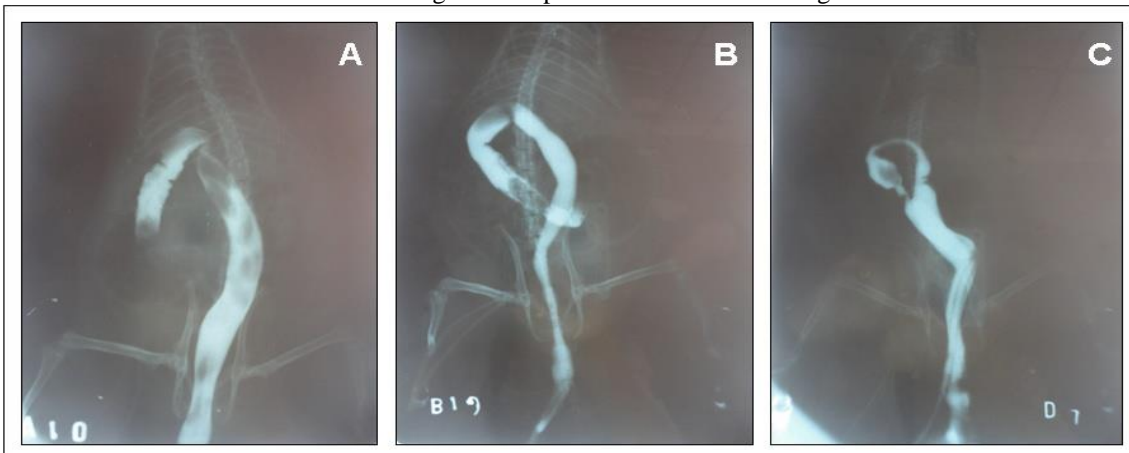


Figura 5- Foto do comprimento intestinal total em ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi*. Foto do comprimento intestinal total em ratos Wistar infectados com 5×10^6 formas tripomastigotas da cepa y de *T. cruzi* aos 315 dias de infecção para os diferentes grupos experimentais: CI- Controle infectado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



4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, ratos da linhagem *Wistar* infectados pelo *T. cruzi* e tratados com *Lycopodium clavatum* e *Phosphorus* mostraram perfis clínicos diferentes na evolução da infecção por *T. cruzi* - cepa Y. Os resultados mostraram benefícios em 8 e 6 de 14 parâmetros estudados para LY e PH: Peso, temperatura, consumo de água e ração,

quantidade de excretas, alopecia difusa e diarreia, frequência cardíaca e respiratória, comprimento intestinal.

É importante destacar que todos os grupos iniciaram o experimento nas mesmas condições clínicas, como animais saudáveis, e foram submetidos a condições ambientais padronizadas, além de o experimento ter sido conduzido como ensaio controlado, cego, randomizado por sorteio e ter sido repetido pelo menos duas vezes. Tal fato proporciona boa qualidade na metodologia utilizada neste experimento, requisito imprescindível para aceitação de resultados científicos de maneira geral e em especial com substâncias altamente diluídas (ANDRADE et al., 2002).

Em modelos animais a quantidade de ingesta tanto de sólidos quanto de líquidos está diretamente ligada às condições de saúde animal. Bem estar, maior ganho de peso e produção economicamente viável, representam o tripé da cadeia da produtividade animal. No presente trabalho, os grupos tratados LY e PH mostraram melhor evolução clínica. Os efeitos observados são indicativos de interferência positiva dos medicamentos diluídos no eixo metabólico neuro-psico-imuno-endócrino, um sistema integrado que promove uma resposta biológica do hospedeiro frente ao parasito e favorece a recuperação clínica dos animais regulando a homeostase orgânica (TEIXEIRA, 2009). Vale destacar a necessidade de explorar a interferência destes medicamentos na modulação das concentrações de citocinas, sobretudo TNF-alfa, relacionada ao ganho de peso (TEIXEIRA, 2009). Os dados obtidos mostram evolução de ganho de peso do grupo tratado LY mais próxima do comportamento dos animais sadios que dos grupos PH e CI, esta dinâmica pode ser detectada visualmente e constatada através da tendência gráfica de melhor desempenho neste grupo.

Com relação ao consumo de água e ração e quantidade de excretas o grupo tratado com LY apresentou melhor desempenho. A literatura deixa claro que após o 10º dia de infecção pelo *T. cruzi*, os animais infectados tendem a obter menor ganho de peso, menor consumo de água e ração, e maiores índices de excretas relacionada à diarreia (SILVA, 1953; BRENER et al., 2000). Em modelos murinos de infecção pelo *T. cruzi* a morbidade está ligada à carga parasitária e a manifestação da doença mais letal está diretamente relacionada ao desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro, o que é caracterizado pelo aumento de debilidade dos animais ao longo da infecção (DESQUESNES, 2010).

A presença de diarreia, piloereção e alopecia difusa nos animais infectados eram esperadas, visto que estas alterações estão presentes no curso da infecção pelo *T. cruzi*

(FALKOWISKI et al., 2010). O aspecto do pelo reflete a condição de adoecimento com acometimento sistêmico, além de estresse na manipulação do animal, mostrando que estar em experimentação já é um fator em si estressante (FALKOWISKI et al., 2010). As fezes amolecidas resultantes da depleção neuronal do plexo miontérico, são consequentes de alterações fisiológicas e funcionais do trato gastrointestinal, o que modifica a consistência das fezes e caracteriza a presença de períodos diarreicos (CARVALHO et al., 2009). O tratamento com LY mais uma vez mostrou benefícios para os animais tratados. Neste grupo a ocorrência de menores índices de diarreia e alopecia difusa reforça a compreensão global de que a terapêutica utilizada estimula o organismo proporcionando melhor condição clínica para que possa reagir contra a dinâmica do adoecimento (TEIXEIRA, 2009). Reforçando este fato, a avaliação da temperatura corporal dos animais mostrou uma condição corporal estável e, mesmo não se mostrando estatisticamente significativa, os grupos tratados não apresentaram a hipotermia característica do agravamento da infecção (SILVA, 1953; BRENER et al., 2000). A especulação do envolvimento de modulação do sistema imunológico neste processo tem base na literatura e a busca dos mecanismos desta melhor condição ainda não está descrita na literatura (TEIXEIRA, 2009).

A utilização do enema opaco avaliou a presença de alteração anatômica intestinal relacionada ao comprimento ou diâmetro do cólon. Estas alterações são consequentes às lesões na camada circular interna do intestino e ao acometimento do sistema nervoso autônomo local durante a fase crônica da doença (SANTOS JÚNIOR, 2002). Aos 315º dias, quando a infecção é considerada crônica, os animais tratados com LY e PH não apresentaram diferenças no comprimento intestinal total em relação ao controle de infecção. No entanto, os animais tratados com PH apresentaram comprimento intestinal total menor que os tratados com Ly. Estes efeitos podem refletir a tentativa do organismo em impedir a complicação da doença, tendência observada nas radiografias, porém não expressa estatisticamente. Assim, também pode ser discutido o maior comprimento do cólon distal observado no grupo tratado LY em relação ao observado no grupo CI. Isoladamente este dado pode ser interpretado como um prejuízo do tratamento instituído. No entanto analisado no conjunto de resultados e baseando-se especificamente nas radiografias obtidas com os animais vivos, verificamos que os grupos tratados LY e PH apresentaram imagens em que os cólons estão menos dilatados que o cólon dos animais controle infectados. Santos Júnior (2002) ressalta que as alterações fisiológicas na enteromegalia da doença de Chagas cursam por conta da denervação, variável individual

em dependência do equilíbrio estabelecido entre o hospedeiro e o *T. cruzi*, relação esta que envolve fatores da reação do sistema imunológico.

Outro dado que remete à reflexão curiosa é que clinicamente, como visto com a maioria dos dados obtidos neste estudo, o tratamento com LY evidenciou benefícios indiscutíveis, mesmo comparados com o outro grupo experimental testado - PH. No entanto, a menor quantidade de diarreia observada no grupo LY estaria ligada ao alargamento do cólon anatomicamente observado, ou uma condição mais estável da saúde dos animais do grupo LY? É certo que os dados da tabela 7 mostram os resultados para este parâmetro nos diferentes grupos e são coerentes com melhoria clínica. No entanto, anatomicamente foi observada dilatação intestinal somente nos animais do grupo LY. Qual seria o significado desta dilatação? Seria o esquema terapêutico importante para este achado? O tempo de acompanhamento clínico destes animais foi suficiente para mostrar o efeito da intervenção medicamentosa na total evolução clínica da infecção? Ela seria decorrente de desnervação como observada na doença de Chagas em humanos ou seria produzida por outros mecanismos? Seria a plasticidade neural versus a homeostase importante neste processo? (Ferrari et al., 2001). Segundo Almeida (2007) o organismo não é passivo nas doenças e lesões, pelo contrário, faz todo um movimento para combatê-las e restabelecer seu equilíbrio. O estado de doença, portanto, é um esforço do organismo para recuperar um equilíbrio perturbado. Não seria este alargamento uma tentativa de reequilibrar os danos que o parasito poderia causar? Estas perguntas e reflexões expressam perspectivas de futuros trabalhos, ou seja, avaliar por maior tempo a evolução destes animais tratados com LY além de estudar histologicamente os neurônios envolvidos neste processo.

Os resultados obtidos mostram que o *Rattus norvegicus* constitui um bom modelo experimental de avaliação clínica de intervenções para infecção experimental pelo *T. cruzi*. Mostram que o tratamento com *Phosphorus* ou *Lycopodium clavatum* trouxeram benefícios aos animais, em concordância com os achados de outros estudos que têm mostrado a capacidade de resposta de sistemas biológicos quando estimulados por soluções ultradiluídas (SHIPLEY et al., 1983; DAVENAS et al., 1987; BILDET et al., 1989; POITEVEN et al., 1998; MESQUITA, 1998; ABEL et al., 2000; BONAMIN, 2001; WAINE, 2001; LONG & ERNST, 2001; STOCK-SCRÖER et al., 2009; FERRAZ, 2011).

REFERÊNCIAS

AABEL, S.; LAERUM, E.; DOLVIK, S.; DJUPESLAND, P. Is homeopathic 'immunotherapy' effective? A double-blind, placebocontrolled trial with the isopathic remedy *Betula 30c* for patients with birch pollen allerg. **Br Homeopathy J**, v. 89, p. 161-168, 2000.

ALEIXO, D.L.; FERRAZ, F.N.; DE MELO, C. S.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.; KANESHIMA, E.N.; Bersani-Amado, C. A.; Araújo, S. M. Changes of RaPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole. **Homeopathy**, v. 97, p. 59-64, 2008.

ALEIXO, D.L.; FERRAZ, F.N.; FERREIRA, E.C.; DE LANA, M.; GOMES, M.L.; DE ABREU FILHO, B.A.; ARAÚJO, S.M. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. **BMC Research Notes**, v.5, p. 352. 2012.

ALMEIDA, L.R. **Efeitos de medicamentos Homeopáticos e Bioterápicos em Camundongos experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi*** (STEEL, 1885) BALBIANI, 1988 e *Trypanosoma cruzi* CHAGAS, 1909. 88 f. Tese (Doutorado em ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2007.

ALMEIDA, R.L.; CAMPOS, M.C.O.; HERRERA, L.V.B.; BONAMIN, L.V.; FONSECA, A.H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopath**, v. 97, p.65-69, 2008.

ANDRADE, A; PINTO SC & OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

BILDET, J.; GUYOT, M.; BONINI, F.; GRIGNON, M.C.; POITEVIN, B.; QUILICHINI, R. The effect of dilutions of *Apis mellifica* and *Apium virus* on ultraviolet light-induced erythema in the guinea pig. **Ann Pharm Fr**, v. 47, p. 24-32, 1989.

BIN-HAFEEZ, R.H.; SUHEL, P.; SUWARNA, P.; IQBAL, S.; RAISUDDIN, S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum gaeum* L.) extract in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 3, p. 257-265, 2003.

BONAMIM, L.V. Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects *in vivo*. **Br Homeopath J**, v. 90, p. 198-203, 2001.

BONAMIN, L.V; LAGACHE, A.; BASTIDE, M. **Research on Ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: The Follow Up**. In: Contributions and contradictions about high dilution research. Ed. Bonamin LV. São Paulo: Signals and Images, 2008: 3-28.

BONAMIN, L.V. Teorias Interpretativas sobre ultradiluições: ilustrações experimentais. **Cultura Homeopática**, v.16, p. 6-17, 2006.

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

CARVALHO, G.D.; MASSENO, A.P.B.; ZANINI, M.S.; ZANIN, S.F.; PORFÍRIO, L.C.; MACHADO, J.P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, v. 56, p. 51-57, 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.1, p. 159-218, 1909.

COURA J. R. Tripanossomose, doença de chagas. **Cienc Cult**, v. 55, p. 1-7, 2003.

DAVENAS, E.; POITEVIN, B.; BENVENISTE, J. Effect of mouse peritoneal macrophages of orally administered very high dilutions of silica. **Eur J Pharmacol**, v.135, p. 313-319, 1987.

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

DESQUESNES, M.; LANA, M. Veterinary Aspects and Experimental Studies. In: AMERICAN TRYPANOSOMIASIS CHAGAS DISEASE: ONE HUNDRED YEAR OF RESEARCH. Edited by TELLERIA J, TIBAYRENC M. London: **Elsevier Inc**, 2010.

FALKOWSKI, G.J.S.; BRAGA, C.F.; ALEIXO, D.L.; SANDRI, P.F.; ARAUJO, S.M. **Parâmetros para avaliação clínica de camundongos em experimentação**. In: Congresso de Homeopatia: uma abordagem sistêmica do ser: 22-27 de novembro de 2010. Recife: 2010. XXX Congresso de Homeopatia, 2010.

Farmacopéia Homeopática Brasileira: Parte I - Métodos Gerais. São Paulo, 1997.

FERRARI, E. A. M.; TOYODA, M. S. S.; FALEIROS, L. Plasticidade Neural: Relações com o comportamento e abordagens experimentais. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.17, p.187-194, 2001.

FERRAZ, F.N.; SIMONI, G.K.; NASCIMENTO, A.D.; MELO, C.S.; ALEIXO, D.L.; GOMES, M.L.; SPAKI, M.; ARAÚJO, S.M. Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy**, v.100, p. 237-243, 2011.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R.T.; ALVES, R.O; URBINA, J.A.; ROMANHA, A. J.; The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 1359-64, 2007.

HARKNESS JE & WAGNER, J.E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. São Paulo: Roca; 1993.

HOLANDINO, C. Chagas disease: an old disease in need of new therapies. **Homeopathy**, v. 97, p. 57-58, 2008.

LONG, L.; ERNST, E. Homeopathic remedies for the treatment of osteoarthritis: a systematic review **Br Homeopath J**, v. 90, p. 37-43, 2001.

MESQUITA, L. P. Homeopathy and physiotherapy with special reference to osteoarthropathy. *Br Homeopath J*, v. 76, p. 16-18, 1998.

MUNGANTIWAR, A. A.; NAIR, A. M.; SHINDE, U. A.; DIKSHIT, V. J.; SARAF, M. N.; THAKUR, V. S.; SAINIS, K. B. Studies on the immunomodulatory effects of Boerhaavia diffusa alkaloidal fraction. *Journal of ethnopharmacology*, v. 65, p. 125-131, 1999.

OKUMURA, M.; CORRÊA NETO, A. Produção experimental de megas em animais de inoculados com trypanosoma cruzi. *Rev. Hosp. Clin. S. Paulo*, v. 16, p. 338-341, 1961.

PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo albino. *Folia clin. Biol*, v. 20, p. 191-207, 1953.

POITEVEIN, B.; DAVENAS E.; BENVENISTE, J. In vitro immunological degranulation of human basophils is modulated by lung histamine and Apis mellifica. *Br J Clin Pharmacol*, v.25, p. 439-444, 1998.

Queiroz AO, Xavier SCC, Faria KG, Bernardo RR, Leitão TCA: Avaliação do bioterápico Trypanosoma cruzi 30 DH: Um estudo in vivo. *Cult Homeopát*, v. 17, p. 9-13, 2006.

SANDRI, P.F.; FALKOWSKI, G.J.S.; HERNANDES, L.; DALALIO, M.O.; ALEIXO, D. L.; GOMES, M. L.; ANÉLIO, D.N.; MOLITERNO, R.A.; ARAÚJO, S. M. **Biotherapeutic of trypanosoma cruzi 17 d increases apoptosis in experimentally infected mice.** Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH on International Journal of High Dilution Research, 2011, 2011:119-124.

SANDRI, P. F. **Influência da idade sobre os efeitos do bioterápico 17 dH na infecção decamundongos pelo Trypanosoma cruzi.** Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Estadual de Maringá, Biociências aplicadas à Farmácia, Maringá, 2010.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Megacólon - Parte II: Doença de Chagas. *Rev bras Coloproct*, v. 4, p. 266-277, 2002.

SENIOR, K. Chagas disease: moving towards global elimination. *Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 572-581, 2007.

SHIPLEY, M.; HEDLEY, B.; BROSTER, G.; JENKINS, M. CLOVER, A.; WILLIAMS, I. Controlled trial of homoeopathic treatment of osteoarthritis, *Lancet*, v.1, p. 97-98, 1983.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clínica Biologia*, v. 20, p. 191-201, 1953.

STOCK-SCHRÖER, B.; ALBRECHT, H.; BETTI, L.; ENDLER, P. C.; LINDE, K.; LÜDTKE, R.; MUSIAL, F.; WIJK, R.; WITT, C.; BAUMGARTNER, S. Reporting experiments in homeopathic basic research (REHBaR) – A detailed guideline for authors. *Homeopathy*, v. 98, p. 287- 298, 2009.

TEIXEIRA, M. Z. Possíveis contribuições do modelo homeopático à humanização da formação médica. *Revista Brasileira de Educação médica*, v. 33, p. 454-463, 2009.

Teixeira, M. Z. Homeopatia ciência, filosofia e arte de curar. **Rev Med**, v. 85, p. 43, 2006.

WAYNE, J.; YU, L.; FRANK, T. Neuroprotection from glutamate toxicity with ultra-low dose glutamate. **Neuroreport**, v. 12, p. 335-339, 2001.

Who. Chagas' Disease, Chile *In* Weekly epidemiological record. v. 75, p. 9-16, 2000.

Who. Control of Chagas disease. **Technical Reports Series**, v. 905, p. 1-109, 2002.

Who. Estrategia de la OMS. *Sobre medicina tradicional*, 2002.

ANEXOS

Lista de abreviaturas

WHO- Organização Mundial da Saúde;

SD – Grupo controle sadio não infectado e não tratado;

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

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

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

LSD- Teste *Least Significant Difference*;

TNF- Fator de necrose tumoral;