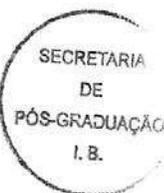


**KARINA PONTIN MAMEDE**

**“ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE  
BIOTERÁPICOS HOMEOPÁTICOS OBTIDOS POR  
DIFERENTE METODOLOGIAS FARMACOTÉCNICAS SOBRE  
*LEISHMANIA (VIANNIA) BRASILIENSIS*”**

**CAMPINAS  
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KARINA PONTIN MAMEDE

**“ESTUDOS DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE  
BIOTERÁPICOS HOMEOPÁTICOS OBTIDOS POR  
DIFERENTES METODOLOGIAS FARMACOTÉCNICAS SOBRE  
*LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Karina Pontin Mamede</i> <i>[Signature]</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
---

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Campinas

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M31e	<p>Mamede, Karina Pontin, 1977-</p> <p>Estudo das propriedades biológicas de bioterápicos homeopáticos obtidos por diferentes metodologias farmacotécnicas sobre <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> / Karina Pontin Mamede. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Sérgio de Albuquerque. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Leishmania braziliensis</i>. 2. Bioterápicos. 3. Leishmaniose – Terapia. I. Albuquerque, Sérgio de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Study of the biologic properties of homeopathic biotherapics obtained from different pharmacotecnical methodologies over *Leishmania (Viannia) braziliensis*

**Palavras-chave em Inglês:**

*Leishmania braziliensis*

Biotherapics

Leishmaniasis - Therapy

**Área de concentração:** Parasitologia

**Titulação:** Doutor em Parasitologia

**Banca examinadora:**

Sérgio de Albuquerque [Orientador]

Regina Maura Bueno Franco

João Aristeu da Rosa

José Clóvis do Prado Junior

Marilisa Guimarães Lara

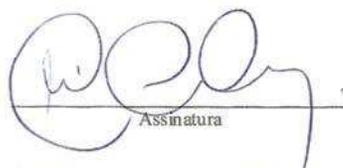
**Data da defesa:** 09-05-2012

**Programa de Pós Graduação:** Parasitologia

Campinas, 9 de maio de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque (Orientador)

  
Assinatura

Profª. Dra. Regina Maura Bueno Franco

  
Assinatura

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

  
Assinatura

Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

  
Assinatura

Profª. Dra. Marilisa Guimarães Lara

  
Assinatura

Profª. Dra. Ana Maria Guaraldo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profª. Dra. Mara Cristina Pinto

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profª. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## RESUMO

MAMEDE, K. P. **Estudo das propriedades biológicas de bioterápicos homeopáticos obtidos por diferentes metodologias farmacotécnicas sobre *Leishmania (Viannia) Braziliensis***. 2012. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Departamento de Biologia Animal - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, a prevalência das diferentes formas de leishmaniose (tegumentar e visceral) ultrapassou 12 milhões de casos. A leishmaniose constitui um importante problema de saúde pública especialmente na América Latina e Central, África e esporadicamente na Europa e América do Norte. No Brasil, a leishmaniose cutânea é causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, a mucocutânea por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a visceral por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O principal tratamento das infecções causadas por esse parasito é baseado principalmente no uso de antimoniais pentavalentes que, apesar da relativa eficácia, essas drogas são altamente tóxicas, provocando efeitos colaterais graves, além de determinar certa resistência parasitária. Diante disso, faz-se necessário o estudo de novas drogas eficazes para o tratamento da leishmaniose com menos efeitos colaterais. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a eficácia de diversos tipos de Bioterápicos homeopáticos nas escalas Centesimal (CH) e Decimal (DH), utilizando diferentes processos de preparação, com o intuito de proporcionar uma melhor eficácia no tratamento a leishmaniose, com menores taxas de efeitos colaterais. Para tal, foram utilizados *Mus musculus*, machos, infectados experimentalmente com  $2,0 \times 10^4$  formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Os animais foram divididos em: grupo controle positivo, tratados com Glucantime; controle negativo, tratados com solução fisiológica; grupos infectados e não infectados tratados com o Bioterápico 1 (obtidos por formas promastigotas inativados pelo método do ultra-som), Bioterápico 2 (obtidos de formas amastigotas inativados por álcool 70%), Bioterápico 3 (obtidos por formas promastigotas inativados por álcool 70%), Bioterápico 4 (obtidos de formas amastigotas mais sangue de camundongos infectados) e Bioterápico 5 (obtidos de formas amastigotas mais sangue de animais infectados e mix homeopático. Os

Bioterápicos 2, 3 e 4 foram preparados nas escalas centesimal e decimal. O tratamento ocorreu por um período de 60 dias, com exceção do controle positivo que foi administrado conforme o padrão terapêutico do medicamento. Após o tratamento, realizou-se provas hematológicas em todos os animais, a fim de verificar possíveis efeitos dos Bioterápicos em relação ao desenvolvimento de suas células sanguíneas. Os resultados demonstraram que os animais tratados com o Bioterápico 2 na escala decimal (DH) apresentaram uma maior redução na lesão leishmaniótica em relação aos outros grupos, porém não o suficiente para alcançar a cura parasitológica. Em relação às provas hematológicas, os resultados mais significativos observados foram aumento de monócitos nos grupos infectados e tratados com os Bioterápicos, aumento do número de macrófagos, principalmente para os grupos tratados com os Bioterápicos 2 e 3 na escala decimal, o que leva a pensar em uma possível estimulação do sistema imunológico pelos Bioterápicos utilizados.

Palavras - Chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Bioterápico, Leishmaniose - Terapia

## ABSTRACT

According to the last estimative of the World Health Organization, the prevalence of the distinct forms of leishmaniasis (tegumentar and visceral) exceeded 12 million people. Leishmaniasis is considered an important health problem in Central and south America, Africa and seldom in Europe and North America. In Brazil, cutaneous leishmaniasis is caused mainly by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, the mucocutaneous by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and the visceral by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. The main clinical treatment for these infections is based in the use of pentavalente antimonials, which presents a partial efficacy, being extremely toxic and triggering serious side effects, besides the fact of causing parasitic resistance to drug. So the use of alternative drugs with less collateral side effects for the treatment of leishmaniasis has been the goal of several researchers. This work has as objectives to evaluate the effectiveness of homeopathic biotherapies in the Centesimal (CH) and Decimal (DH) scales, using different processes of manufacturing in the attempt to induce a better efficiency for leishmaniasis. For this purpose it was used male *Mus musculus* experimentally infected with  $2,0 \times 10^4$  promastigote forms of *L. braziliensis*. Animals were divided in groups: positive control group, Glucantime treated animals, negative control, treated with saline solution; infected and uninfected animals treated with Biotherapeutic 1 (manufactured using promastigote forms inactivated by ultra-sound), Biotherapeutic 2 (manufactured using promastigote forms inactivated by ultra-sound), Biotherapeutic 2 (manufactured using amastigote forms inactivate with alcohol 70%), Biotherapeutic 3 (manufactured using promastigote forms inactivated with alcohol 70%), Biotherapeutic 4 (manufactured from amastigote forms added with blood of infected mice) and Biotherapeutic 5 (manufactured from amastigote forms added with blood infected animals and homeopathic mix). The biotherapeutics 2, 3 e 4 were prepared in the centesimal and decimal scales. Treatment was applied for a period of 60 days, with exception of the positive control, which was administered according to the directions of the drug. After finished the therapeutic treatment, hemogram of all animals was done in order to verify possible harmful effects on the blood red and white cells. Our data revealed that treated

with biotherapeutic 2 in the decimal (DH) scale displayed a more effective reduction in the leishmaniotic lesion as compared to other groups, although not sufficient to induce the parasitological cure. Concerning to the hemogram, a monocytosis was observed for infected animals treated with distinct biotherapies. It was also found enhanced number of macrophages mainly for groups treated with Biotherapies 2 and 3 in the decimal scale. These data points in the direction of a possible stimulation of the host's immune response, triggered by these biotherapies.

**Key-Words:** *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Biotherapeutic, Leishmaniasis - Therapy

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Tratamento contra a Leishmaniose .....	4
2.2. Homeopatia .....	10
2.3. Diferenças entre vacina e bioterápico homeopático .....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>18</b>
<b>a) Preparações dos Bioterápicos a serem utilizados</b> .....	<b>18</b>
a1) Bioterápico 1 .....	18
a2) Bioterápico 2 .....	18
a3) Bioterápico 3 .....	19
a4) Bioterápico 4 .....	19
a5) Bioterápico 5 .....	19
a6) Mix homeopático .....	19
<b>b) Parasito</b> .....	<b>21</b>
b1) Cultivo e obtenção das promastigotas .....	21
<b>c) Manutenção do Parasito</b> .....	<b>21</b>
<b>d) Animais</b> .....	<b>22</b>
<b>e) Ensaio biológico</b> .....	<b>22</b>
<b>f) Hematologia</b> .....	<b>26</b>
f1) Exame hematológico .....	26
f2) Microhematócrito .....	26

f3) Contagem de Eritrócitos e Leucócitos em câmara de Neubauer .....	27
f4) Contagem específica de Leucócitos .....	27
f5) Contagem de Plaquetas .....	27
<b>g) Análise estatística .....</b>	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>a) Avaliação do diâmetro médio das lesões .....</b>	<b>29</b>
<b>b) Avaliação hematológica .....</b>	<b>50</b>
b1) Eritrócitos .....	50
b2) Leucócitos .....	52
b3) Hematócrito .....	54
b4) Hemoglobina .....	56
b5) Macrófagos .....	58
b6) Plaquetas .....	61
b7) Neutrófilos .....	63
b8) Monócitos .....	65
b9) Linfócitos .....	66
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus nosso Senhor, por ter-me colocado nesta vida, neste caminho, nesta oportunidade, perto de pessoas especiais com as quais compartilhei, desfrutei e vivi esta grande experiência. Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

### Meus agradecimentos

Aos meus pais, não existem palavras para expressar o que vocês fizeram e fazem por mim.

Meu agradecimento será eterno.

Amo vocês!

A minha tia Áurea, a minha irmã Tati e a Dolinha, pela ajuda, dedicação, carinho, atenção, descontração nos momentos difíceis. Obrigada por tudo!

As minhas amigas Mirian e Jana, obrigada por tudo que vocês fizeram por mim.

Adoro vocês!

Ao meu Orientador Prof.Dr. Sérgio de Albuquerque, obrigada por me transmitir seus conhecimentos, obrigada pela paciência e dedicação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior e a Prof. Dra. Vanda Toth e a Prof. Dra. Elza Guimarães Lara agradeço a compreensão, carinho e apoio que me deram no decorrer deste trabalho.

A todos os amigos que conheci na realização deste trabalho, principalmente as pessoas do laboratório de parasitologia da Usp, as quais me ajudaram na realização deste trabalho.

E finalmente aos amores da minha vida, Fabrício e Melissa, só tenho a dizer: obrigada por vocês existirem.

Vocês são a minha alma, o meu corpo, a minha luz ....

Vocês são a minha vida!

## Abreviaturas

WHO - Organização Mundial de Saúde

LTA - Leishmania Tegumentar Americana

IC - Coeficiente de inibição

DL - Dose Letal

OMS - Organização Mundial de Saúde

TM - Tintura mãe

LIT - Liver Infusion Tryptose

LV - Leishmania Visceral

DH - Decimal Hanemaneano

CH - Centesimal Hanemaneano

TC D30 - Trypanosominum TC D30

Mix Homeopático - Misturas de medicamentos descritos na Farmacopéia Homeopática

IL - 4 - Interleucina 4

IL -10 - Interleucina 10

IL- 12 - Interleucina 12

Th1 - Resposta celular

Th2 - Resposta Humoral

INF - $\beta$  - Interferon  $\beta$

INF- $\alpha$  - Interferon  $\alpha$

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

*Leishmania* compreende um gênero de protozoários tripanosomatídeos, causadores da leishmaniose, sendo transmitidos ao homem por meio da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo.

A leishmaniose é endêmica em muitas regiões tropical e subtropical do mundo, tendo uma incidência mundial de dois milhões de casos por ano e prevalência de 12 milhões de pessoas infectadas, avaliando-se em 350 milhões a população exposta ao risco de contrair a infecção (WHO, 2011), ocorrendo cerca de 50 000 mortes/ano (DNDi, 2012).

As leishmanioses são definidas como infecções causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que se caracterizam por apresentar três formas evolutivas dentro de seu ciclo biológico, ocorrendo tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado: promastigota, paramastigota e amastigota (GRIMALDI, 1982).

O ciclo biológico desse protozoário ocorre em dois estágios: dentro do aparelho digestivo do inseto vetor, sob a forma promastigota e paramastigota, e no interior de macrófagos dos hospedeiros vertebrados, sob a forma amastigota. Para a maturação de seus ovos, a fêmea do flebotomíneo (gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) necessita de sangue e, ao picar um indivíduo, inocula com sua saliva as formas promastigotas infectantes (formas metacíclicas). Os macrófagos atraídos ao local da picada são infectados pelos parasitas. Estes se diferenciam em formas amastigotas e dividem-se, levando as células à ruptura e liberando parasitas que infectarão novos macrófagos (PETERS, 1995).

---

---

Os macrófagos atraídos ao local da picada são infectados pelos parasitas por meio de uma seqüência de interações entre parasita e hospedeiro: adesão ao macrófago, entrada para o macrófago por fagocitose, sobrevivência do parasita no interior do macrófago, diferenciação da forma promastigota para amastigota e multiplicação intracelular das formas amastigotas. Essas interações são mediadas por receptores presentes nos macrófagos (CHANG & CHAUDHURI, 1990). O ciclo biológico completa-se quando um flebotomo faz seu repasto sanguíneo em um indivíduo contaminado. No inseto vetor, o parasita passa à forma promastigota não infectante (procíclica), sofre metaciclogênese e passa para a forma infectante (metacíclica). Essas formas migram do trato digestório para o aparelho sugador do vetor para iniciar, em seguida, nova infecção no hospedeiro vertebrado (PETERS, 1995).

Quanto à sobrevivência das formas amastigotas no hospedeiro vertebrado dentro do fagolisossomo, várias são as estratégias que o parasita emprega para escapar dos mecanismos de defesa que ocorrem antes, durante e após a entrada nas células do hospedeiro. Esses mecanismos incluem o processo da lise pelo complemento, o efeito tóxico dos intermediários reativos do oxigênio durante o “burst” respiratório, induzido pelos macrófagos e as atividades microbicidas das hidrolases lisossomais e do óxido nítrico. Além disso, outro aspecto importante da sobrevivência das formas amastigotas envolve a interação amastigota-macrófago, os mecanismos da multiplicação intracelular do parasita, ruptura da célula hospedeira e invasão de novas células (PETERS, 1995).

A leishmaniose constitui um importante problema de saúde pública especialmente na América Latina e Central, África e esporadicamente na Europa e América do Norte (MARSDEN, 1984). No Brasil, a leishmaniose cutânea é causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; a mucocutânea por

---

---

*Leishmania (Viannia) braziliensis* e a visceral por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (GOMES et al. 2008).

Além dos casos normalmente reportados, a leishmaniose, hoje, participa do quadro de doenças oportunistas da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em várias áreas do mundo (GRANDONI & GRAMICCIA, 1994). A forma mucocutânea da doença pode manifestar-se em um prazo consideravelmente curto, após o surgimento da lesão inicial (12 a 24 meses). Eventualmente, a lesão primária pode não ocorrer, vindo a doença a se manifestar anos depois, como lesão nasobucofaringeana, em pacientes imunodeprimidos (MACHADO, 1992).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é definida como doença infecciosa, crônica, caracterizada pelo comprometimento da pele, mucosa e cartilagens. Segundo a OMS, a LTA ocupa o segundo lugar entre as seis doenças infecto-parasitárias mais freqüentes no mundo (SAMPAIO & RIVITTI, 1998).

A apresentação clínica da doença cutânea produzida por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, agente etiológico da LTA, caracteriza-se por lesões ulceradas com bordas elevadas, endurecidas e violáceas, podendo variar de casos benígnos à casos onde ocorre o desfiguramento facial, tornando uma lesão cutânea-mucosa (MARSDEN, 1985a). Ainda, Marsden (1985b) relata que cinco por cento dos pacientes com lesões nas mucosas evoluem para morte, devido à ocorrência de complicações generalizadas.

---

---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Tratamento contra a Leishmaniose

A utilização de medicamentos contra esta infecção parasitária teve início significativo a partir das observações de Gaspar Vianna, por ter sido o primeiro a utilizar os antimoniais no tratamento da LTA em 1912, sob a forma trivalente (YAN-JIA, 1982).

Em 1920, foi produzido pela primeira vez um antimonial na sua forma pentavalente, por Bramachi, o qual nessa década teve particular importância na Índia, sendo utilizado no tratamento da Leishmaniose Visceral (LV) sob a forma de um sal aminado do ácido para-amino-fenil-estibínico. O autor apontava para sua menor toxicidade comparado com o Tártaro Emético (NAPIER, 1927).

Os antimoniais pentavalentes são, ainda, as drogas de escolha para o tratamento da leishmaniose, sendo eficazes em 80% dos pacientes, mas apresentam problemas como toxicidade, administração parenteral e dificuldade para estabelecer as quantidades reais de antimônio nas preparações utilizadas (MARSDEN, 1985b; FRANCO, 1992). As formulações dos antimoniais pentavalentes mais utilizadas são o Antimoniato de Meglumina ou Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o Estibogluconato de Sódio (Pentostan®) (VERONESI & FOCACCIA, 2002).

Além da ação leishmanicida, os antimoniais pentavalentes podem aumentar o índice fagocitário de neutrófilos, favorecendo o aumento da defesa anti-infecciosa (PASTORINO et al., 2002). No entanto, apesar da alta eficiência, estas substâncias são altamente tóxicas e podem não ser efetivas em manifestações severas das formas mucocutâneas. Os efeitos colaterais

---

---

mais graves são a cardiotoxicidade com anormalidades eletrocardiográficas, a hepatotoxicidade com aumento do nível de enzimas hepáticas e mais raramente, nefrotoxicidade (VERONESI & FOCCACIA, 1999).

Apesar de todos esses efeitos colaterais, os antimoniais pentavalentes são considerados como principais fármacos no tratamento da leishmaniose, e o mecanismo de ação desses fármacos ainda não estão bem esclarecidos. Alguns autores acreditam que os antimoniais trivalentes estão relacionados com a alteração do potencial redox de tióis do parasito. Tal alteração aconteceria por indução do efluxo de tióis e por inibição da enzima Tripanotona Redutase (WYLLIE et al., 2004).

Para que o antimonial pentavalente consiga atuar contra a forma amastigota do parasito, esse deve conseguir penetrar no interior da célula hospedeira e atravessar a membrana do fagolisossomo; além disso, faz se necessário que o antimonial pentavalente seja reduzido em trivalente (OUELLETTE et al., 2004). Brochu et al. (2003) demonstraram, em *Leishmania donovani*, que somente a forma amastigota do parasito é capaz de reduzir o antimonial pentavalente em trivalente.

A anfotericina B não tem aplicações terapêuticas tão favoráveis como os antimoniais pentavalentes, pois requerem longa terapia e freqüentemente induzem efeitos tóxicos e colaterais tais como febre, calafrios e náuseas. Porém sua ação é potencializada quando ele é incorporado a lipossomos. A pentamidina tem ação inferior aos antimoniais e apresenta maior toxicidade; alguns estudos indicam que o alopurinol é um candidato promissor ao tratamento, substituindo os antimoniais pentavalentes em certas infecções de *Leishmania*. A pouca opção de drogas efetivas contra parasitas protozoários agrava-se ainda mais pela resistência apresentada por certos parasitas (OUELLETE & PAPADOPOULOU, 1993). Segundo Croft & Coombs

---

---

(2003), a anfotericina B surge como segunda opção no tratamento das leishmanioses viscerais e tegumentares em pacientes que não respondem aos antimoniais.

Novos compostos, de utilização oral, tornaram-se recentemente uma alternativa interessante (SUNDAR, 2002; JHA et. al., 1999). O avanço mais significativo foi o tratamento oral de leishmaniose visceral com miltefosina, uma alquilfosfocolina originalmente desenvolvida como um medicamento anticâncer (CROFT & COOMBS, 2003). A miltefosina também se mostra eficiente no tratamento de leishmaniose cutânea (SOTO et al., 2001), além de estar sendo utilizada no tratamento de leishmanioses caninas (CROFT & COOMBS, 2003). O mecanismo de ação da miltefosina ainda é desconhecido, mas está relacionado com a modulação do metabolismo de alquil-lípideos e a biossíntese de fosfolípideos (LUX et al., 2000).

Recentemente, Marinho et al., (2011) propuseram que a miltefosina atua no processo de morte celular programada, determinada pela expressão de fosfatidilserina e incorporação de iodeto de propídio, o que culmina na fragmentação de DNA.

Apesar de ainda não ter sido relatado casos clínicos de resistência à miltefosina, a mesma pode ser facilmente induzida *in vitro* (PEREZ-VITÓRIA et al., 2003).

A pesquisa de novos medicamentos com atividade leishmanicida já é largamente relatada na literatura científica, onde vários autores observam atividade biológica em diferentes níveis, com substâncias de diferentes origens (animal, vegetal e sintética) sem, no entanto, encontrarem nenhuma substância capaz de substituir com segurança aquelas já existentes (FOURNET et al., 1994; HEPBURN et al., 1994; BERMAN., 1997; SANTOS, 1997; ARSMSON et al., 1999; KAYSER et al., 2000; KEDZIERSKI et al., 2006).

A avaliação de produtos naturais, principalmente aqueles que possuem origem vegetal, talvez seja a maneira mais viável de se buscar substâncias que possam substituir os

---

---

medicamentos utilizados no tratamento de leishmaniose existente hoje em dia, de uma forma mais segura e com limitação de efeitos secundários ao tratamento.

A observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies vegetais. Metabólitos secundários tais como alcalóides, terpenóides, considerados no passado como inativos, são hoje ferramentas importantes no tratamento e investigação clínica. (MONTANARI & BOLZANI ET, 2001).

Um programa de *screening* de vegetais para o combate à leishmaniose foi iniciado na Guiana Francesa, em 1984, baseado em conhecimento etnofarmacológico da população local, onde a partir da avaliação *in vitro* de diversos extratos vegetais, sobre formas promastigotas e amastigotas e *in vivo* sobre animais experimentalmente infectados com *L.amazonensis*, foi demonstrada a excelente eficácia de *Faramea guianensis* sobre todos os estágios de desenvolvimento do parasito (SAUVAIN et al., 1994).

Compostos que estimulam o sistema imunológico são úteis quando usados como adjuvantes no tratamento de certas doenças causadas por fungos, bactérias e protozoários, como na leishmaniose. Nesse caso, estudos químicos e imunofarmacológicos têm sido realizados com o intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis, de efeito específico e que reverta à resistência do parasita aos fármacos.

A utilização de compostos baseados em estruturas complexas, como proteínas e/ou peptídeos foi relatada por Ramos et al. em 2000, onde os autores avaliaram o veneno de serpente irradiado sobre as formas promastigotas de *Leishmania*. Foi observada excelente eficácia desse tipo de composto, onde o IC<sub>50</sub> encontrado foi de 95 ng/mL, sendo o mesmo considerado insignificante quando comparado ao DL<sub>50</sub> que foi de 0,5 mg/Kg.

---

---

Dentre as numerosas plantas com potencial na modulação da resposta imune na leishmaniose, a *Kalanchoe pinata* tem demonstrado efeito sobre a redução das lesões em camundongos de linhagem susceptível, pelo aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (BERGMANN et al., 1997).

Plantas pertencentes ao gênero *Holarrhena* (Apocynaceae) estão distribuídas por uma ampla área da África e da Índia, estendendo-se ao sudeste da Ásia. A composição química de algumas espécies africanas e indianas tem sido investigada; sabe-se que essas espécies possuem vários alcalóides esteroidais do tipo aminopregnano. Os extratos de clorofórmio e etanol das folhas de *H. curtisii* demonstraram uma significativa atividade contra a *Leishmania donovani*, podendo estar relacionada ao seu efeito citotóxico (KAM, 1997).

Fármacos derivados de plantas, que não foram testadas até os dias atuais nos tripanosomatídeos, foram avaliadas por Araujo et al. (1998). Os componentes extraídos da *Centrolobium sclerophyllum* (Leguminosae) foram avaliados sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e os resultados demonstraram uma eficaz atividade antileishmanial.

Outra espécie *Solanum lyratum* (Solanaceae), utilizada na medicina coreana, também aumenta a produção de óxido nítrico produzido por células da cavidade peritoneal de camundongos, o que sugere possível atividade terapêutica no tratamento da leishmaniose (KIM et al., 1999).

O gênero *Guarea* possui 150 espécies de árvores e arbustos na América tropical e 20 espécies na África. Entretanto, oito dessas espécies têm sido investigadas quimicamente, sendo que um determinado número vem sendo utilizado na medicina tradicional para tratamento de diferentes doenças, tendo seus efeitos sido demonstrados experimentalmente.

---

---

Em pesquisas utilizando protótipos de fármacos com atividade sobre protozoários e provenientes de vegetais, descobriu-se que o extrato metabólico do *Guarea rhopalocarpa* proporciona uma eficaz atividade terapêutica, visualizada sobre a multiplicação de formas promastigotas de *Leishmania donovani*, sendo que o triterpenóide lanostrano 23-hidroxi-5a-lanosta-7,9(11),24-trieno-3-ona apresentou valor de IC<sub>50</sub> de 7,2µM, inferior ao demonstrado pelo pentostam (500µM) (CAMACHO et al., 2000).

O extrato etanólico de *Yucca filamentosa* demonstrou excelente atividade sobre *L.amazonensis* em uma concentração de 5µg/mL (PLOCK et al., 2001), sendo que o autor não apresenta a substância responsável por essa atividade.

A avaliação da atividade de extratos de *Annona muricata*, realizados na Colômbia, demonstraram que o vegetal apresentava atividade superior ao antimoniato de meglumina sobre *L.braziliensis* e *L.panamensis*. Os extratos metanólico, hexânico e em acetato de etila desse vegetal demonstraram efetividade a uma concentração próxima de 1,0 mg/mL para ambas as espécies avaliadas, enquanto o Glucantime apresentou atividade a uma concentração próxima a 4,0 mg/mL (JARAMILLO et al., 2000).

Apenas o vegetal *Croton cajucara* vem sendo utilizado com sucesso contra parasitas do gênero *Leishmania*. Seus efeitos em *L. amazonensis* têm sido investigados extensivamente, principalmente *in vitro*, onde alterações morfológicas significativas sobre formas promastigotas foram observadas após a aplicação de 15ng/mL de seu óleo essencial, determinando destruição da cromatina nuclear e do cinetoplasto do parasito, o que resultou em lise celular (ROSA et al., 2003). No caso de tratamento de cultura de macrófagos obtidos de camundongos pré-infectados, os autores observaram uma redução de 50% das formas do parasita,

---

---

além do aumento em níveis de 60% na produção de óxido nítrico desses macrófagos pré-infectados.

Há o relato também que o linalool, um álcool triterpênico, é o maior constituinte desse óleo e apresenta maior atividade leishmanicida que o óleo de origem, demonstrando valores de IC<sub>50</sub> de 8,3 ng/mL e 22ng/mL para promastigotas e amastigotas, respectivamente para o óleo, e de 4,3 ng/mL e 15,5 ng/mL para o linalool, sobre as mesmas formas do parasito, sem demonstrar qualquer efeito tóxico sobre os macrófagos não infectados.

Rocha et al. (2005), em uma revisão da literatura descreve mais de 100 vegetais que apresentam atividade leishmanicida, demonstrando assim a importância da avaliação de mecanismos terapêuticos alternativos para o tratamento da leishmaniose.

Associado a esse fator, a dificuldade de se encontrar uma vacina efetiva contra o parasito, referendam a necessidade de buscas de novas substâncias (TABBARA, 2006).

## 2.2. Homeopatia

Homeopatia é uma especialidade médica e farmacêutica que consiste em ministrar aos doentes, doses diluídas e dinamizadas para evitar a intoxicação e estimular a reação orgânica. A palavra Homeopatia foi criada por Hahnemann, e advém do grego, que significa ómois, “semelhante”, e páthos, “doente”. Designa o método terapêutico baseado na lei natural de cura *similia similibus*, ou seja, semelhante será curado pelo semelhante. Trata-se, portanto, de um sistema científico e filosófico bem determinado, com metodologia de pesquisa própria, que se apoia em dados da experimentação clínica de fármacos e de medicamentos homeopáticos no homem sadio, para sua posterior aplicação no homem doente. Medicamentos homeopáticos

---

---

permitem diminuir os efeitos tóxicos da substância original e aumentar o seu potencial curativo, por um processo chamado dinamização (FONTES et al, 2000).

O Doutor Richard Haehl, o melhor biógrafo de Hahnemann, calcula que o ano de 1796 foi realmente o ano do nascimento da homeopatia. Em 1790, numa anotação à Matéria Médica de Cullen, Hahnemann salientara a relação de similitude por meio da intoxicação pela quinina e as curas obtidas com tal planta. Realizou-se, então, a primeira experiência “patogenética” em si mesmo. Hahnemann se informou que a quina, presente na casca da cinchona, seria eficiente contra malária por sua ação adstringente, como afirmava Cullen, o qual além de médico, era químico, e sabia que existiam adstringentes mais potentes do que a quina. Por isso, Hahnemann resolveu estudar mais e durante vários dias, ele tomou doses de quinino, registrando suas reações pormenorizadamente, e para o seu espanto, começou a sentir os sintomas da malária, um após o outro, apesar de não estar com a doença. Os sintomas se repetiam sempre que ele tomava uma dose de quinino e duravam algumas horas. Se não tomasse quinino, não apresentava os sintomas (DEMARQUE, 2002).

A partir daí, passou a realizar experimentações em si com várias outras substâncias, e após obter pesquisa minuciosa dos “perfis de drogas” que compilara, seguiu para uma próxima etapa de experimentação em pessoas doentes, a fim de verificar se elas se beneficiariam ou não. Antes disso, procedia exames físicos e interrogatórios detalhados sobre os sintomas e observava uma possível melhora ou agravamento da saúde geral, o modo como viviam e a perspectiva de vida. Após isso, elaborou um “quadro de sintomas” para cada paciente e descobriu que, quanto mais próxima à combinação entre os sintomas do paciente e aqueles causados pela substância administrada ao indivíduo são, melhor sucedido era o tratamento (HAHNEMANN, 1984).

---

---

De acordo com Demarque (2002), como algumas substâncias eram venenosas, Hahnemann aplicava doses em pequenas diluições. Alguns de seus pacientes relatavam uma piora dos sintomas, antes de qualquer melhora, então, criou um processo de diluição seguida de sucussão, o que resultaria nas dinamizações, e acreditava, por meio deste método, liberar a energia da substância. Ele continuou a fazer experiências com a diluição de medicamentos até o fim da vida, utilizando soluções cada vez mais fracas, que, paradoxalmente, tornavam-se cada vez mais potentes.

A Lei dos Semelhantes ou também chamada princípio da Analogia foi utilizado empiricamente na medicina desde tempos remotos. Hahnemann teve como precursores vários médicos, em especial, Hipócrates e Paracelso, que por meio de suas obras difundiram a Lei dos Semelhantes. Essa lei rege um princípio de ordem farmacológica em que: qualquer substância capaz de provocar em um indivíduo sadio, porém sensível, determinados sintomas, é capaz de curar, desde que em doses adequadas, um indivíduo que apresente um quadro mórbido semelhante (FONTES et al, 2000).

Foi assim que a homeopatia surgiu e tem por característica um tratamento que contempla a totalidade do ser humano e não apenas as doenças isoladamente; menos agressivo, que atua através de estímulo energético e não por efeito químico de drogas.

A Homeopatia encontra-se nos dias de hoje confrontada e desafiada pela ciência atual, pois necessita comprovar seus princípios (SOUZA, 1999). Faz-se necessário, portanto, que a Homeopatia, frente aos avanços científicos e metodológicos, atualize seus métodos de pesquisa, visando comprovar o que Hahnemann instituiu em sua nomenclatura original, a partir de suas observações experimentais e clínicas. A pesquisa homeopática deve, portanto, caminhar em três direções complementares para dar sustentação, comprovação, além de

---

---

ampliar suas teorias e práticas. Esses aspectos envolvem a pesquisa básica da físico-química, dos ensaios biológicos experimentais e dos estudos clínicos controlados.

Essa lei foi a primeira e, talvez, nela se resumem todos os princípios das Leis naturais da Homeopatia. Hipócrates já se referia a este princípio e também a dualidade do ser humano. Celsus afirmava que o próprio escorpião seria ótimo remédio contra si mesmo; Basílio Valentino, monge beneditino do século XV, afirmava que “os iguais devem ser tratados por meio de seus iguais e não pelos seus contrários” e Paracelsus enunciava o princípio: “o que produz a icterícia também cura icterícia e todas as suas espécies. De maneira igual, o remédio que curará a paralisia, deve proceder daquilo que a causa; e nesse sentido, agimos de acordo com o método de cura pelos arcanos” (VANNIER, 1994).

Os insumos utilizados na medicina homeopática são obtidos de todos os reinos (vegetal, mineral, animal) e ainda de elementos complementares como os bioterápicos. O reino vegetal contribui com maior número de matérias primas e utiliza-se, geralmente, de plantas coletadas em seu habitat natural que são usadas em estado fresco para a obtenção da tintura-mãe (TM) ou preparações básicas, as diluições e dinamizações. As de origem mineral ou química compreendem substâncias simples ou compostas e são preparadas por trituração ou diluição, dependendo da solubilidade dos excipientes e veículos homeopáticos, o que permite a utilização de matérias-primas, tais como, sal marinho, o petróleo e outros (ABECASSIS, 1980). As de origem animal incluem-se as tinturas-mãe preparadas com animais inteiros vivos, como *Apis mellifica*, *Formica rufa*, ou dessecados, como *Cantharis*, *Coccus cacti* ou ainda, de venenos, como *Lachesis muta*, *Crotalus horridus*, dentre outros. Os organoterápicos são preparados a partir de órgãos frescos liofilizados de animais sadios, e os opoterápicos, são preparados a partir de pó de órgãos dessecados (ABECASSIS, 1980).

---

---

Segundo Pozetti (1990), a patogenesia de uma dada substância compreende o conjunto de sintomas que essa substância proporciona no indivíduo sadio, quando a ele é ministrada em doses sub-tóxicas. Dessa forma, com a experiência no “Homem sadio” se demonstra o princípio dos Semelhantes, o princípio fundamental da homeopatia.

Preparações realizadas à partir de produtos biológicos, denominados de bioterápicos, compreendem as secreções, excreções, tecidos e órgãos patológicos ou não, produtos de origem microbiana, bem como os alérgenos. Estes podem ser classificados em bioterápicos de estoque, que são produtos cujo insumo ativo é constituído por amostras preparadas e fornecidas por laboratórios especializados, e o isoterápicos, que se dividem em autoisoterápicos onde o insumo ativo é obtido do próprio paciente como cálculos, fezes, sangue, secreções, urina, e só a ele destinados, e heteroisoterápicos, onde os insumos ativos são externos ao paciente e que, de alguma forma, o sensibilizam como os alérgenos, poeira, pólen, solventes, e outros (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

Após Hahnemann, temos um hiato em relação às pesquisas científicas usando-se diluições infinitesimais (preparados homeopáticos) que começou a ser preenchido por trabalhos como os de Wurmser (1957) e Vischiniac (1965), que evidenciaram a atividade do preparado homeopático em experimentação animal.

### **2.3. Diferenças entre vacina e bioterápico homeopático**

A vacina, na homeopatia, não pode ter o mesmo conceito da alopatia, pois na vacinação são inoculados agentes morbígenos, atenuados, previamente preparados com o objetivo de proporcionar uma resposta imunológica contra esse antígeno, produzindo-se assim,

---

---

anticorpos. Para Kossak (1984), vacina não é homeopatia, pois nada se tem a ver com a sintomatologia global do indivíduo que a recebe, é um método pasteuriano que emprega substâncias dissemelhantes, em doses reduzidas, porém, ponderáveis em organismos sadios. Já a homeopatia é um método hahnemaniano. Quando se elabora à patogenesia de um isopático, esse se torna potencialmente um medicamento homeopático para os casos de concordância sintomática, que emprega substâncias semelhantes, em doses mínimas ou infinitesimais, em organismos doentes.

Hahnemann (1984) relatou que algumas moléstias, como varíola e sarampo, explicam que, quando inoculada no indivíduo, esse terá febre vacínica, provocando uma erupção cutânea geral de outra natureza. No entanto, uma vez inoculada após formação da erupção cutânea, cura-se permanentemente, de maneira homeopática, pela semelhança deste miasma acessório.

No caso dos bioterápicos, tem-se um produto quimicamente não definido, que serve de matéria-prima para preparações bioterápicas de uso homeopático (DIAS, 2001). Hahnemann não foi o primeiro médico homeopático a tratar animais com o mesmo agente etiológico, causador da patologia, empregando, nesses casos, as secreções autógenas. Desta maneira, aplica-se à terapêutica pela isopatia (do grego *Isos* = igual). Méndez (1997) considera os bioterápicos como um recurso terapêutico onde se busca incentivar a ação biológica do medicamento, por meio da energia que ele contém. Com isso, inibi-se a ação patógena do agente, provocando ativação das defesas imunológicas.

Dada a importância que a leishmaniose possui no contexto nacional e internacional, relacionando-se, principalmente, o aumento da incidência da manifestação parasitária em diversos países do mundo, bem como pelas dificuldades encontradas na

terapêutica, o interesse pela pesquisa de novas substâncias com atividade biológica sobre *Leishmania*, vem sendo ampliado com o intuito de obter novos compostos, capazes de atuarem contra o parasita, porém desprovidos dos graves efeitos colaterais.

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Verificar a eficácia de bioterápicos preparados por diferentes métodos farmacotécnicos, a partir do cultivo de formas promastigotas e isolamento de amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, obtidos de lesão de animal infectado, sangue de animais infectados e medicamentos homeopáticos (Mix homeopáticos), avaliados em ensaios biológicos *in vivo*.
2. Analisar, paralelamente, as possíveis alterações dos parâmetros hematológicos dos animais submetidos ao tratamento, a fim de verificar a existência de correlação dessas variáveis com a atividade biológica das diferentes preparações.

---

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Em continuidade às observações realizadas por Pontin (2002), novos bioterápicos baseados em diferentes preparações farmacotécnicas foram confeccionados, a fim de avaliar suas atividades *in vivo* sobre animais experimentalmente infectados com *L.(V.) braziliensis*, como segue:

### ***a) Preparações dos Bioterápicos a serem utilizados***

a1) Bioterápico 1: as formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis*, cultivadas no meio de LIT “Liver Infusion Tryptose” modificado, foram inativadas por meio de ultra-som durante 4 horas. Após este período, 5 µL do meio foram colocados sobre a lâmina onde foi observado, por meio de microscopia óptica, se as formas promastigotas estão inativas e/ou lisadas. O volume obtido por esse procedimento foi diluído em solução fisiológica a 0,9%, também denominada “solução mãe” (FARMACOPÉIA HOMEOÁTICA BRASILEIRA, 1997).

a2) Bioterápico2: foi obtido a partir de formas amastigotas provenientes de lesões de camundongos *Mus musculus* infectados com *L. (V.)braziliensis*, diluindo e dinamizando com etanol a 70% o material até as potências desejadas, sendo na escala centesimal hanemaneano (CH), a 30, 200, 500 e 1000CH, e na escala decimal hanemaneano a 30 DH.

---

---

a3) Bioterápico 3: foi realizado o mesmo procedimento descrito para o Bioterápico 1, diferenciando apenas no modo de inativação que foi por diluição das formas promastigotas em etanol 70%, as potências em análise foram na escala centesimal, 30, 200, 500 e 1000CH e na escala decimal, 30DH.

a4) Bioterápico 4 – foi obtido pelo mesmo procedimento do Bioterápico 2, acrescentando sangue de camundongo infectado com *L.(V.) braziliensis*, as potências em análise foram na escala decimal, 12, 30 e 200 DH e na escala centesimal, 3,30,100,e 200 CH.

a5) Bioterápico 5: foi obtido pelo mesmo procedimento do Bioterápico 2, acrescentando sangue de camundongo e uma mistura de medicamentos homeopáticos para tratamento de pele (Antimonium tartaricum 3DH, Thuya 5CH, kali bich 3 CH, Arsenicum 3DH) (CAIRO, 1979), as potências em análise foram 6, 30 e 100CH.

a6) Tratamento 6 (mix.homeopático)– foi obtido de medicamentos homeopáticos para tratamento de pele. (Antimonium tartaricum 3DH, Thuya 5CH, kali bich 3 CH, Arsenicum 3DH) (CAIRO, 1979), as potências foram as mesmas do Bioterápicos 5.

OBS) Os Bioterápicos 2, 3 e 4 foram preparados na diluição decimal (DH) e centesimal (CH) para poder comparar as possíveis diferenças durante os tratamentos.

---

---

Ao final do processo farmacotécnico, foi realizada avaliação da esterilidade do medicamento em relação ao parasita, inoculando-se por via subcutânea 100 µL do mesmo em camundongos saudáveis.

Sabendo-se que o Bioterápico 1 está descrito pela Farmacopéia Homeopática Brasileira de 1997, o segundo, terceiro, quarto e o quinto Bioterápicos serão avaliados e comparados metodologicamente como diferentes métodos de inativação. Logo após a preparação, foram realizadas as confecções farmacotécnicas das devidas potências dos diferentes Bioterápicos. As referidas escalas foram processadas de acordo com a Farmacopéia Homeopática Brasileira (2011).

Ponto de partida: para a Escala Centesimal (diluição 1:100) o veículo utilizado até a 3CH foi a solução fisiológica 0.9%, seguindo o mesmo veículo da solução mãe, já para a escala Decimal (diluição 1:10) esse mesmo veículo foi utilizado até a 6DH, as potências intermediárias foram realizadas com etanol à 70% servindo como solução estoque. De acordo com a Farmacopéia, o veículo para a potência desejada é o etanol 30%, porém neste experimento foi realizado com solução fisiológica 0.9%, evitando assim problemas no tratamento, como a morte precoce dos animais. O líquido a ser dinamizado deverá ocupar 2/3 da capacidade do frasco utilizado na preparação, sendo succionado 100 vezes, pelo processo manual, onde a succussão foi executada por meio de um movimento contínuo e ritmado, no sentido vertical, com o antebraço, de modo que produza choque do fundo do frasco contra um anteparo semi-rígido. As dinamizações de 200, 500 e 1000 CH foram realizadas em fluxo contínuo.

---

---

**b) Parasito**

Foi utilizada cepa de *L. (V.) braziliensis*, isolada de um caso humano atendido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e que vem sendo mantida no laboratório, por meio de repiques em camundongos BALB/c e em meio de cultura axênico.

**b1) Cultivo e obtenção das formas promastigotas**

Para o cultivo das formas promastigotas utilizou-se meio de cultivo axênico Liver Infusion Tryptose (LIT) modificado de acordo com (SANTOS, 2003) e o meio GRACE (GIBCO – Invitrogen), suplementado com hemina 1%, soro bovino fetal 10% e 5000U/mL de estreptomicina. As formas promastigotas foram coletadas durante o período de crescimento exponencial do parasita. A incubação dos referidos meios foram realizados por um período de 7 dias, à temperatura de 22°C.

**c) Manutenção do Parasito**

Formas amastigotas foram mantidas em camundongos BALB/c por meio de inoculações via subcutânea de  $1,5 \times 10^3$  parasitas na base da cauda.

As formas promastigotas foram mantidas em meio de cultura LIT modificado, em estufa Incubadora para BOD Mod 347F, marca FANEM em temperatura média de 22°C, no laboratório de Parasitologia.

---

---

**d) Animais**

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, da linhagem BALB/c, machos, recém desmamados, fornecidos pelo CEMIB – Centro Multidisciplinar para pesquisas Biológicas da Faculdade Estadual de Campinas – UNICAMP, mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia durante o decorrer dos experimentos.

**e) Ensaios biológicos**

Camundongos pesando aproximadamente 20 a 25 g, foram infectados experimentalmente com  $2 \times 10^4$  formas promastigotas, inoculadas subcutaneamente na base da cauda dos animais. Após o aparecimento do nódulo inicial da lesão que normalmente ocorre em torno de 30 a 40 dias, o tratamento iniciou-se de acordo com o seguinte protocolo:

**GRUPO I:** grupo controle negativo - 10 animais infectados e tratados com solução de cloreto de sódio 0,9%;

**GRUPO II:** grupo controle positivo – 10 animais infectados e tratados com Glucantime® (Antimoniato de N-metil glucamina) na dosagem de 80mg/Kg de peso corporal.

**GRUPO III:** grupo tratado com o Bioterápico 2 (forma amastigota inativada por álcool 70%) - 10 animais infectados e tratados nas potências 30, 200, 500 e 1000CH, no período de 15 dias para cada potência;

---

---

**GRUPO IV:** grupo tratado com o Bioterápico 2 (forma amastigota inativada por álcool 70%) - 10 animais infectados e tratados na potência 30DH;

**GRUPO V:** grupo tratado com o Bioterápico 3 (forma promastigota inativada por álcool 70%)- 10 animais infectados e tratados nas potências 30, 200, 500 e 1000CH, no período de 15 dias para cada potência;

**GRUPO VI:** grupo tratado com o Bioterápico 3 (forma promastigota inativada por álcool 70%) - 10 animais infectados e tratados na potência 30DH;

**GRUPO VII:** grupo tratado com o Bioterápico 1 (forma promastigota inativada por ultra-som) - 10 animais infectados e tratados nas potências 30, 200, 500 e 1000CH, no período de 15 dias para cada potência;

**GRUPO VIII:** grupo tratado com Bioterápico 5 (mix homeop/sang/amast.) – 10 animais infectados e tratados nas potências 6, 30 e 100CH , no período de 20 dias para cada potência;

**GRUPO IX:** grupo tratado com o Tratamento 6 (mix.homep.) – 10 animais infectados e tratados nas potências 6, 30 e 100CH, no período de 20 dias para cada potência;

**GRUPO X:** grupo tratado com Bioterápico 4 (sang/amast.) - 10 animais infectados e tratados nas potências 3, 30, 100 e 200CH no período de 15 dias para cada potência;

---

---

**GRUPO XI:** grupo tratado com Bioterápico 4 (sang/amast.) - 10 animais infectados e tratados nas potências 12, 30 e 200DH , no período de 20 dias para cada potência;

**GRUPO XII:** grupo tratado com o Bioterápico 2 (forma amastigota inativada por álcool 70%) - 5 animais não infectados e tratados nas potências 30 200, 500 e 1000CH, no período de 15 dias para cada potência (prova hematológica);

**GRUPO XIII:** grupo tratado com o Bioterápico 2 (forma amastigota inativada por álcool 70%) - 5 animais não infectados e tratados na potência 30DH (prova hematológica);

**GRUPO XIV:** grupo tratado com o Bioterápico 3 (forma promastigota inativada por álcool 70%)- 5 animais não infectados e tratados nas potências 30, 200, 500 e 1000CH, no período de 15 dias para cada potência (prova hematológica);

**GRUPO XV:** grupo tratado com o Bioterápico 3 (forma promastigota inativada por álcool 70%) – 5 animais não infectados e tratados na potência 30DH (prova hematológica);

**GRUPO XVI:** grupo tratado com o Bioterápico 1 (forma promastigota inativada por ultra-som ) - 5 animais não infectados e tratados nas potências 30, 200, 500 e 1000CH, no período de 15 dias para cada potência (prova hematológica);

---

---

**GRUPO XVII:** grupo tratado com Bioterápico 5 (mix homeopático/sangue/amastigota) – 5 animais não infectados e tratados nas potências 6, 30 e 100CH, no período de 20 dias para cada potência (prova hematológica);

**GRUPO XVIII:** grupo tratado com o Tratamento 6 (mix homeopático) – 5 animais não infectados e tratados nas potências 6, 30 e 100CH, no período de 20 dias para cada potência (prova hematológica);

**GRUPO XIX:** grupo tratado com Bioterápico 4 (sangue/amastigota) - 5 animais não infectados e tratados nas potências 3, 30, 100 e 200CH, no período de 15 dias para cada potência (prova hematológica);

**GRUPO XX:** grupo tratado com Bioterápico 4 (sangue/amastigota) – 5 animais não infectados e tratados nas potências 12, 30 e 200DH, no período de 20 dias para cada potência (prova hematológica);

Os tratamentos foram administrados por via oral, durante um período de dois meses sem intervalo, à exceção do controle positivo que foi administrado conforme o padrão terapêutico do medicamento. No início do tratamento todos os grupos foram tratados com os bioterápicos na potência mais baixa de acordo com o protocolo adotado. Após esse período de tratamento, as potências foram alteradas para dinâmizações mais altas, previamente estabelecidas para cada grupo de tratamento. Ressalta-se que esta alteração, quando adotada, foi em todos os grupos, mudando-se apenas o tipo do bioterápico.

---

---

Durante o período de tratamento, as extensões das lesões foram avaliadas utilizando-se paquímetro digital. Essa avaliação foi utilizada como parâmetro clínico auxiliar de cura.

Cinco animais de cada grupo foram mortos ao fim do tratamento, para realização das provas hematológicas, comparativamente. Os demais animais foram acompanhados diariamente, a fim de verificar a evolução clínica.

### ***f) Hematologia***

#### f1) Exame hematológico

Após a morte do animal, foi coletado cerca de 1,0 mL de sangue em um tubo plástico, contendo 0,05µL de Heparina Sódica (1ml: 5.000U.I. - ORGANON TEKNIKA), para realização do exame hematológico, de acordo com MOURA et al. (2002):

#### f2) Microhematócrito

A técnica utiliza tubos capilares de 3mm de diâmetro heparinizados. O sangue é coletado até  $\frac{3}{4}$  do seu volume total, selando-se uma das extremidades pelo aquecimento e submetendo-o a uma centrifugação em alta rotação por 5 minutos, em centrífuga especial capaz de exercer uma força de 12.000g.

O volume ocupado pelos eritrócitos é medido por meio de uma escala padronizada, sendo o resultado expresso em porcentagem (%).

---

---

### f3) Contagem de Eritrócitos e Leucócitos em Câmara de Neubauer

A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada utilizando-se pipeta de Thoma para glóbulos vermelhos e brancos, respectivamente. Utilizou-se para diluição de eritrócitos a Solução de Gawer e para os leucócitos a Solução de Turk (DACIE & LEWIS, 1984).

O resultado foi obtido por contagem em Câmara de Neubauer do número de elementos em suas respectivas áreas, multiplicado pela diluição adotada e pelo fator de conversão. Os valores foram apresentados em número de células/mm<sup>3</sup>.

### f4) Contagem específica de Leucócitos

A contagem específica de leucócitos foi avaliada por meio de esfregaços delgados sangüíneos, coradas pelo corante de Leishmann.

### f5) Contagem de Plaquetas

A contagem de plaquetas foi realizada segundo o Método de Brecher & Cromkite (1950), que utiliza como diluente a solução de oxalato de amônio a 1%. Trata-se de um método direto, onde o diluente promove a lise dos eritrócitos e leucócitos, deixando livre as plaquetas, permitindo uma melhor visualização e contagem em Câmara de Neubauer.

### ***g) Análise estatística***

Para a realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o programa gráfico GraphPad Prism, v.4.0, onde foram aplicados os métodos paramétricos para a comparação dos resultados obtidos pelo tratamento dos animais infectados e verificação de possíveis alterações hematológicas. Para os resultados referentes à variação do diâmetro médio das lesões com o

decorrer dos dias de tratamento foi utilizado o método Two-Way ANOVA, com o pós teste de Bonferroni, tendo-se como parâmetro o grupo de animais pertencentes ao controle negativo. Para as avaliações decorrentes dos parâmetros hematológicos utilizou-se o método estatístico One-Way ANOVA, com o pós teste de Dunnett, realizando-se a comparação entre todos os grupos avaliados frente aos grupos controle positivo e negativo, pertinente aos parâmetros hematológicos observados.

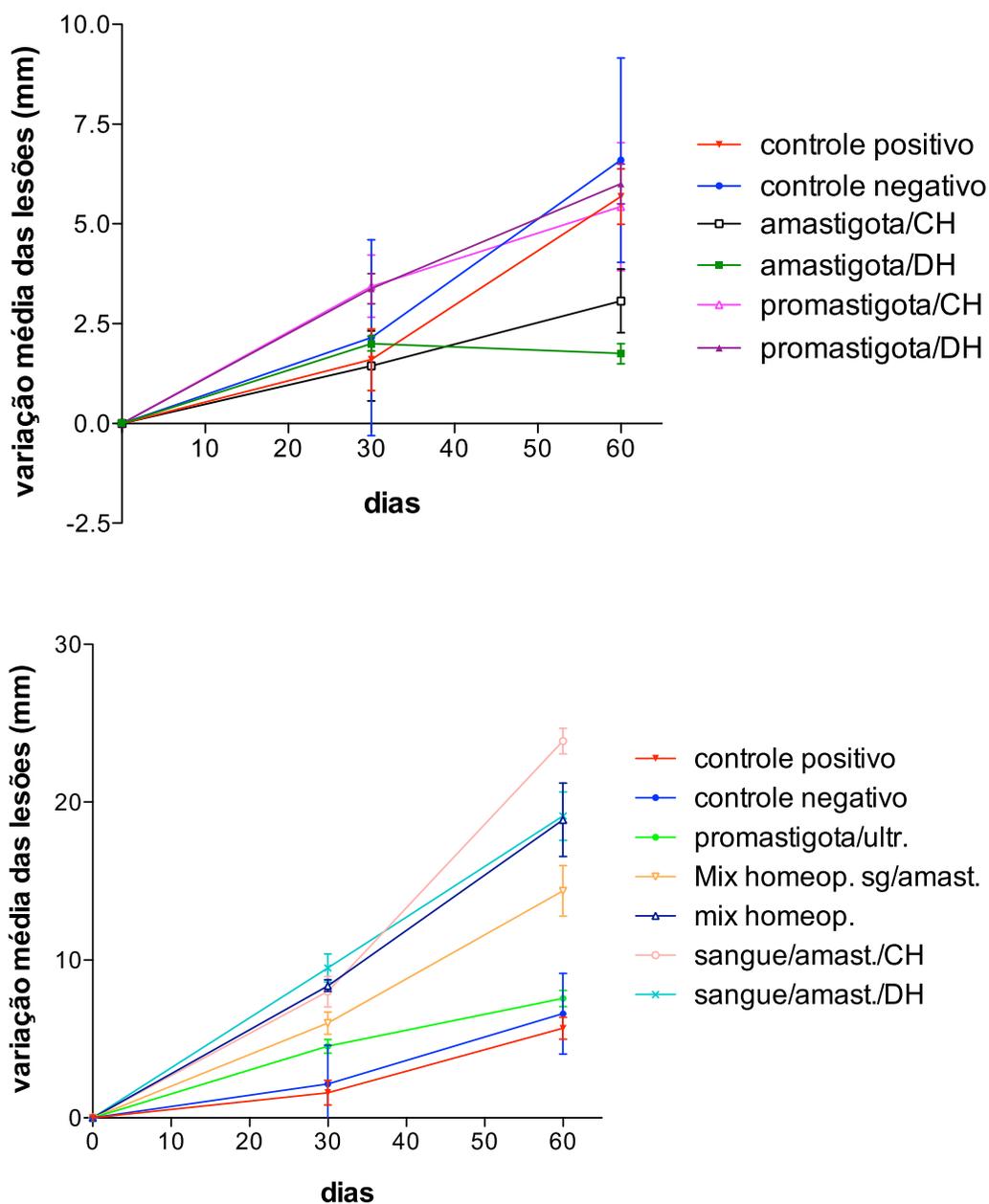
---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentro da proposta inicial de comparação da variação de parâmetros decorrentes do efeito antiparasitário dos medicamentos homeopáticos preparados, apresentamos a seguir os resultados obtidos referentes à variação média das lesões leishmanióticas em relação ao tempo, assim como as variações dos parâmetros hematológicos dos diferentes grupos estudados, conforme segue:

### a) Avaliação do diâmetro médio das lesões

Os resultados referentes às avaliações dos diâmetros médios das lesões leishmanióticas, determinadas pela infecção experimental em camundongos experimentalmente infectados com  $2,0 \times 10^4$  formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, obtidas de cultivo axênico e tratados com diferentes bioterápicos evidenciaram variações que ocorreram de modo significativo entre as diferentes preparações dos bioterápicos, de acordo com a forma do parasito utilizada na preparação, e com o material biológico coletado para a preparação do medicamento homeopático (Figura 1).



**Figura 1:** Variação do diâmetro médio das lesões em camundongos *Mus musculus*, infectados por *L. (V.) braziliensis* e submetidos ao tratamento por diferentes Bioterápicos homeopático em diversas potências, durante 60 dias, pela via de administração oral. Controle positivo: animais tratados com glucantime; controle negativo: animais tratados com solução de cloreto de sódio 0,9%.

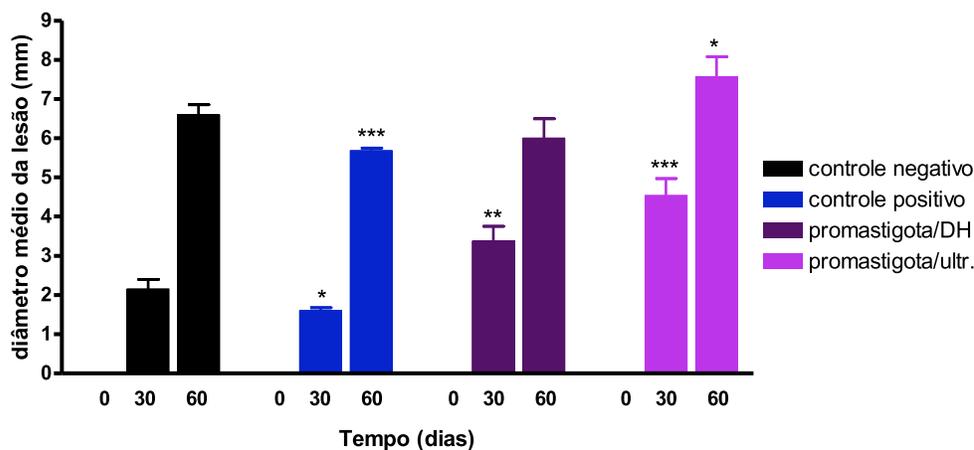
---

---

Quando considerados os medicamentos homeopáticos preparados com formas promastigotas, verifica-se que houve variação entre os diferentes grupos avaliados. Observando o aspecto visual do desenvolvimento do diâmetro médio das lesões, verificamos uma redução média dos valores em relação ao controle negativo, com exceção do grupo tratado com o Bioterápico preparado com formas promastigotas inativadas por meio de ultra-som (GRUPO XVI) (Figura 2).

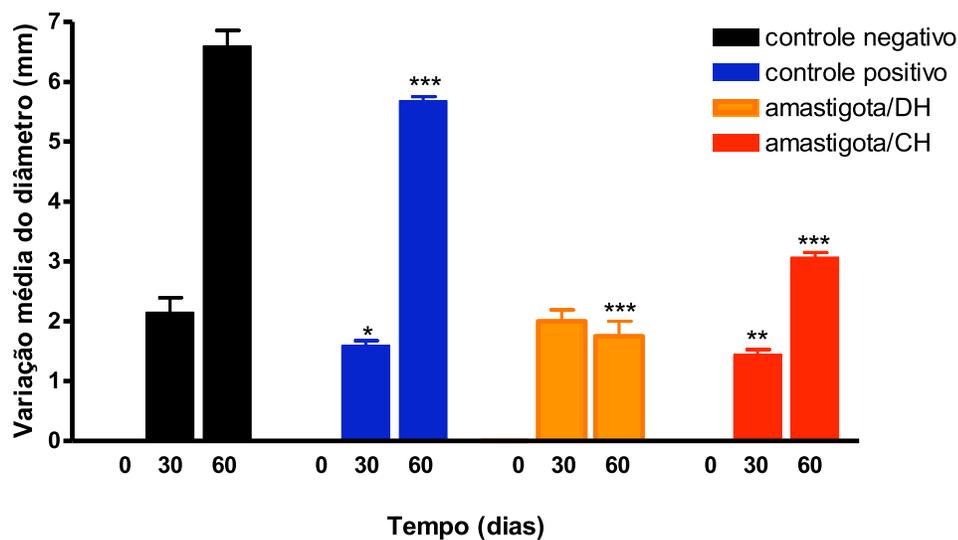
Quando os resultados foram tratados estatisticamente pelo método Two-Way ANOVA, complementado pela análise comparativa de Bonferroni, observamos resultados que demonstram redução estatisticamente significativa apenas para o grupo tratado com glucantime, no 30°. ( $p < 0,05$ ) e 60°. dia ( $p < 0,001$ ) e para o grupo tratado com o Bioterápico preparado com formas promastigotas DH inativadas pelo álcool, no 30°. dia de tratamento ( $p < 0,01$ ), sendo essa significância relativa ao aumento da lesão (Figura 2).

Para o grupo tratado com o Bioterápico preparado com formas promastigotas inativadas por ultra-som, observamos aumento significativo da lesão tanto para o 30°. dia ( $p < 0,001$ ) como para o 60°. dia de tratamento ( $p < 0,05$ ).



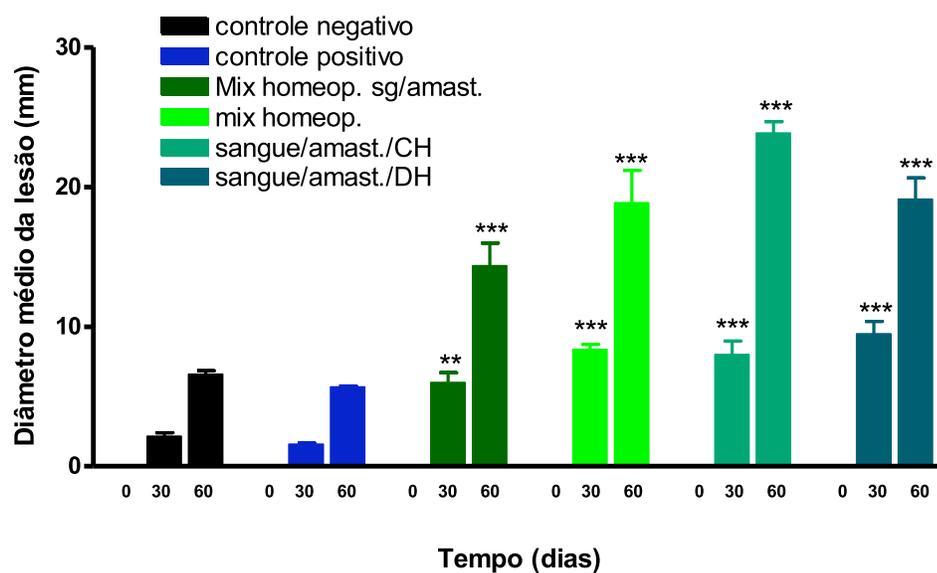
**Figura 2:** Variação do diâmetro médio das lesões em camundongos *Mus musculus*, infectados por *L. (V.) braziliensis* e submetidos ao tratamento por Bioterápicos homeopáticos preparados a partir de formas promastigotas inativadas por diferentes processos, durante 60 dias, pela via de administração oral. Avaliação estatística realizada pelo método Two-Way ANOVA, complementado pela análise comparativa de Bonferroni, onde: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

Quando da utilização dos Bioterápicos, manipulados a partir de formas amastigotas provenientes da lesão de animais infectados, observa-se um comportamento muito diferenciado (Figura 3). Nesses casos houve variação significativa no desenvolvimento médio das lesões onde, depois de finalizadas as diferentes formas de tratamento, observou-se que o grupo tratado com o Bioterápico na dinamização centesimal (CH) apresentou redução média de 53,5% em relação ao grupo controle negativo ( $p<0.001$ ), enquanto o grupo tratado pelo bioterápico preparado na escala decimal (DH) apresentou melhores resultados, promovendo uma redução média de 73,5% ( $p<0,001$ ), quando considerado o período final de tratamento, ou seja, o 60º. dia.



**Figura 3:** Variação do diâmetro médio das lesões em camundongos *Mus musculus*, infectados por *L. (V.) braziliensis* e submetidos ao tratamento por diferentes Bioterápicos homeopático em diferentes potências, durante 60 dias, pela via de administração oral, tendo por base a formas amastigotas. Avaliação estatística realizada pelo método Two-Way ANOVA, complementado pela análise comparativa de Bonferroni, onde: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

De forma semelhante ao já explicitado para a Figura 2, os animais tratados com os demais Bioterápicos não apresentaram melhora significativa em relação aos controles utilizados (Figura 4), pelo contrário, foi observado para todos os grupos um aumento significativo do diâmetro da lesão leishmaniótica ao nível de  $p < 0,001$ .



**Figura 4:** Variação do diâmetro médio das lesões em camundongos *Mus musculus*, infectados por *L. (V.) braziliensis* e submetidos ao tratamento por diferentes Bioterápicos homeopático em diversas potências, durante 60 dias, pela via de administração oral, tendo por base o mix homeopático. Avaliação estatística realizada pelo método Two-Way ANOVA, complementado pela análise comparativa de Bonferroni, onde: \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

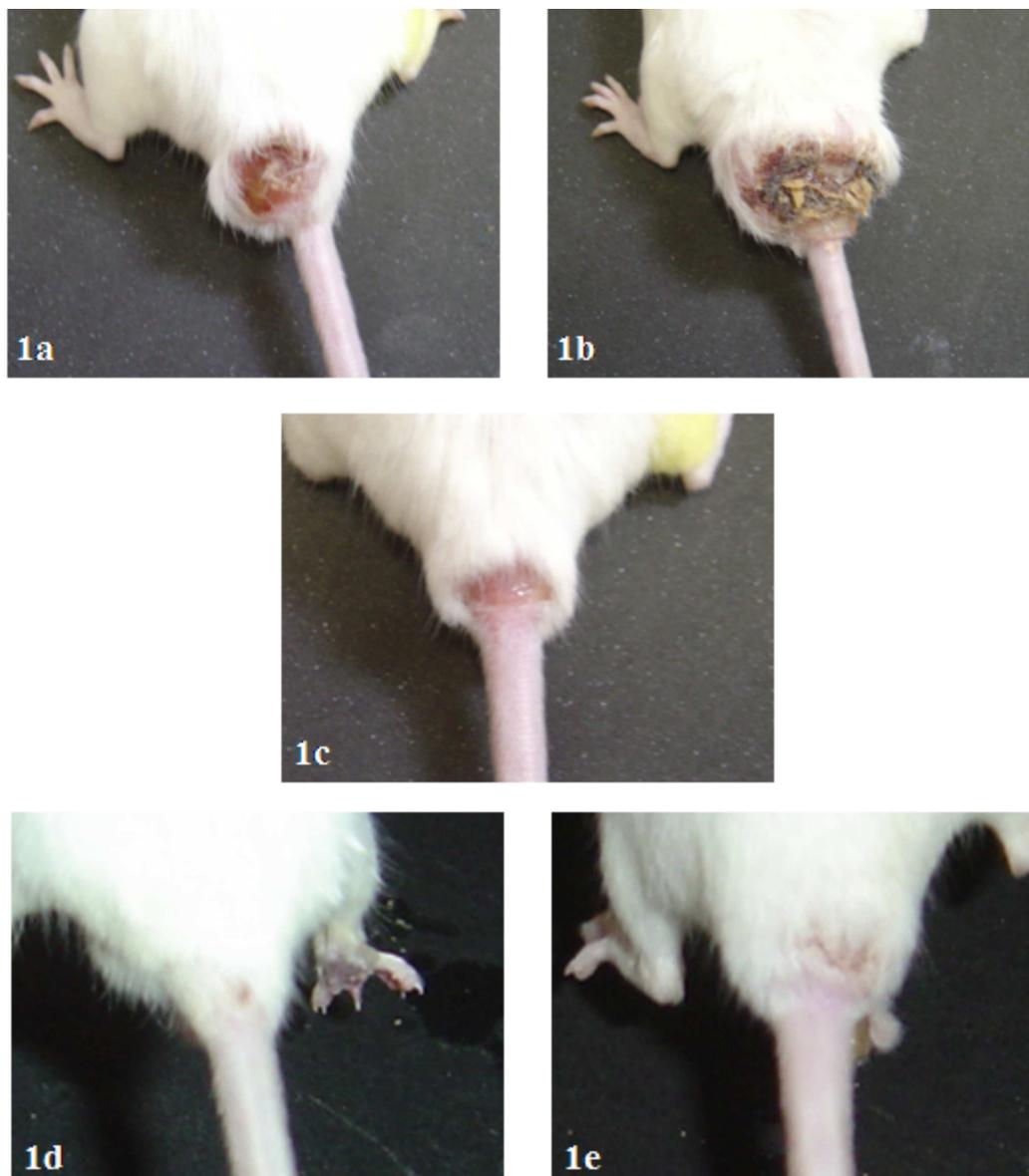
---

As fotografias dos aspectos gerais das lesões dos animais pertencentes aos grupos tratados com o Bioterápicos preparados à partir da lesão de um animal previamente infectado, após 30 dias de tratamento diário, estão representadas na Prancha 1. Quando comparados aos grupos controles positivo e negativo observa-se diferenças significativas quanto à evolução da lesão, sendo que para o grupo tratado com o Bioterápico 2, na preparação centesimal, os resultados indicam uma menor evolução da infecção, apresentando aspectos que evidenciam uma diminuição da evolução da lesão leishmaniótica (Prancha 1-foto1c). Para o Bioterápico 2, preparado na dinamização decimal, esses resultados de não evolução da lesão leishmaniótica e de processo de cicatrização se apresentam muito mais característico (Prancha 1-foto1d/e), ilustrando de maneira bastante satisfatória os dados apresentados na Figura 3.

Quando da visualização do aspecto geral da lesão dos animais no 60º. dia de tratamento (Prancha 2), observa-se a total ineficácia do medicamento utilizado como controle positivo (Glucantime), na dose empregada, tendo os animais apresentado aspectos de lesão semelhantes àqueles pertencentes ao grupo controle negativo.

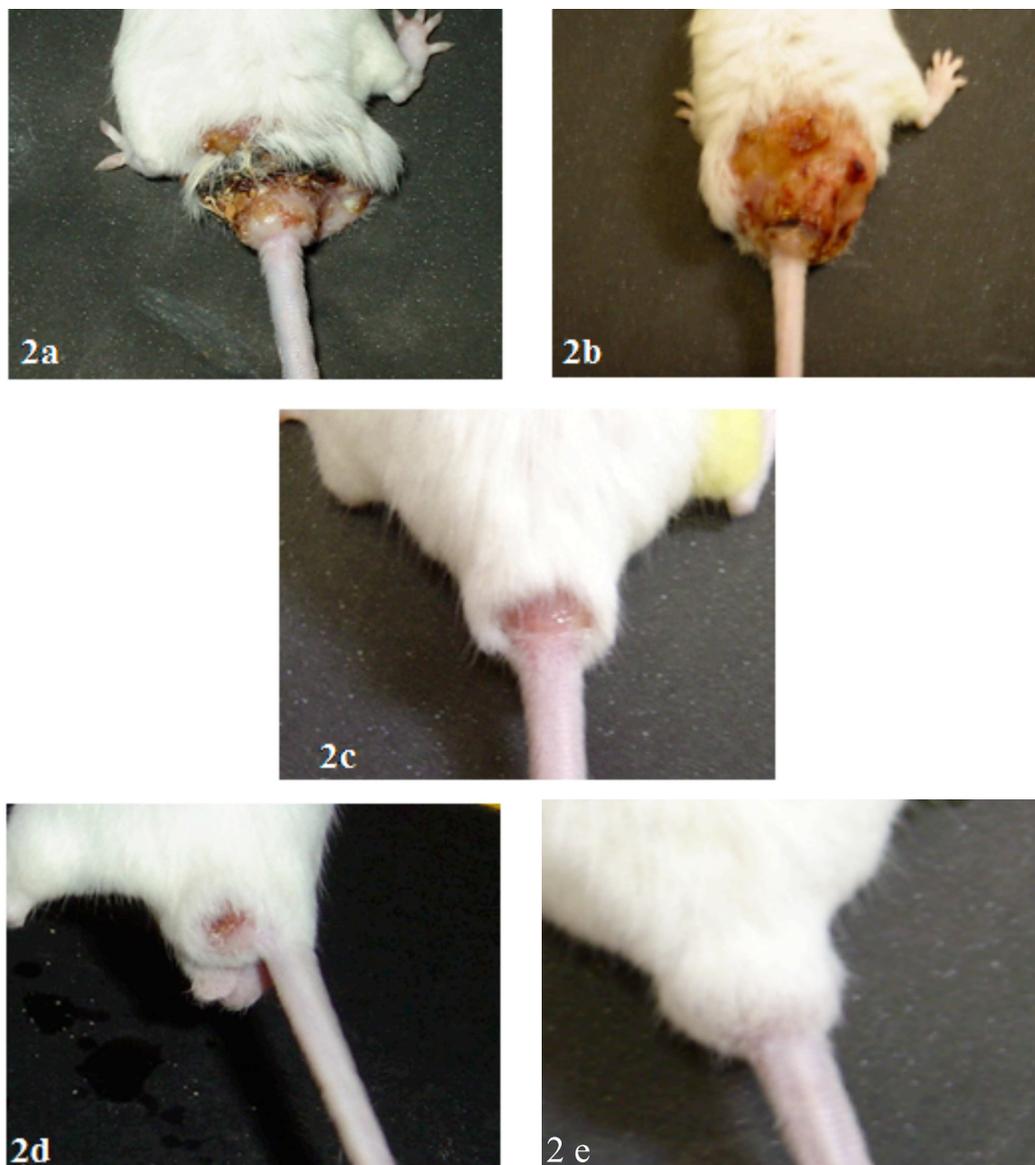
Entretanto, para os animais tratados com o Bioterápico 2 na dinamização decimal, fica claro a efetividade do medicamento, uma vez que não houve desenvolvimento acentuado da lesão leishmaniótica, como observado no grupo controle negativo, o que claramente indica a eficácia do medicamento homeopático para essa situação (Prancha 2-foto2d/e). Para alguns casos tratados com esse tipo de medicamento, foi possível a percepção do início do processo de cicatrização da lesão tratada, mas sem a observação de cura parasitológica, possivelmente pelo tempo e periodicidade empregado neste tratamento.

## PRANCHA 1 – 30 DIAS DE TRATAMENTO



**Prancha 1.** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 30 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 1a- Controle negativo, 1b- Controle positivo, 1c- Bioterápico 2 (amastigota/CH), 1d e 1e- Bioterápico 2 (amastigota/DH).

## PRANCHA 2 – 60 DIAS DE TRATAMENTO

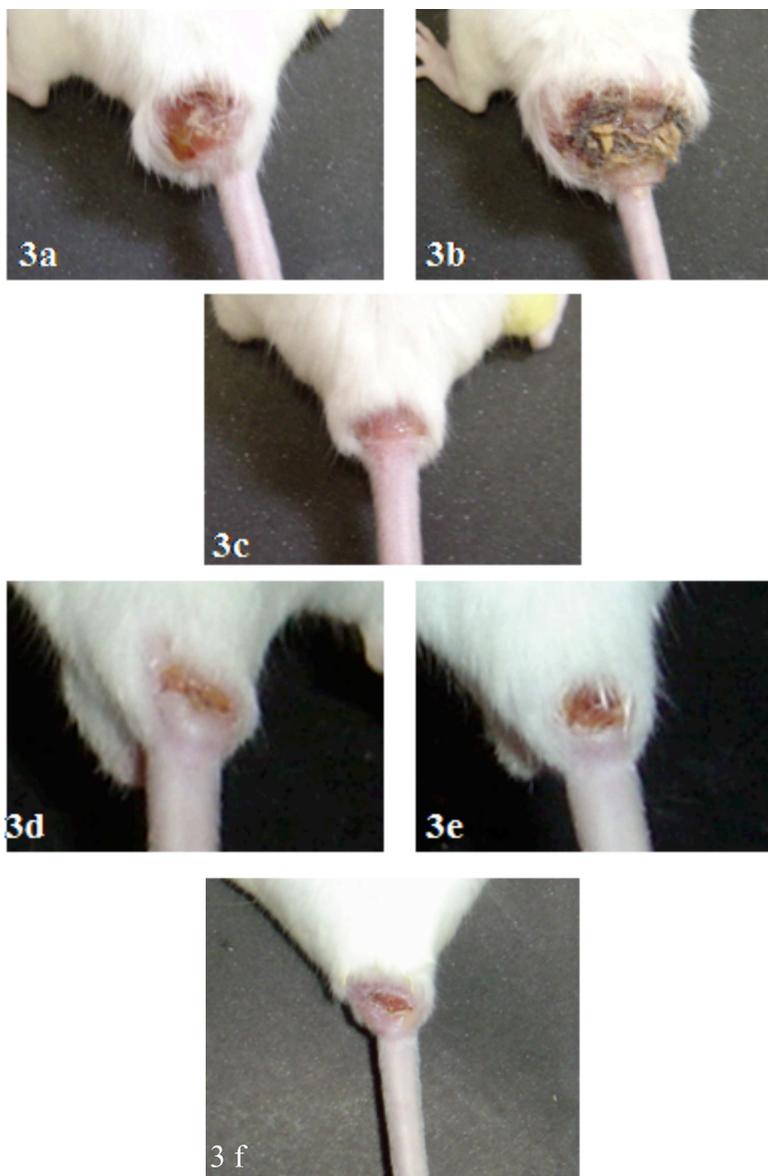


**Prancha 2.** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 60 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 2a- Controle negativo, 2b- Controle positivo, 2c- Bioterápico 2 (amastigota/CH), 2d e 2e- Bioterápico 2 (amastigota/DH).

Para os demais Bioterápicos avaliados, manipulados exclusivamente com as formas promastigotas do parasito, observou-se no 30º. dia de tratamento um comportamento diferenciado em relação ao desenvolvimento da lesão leishmaniótica. Comparados aos grupos controle positivo e negativo, a lesão apresentou-se, de uma maneira geral, com um desenvolvimento menos agressivo e mais lento, pode-se observar a manutenção da característica de atividade biológica que indicava a possibilidade de ocorrência de um possível efeito terapêutico (Prancha 3), principalmente para o Bioterápico 3, tanto na dinamização centesimal (Prancha 3-foto3c) e decimal (Prancha 3-foto 3d/e).

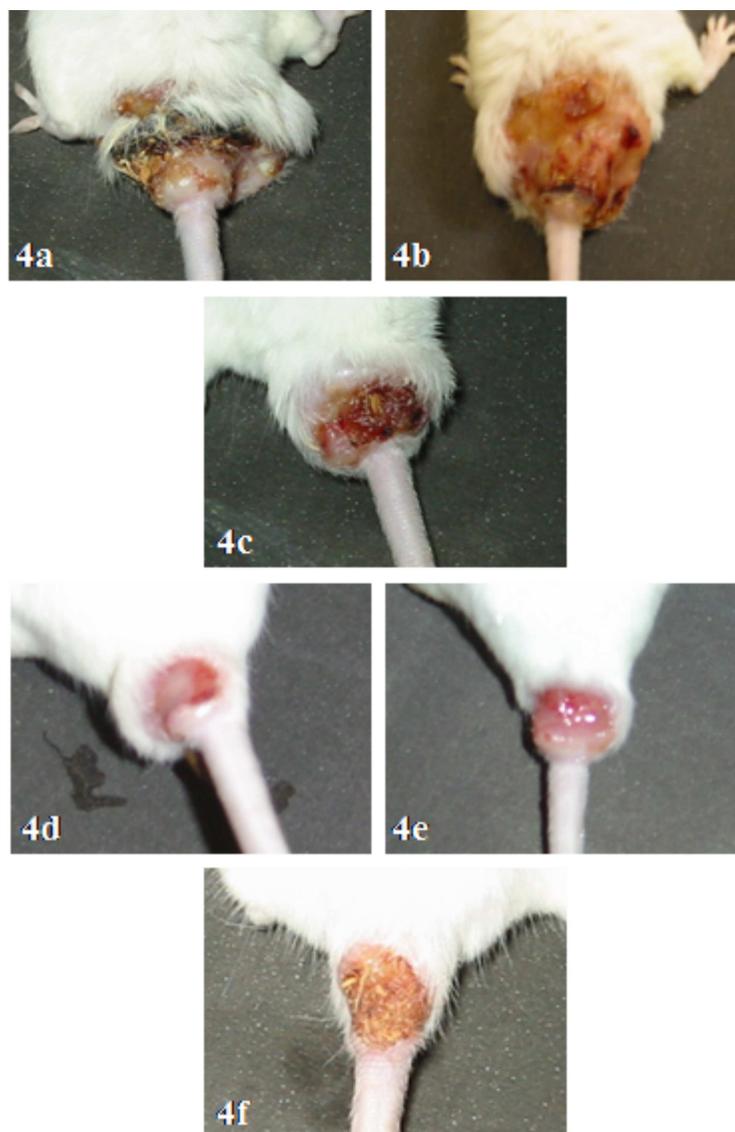
---

---

**PRANCHA 3 – 30 DIAS DE TRATAMENTO**

**Prancha 3.** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 30 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 3a- Controle negativo, 3b- Controle positivo, 3c- Bioterápico 3 (promast.alc.70/CH), 3d e 3e- Bioterápico 3 (promast.alc.70/DH), 3f- Bioterápico 1 (promast. ultr.).

## PRANCHA 4 – 60 DIAS DE TRATAMENTO

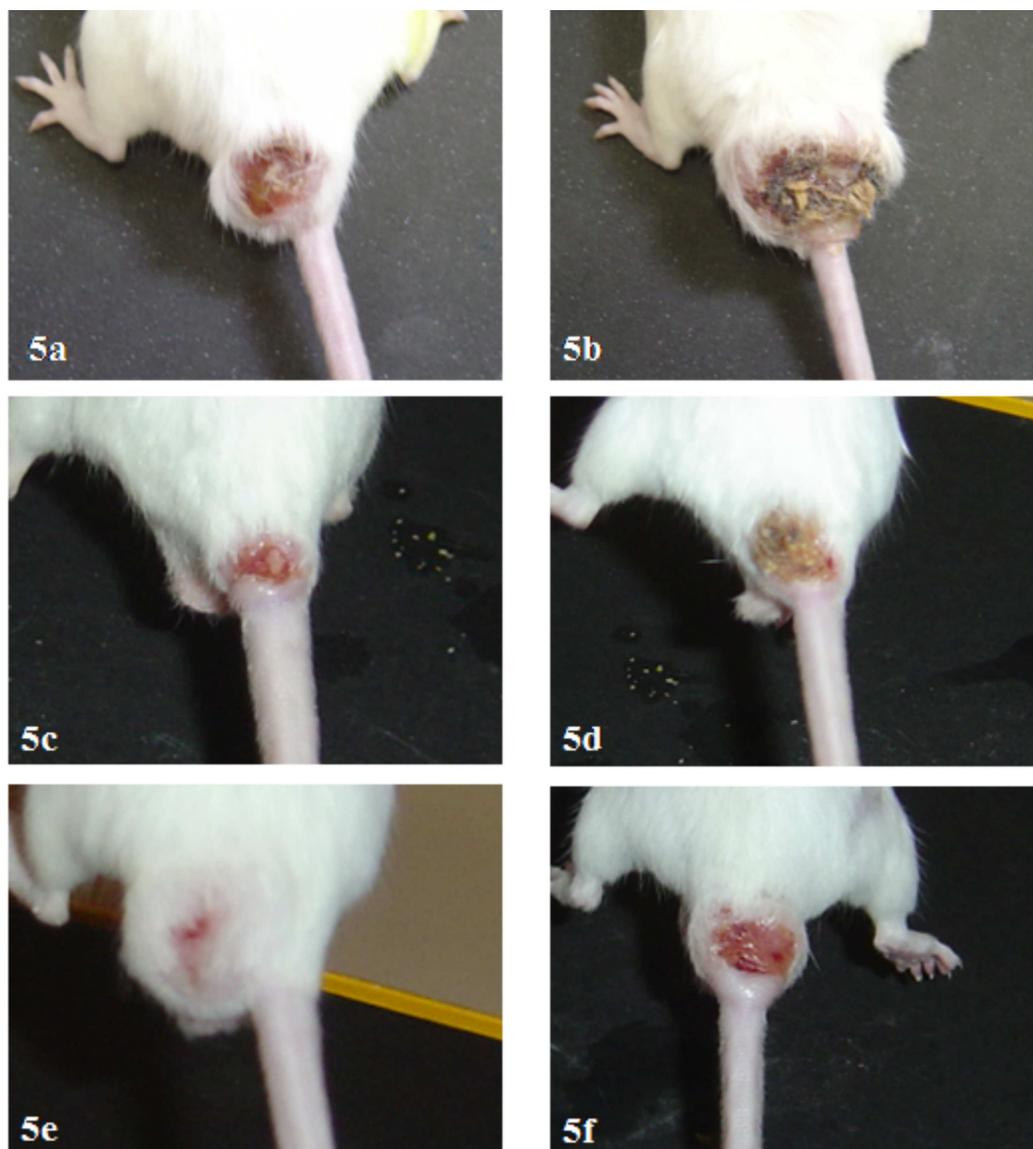


**Prancha 4.** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 60 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 4a- Controle negativo, 4b- Controle positivo, 4c- Bioterápico 3 (promast.alc.70/CH), 4d e 4e- Bioterápico 3 (promast.alc.70/DH), 4f- Bioterápico 1 (promast. ultr.).

Para os demais grupos avaliados, nenhuma situação que observássemos involução do quadro patogênico ou situação em que indicasse qualquer tipo de efeito terapêutico foi observada.

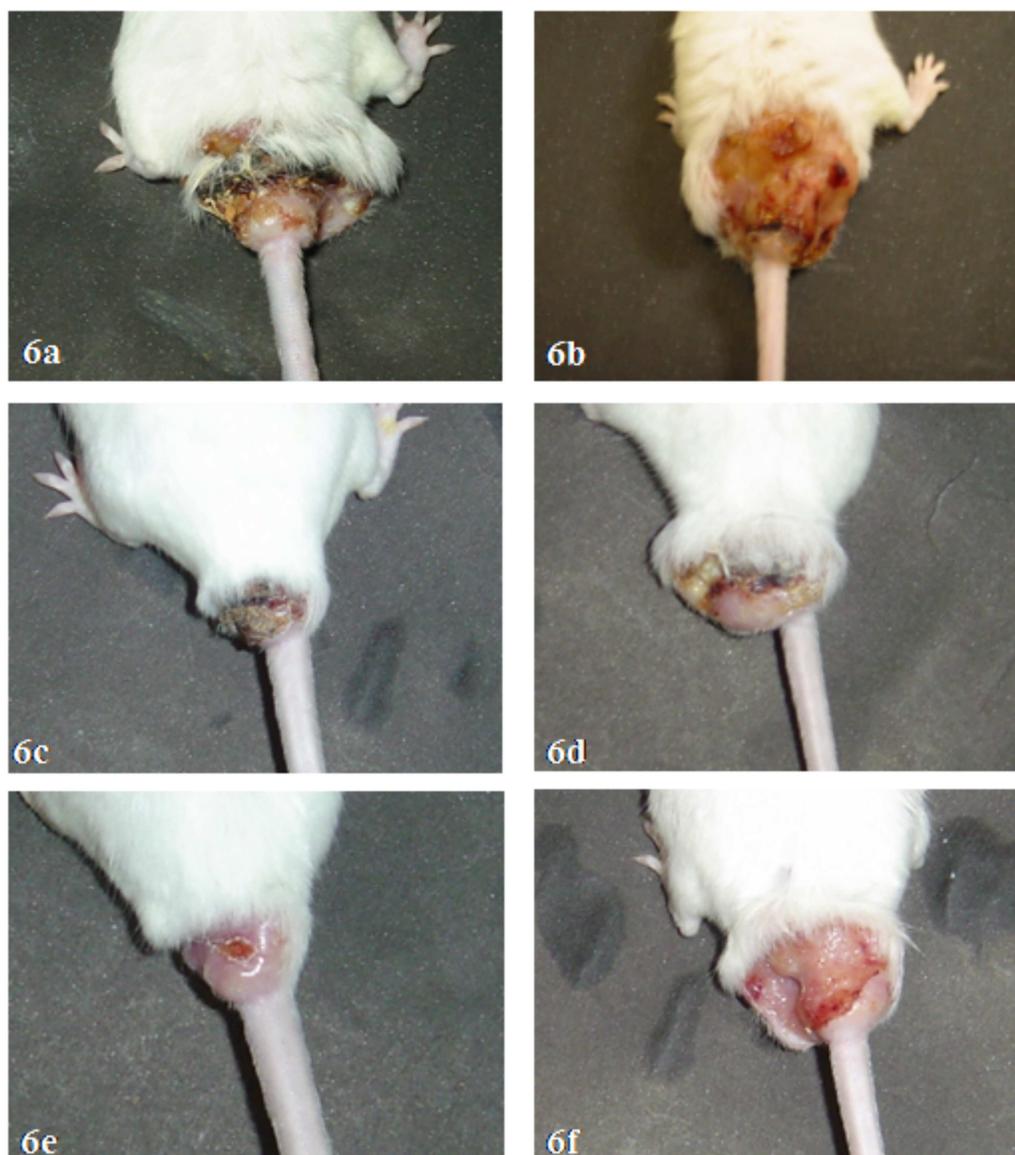
Nas Pranchas 5 a 8 apresenta-se os aspectos gerais das lesões leishmanióticas dos demais grupos experimentais, cujos efeitos terapêuticos também não foram significativos.

## PRANCHA 5 – 30 DIAS DE TRATAMENTO



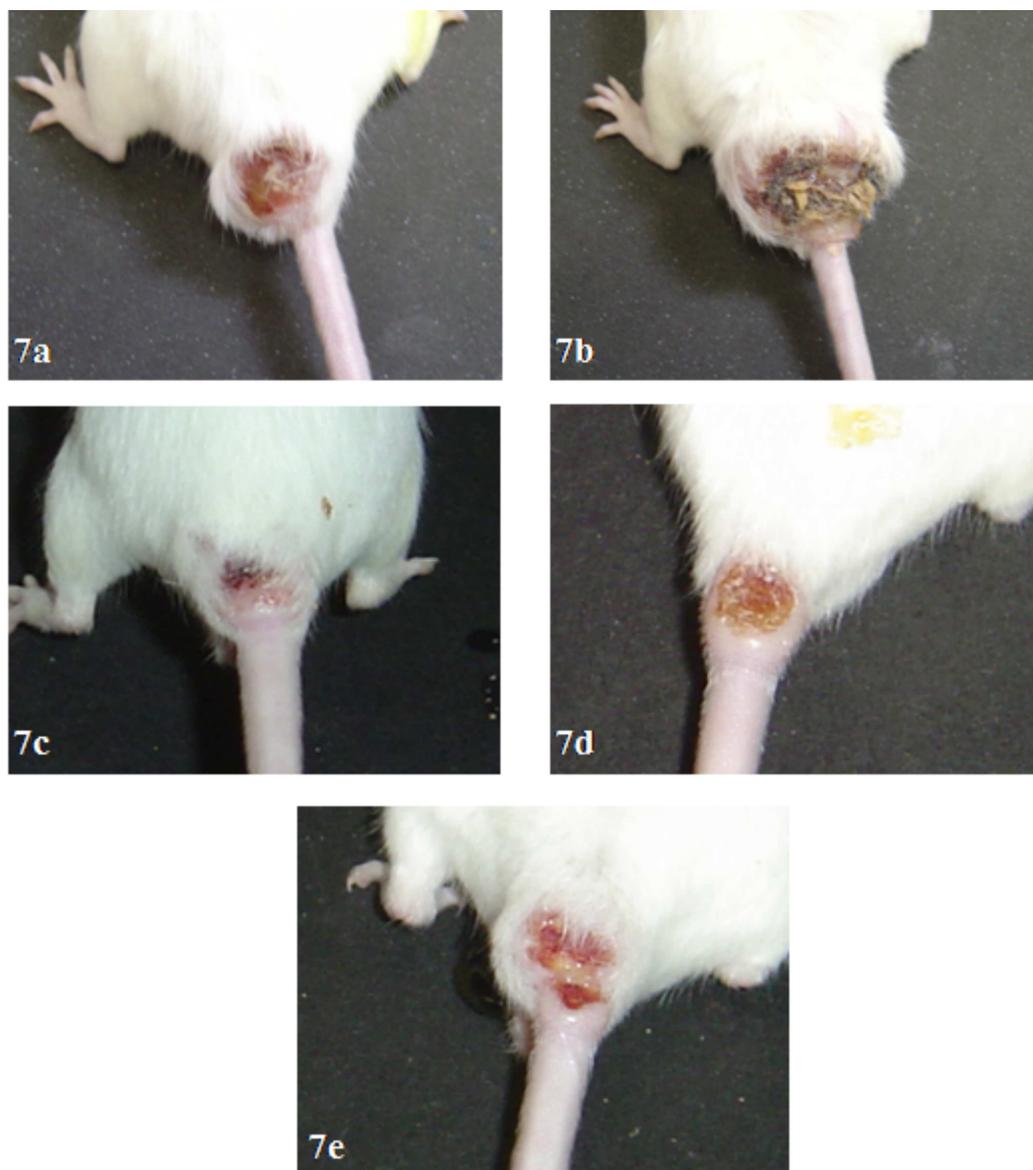
**Prancha 5.** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 30 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 5a- Controle negativo, 5b- Controle positivo, 5c e 5d- Bioterápico 5 (homeop/amast./sang), 5e e 5f- tratamento 6 (comp. Homeop).

## PRANCHA 6 – 60 DIAS DE TRATAMENTO



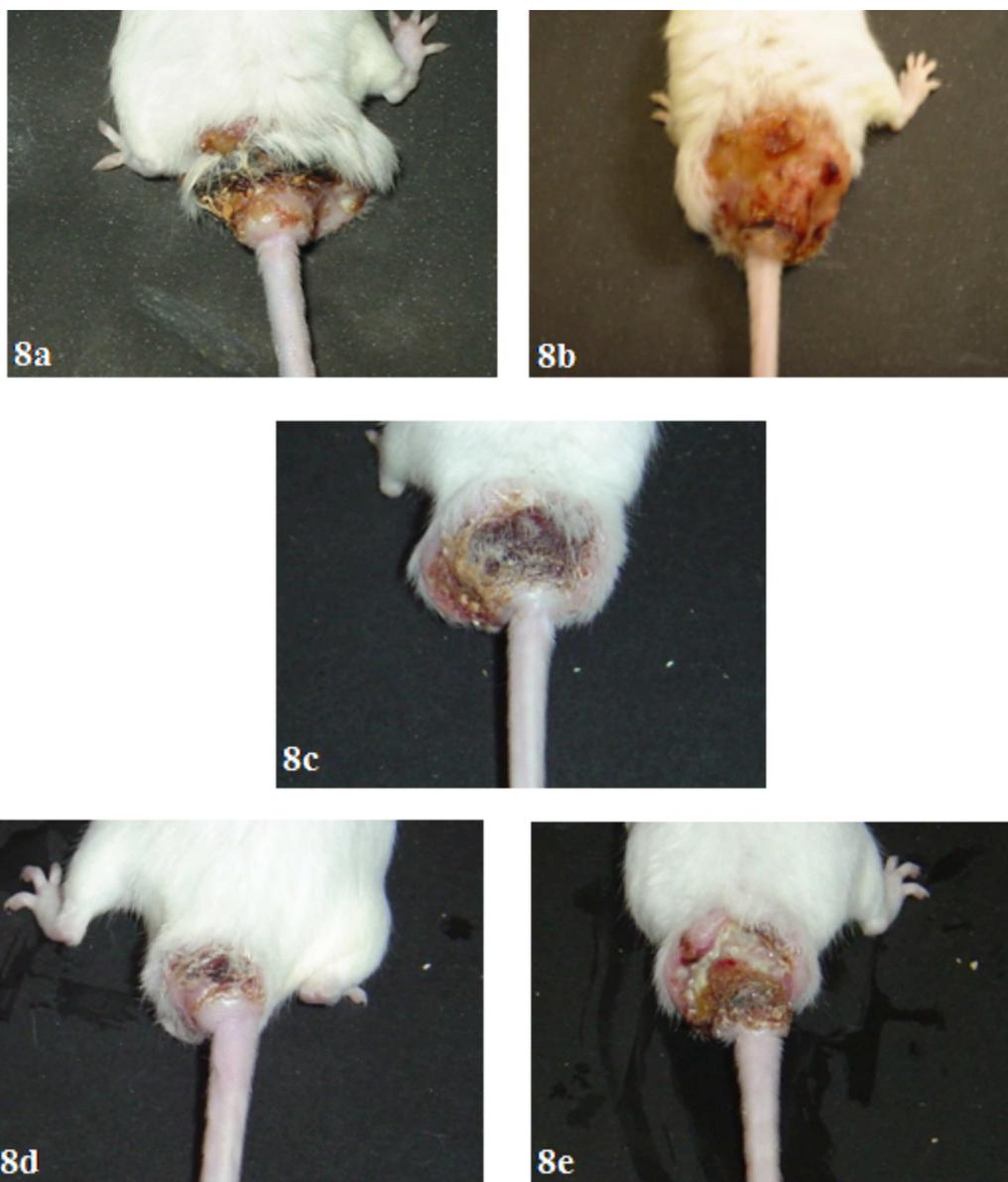
**Prancha 6:** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 60 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 6a- Controle negativo, 6b- Controle positivo, 6c e 6d- Bioterápico 5 (homeop/amast./sang), 6e e 6f- tratamento 6 (comp. Homeop).

## PRANCHA 7 - 30 DIAS DE TRATAMENTO



**Prancha 7:** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 30 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 7a- Controle negativo, 7b- Controle positivo, 7c e 7d- Bioterápico 4 (amast./sang./CH), 7e- Bioterápico 4 (amast./sang./DH).

## PRANCHA 8 - 60 DIAS DE TRATAMENTO



**Prancha 8:** Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. (V.) braziliensis* após 60 dias de tratamento, de acordo com os grupos definidos. 8a- Controle negativo, 8b- Controle positivo, 8c- Bioterápico 4 (amast./sang./CH), 8d e 8e- Bioterápico 4 (amast./sang./DH).

---

---

No trabalho realizado por Pontin, 2003 foram avaliadas as lesões determinadas por *L. (V.) braziliensis*, tratadas com Bioterápico obtido de formas infectantes (promastigotas) em diversas potências inativadas por ultra-som.

Pelos resultados apresentados podemos supor que a ineficiência terapêutica ocorreu, provavelmente, pelo processo de inativação adotado, assim como pela preparação do Bioterápico. Acreditamos assim que nesses processos de inativação a membrana celular das formas promastigotas foram rompidas, determinando alterações das propriedades bioquímicas e celulares do parasita (LEHNINGER *et al.*, 1995), importantes para as interações específicas com o hospedeiro.

Assim, acreditamos que essas modificações seriam suficientes para que o bioterápico desenvolvido, não agisse, como deveria. Além disto, a forma utilizada para a obtenção do Bioterápico foi a forma promastigota, forma não encontrada no hospedeiro humano, onde são apenas encontradas as formas amastigotas.

Diante disso, o processo de inativação e as formas utilizadas para o preparo deste Bioterápico provavelmente anularam o princípio fundamental da Homeopatia, a Lei dos Semelhantes, onde semelhante cura semelhante.

No presente trabalho, o método de inativação dos bioterápicos foi realizado de acordo com Ribeiro, et al (1989) e Nasi et al, (1994), apenas pelas sucessivas diluições em álcool 70%, até as potências anteriores aos tratamentos. Este método proporcionou a inativação, sem alterar a integridade das estruturas presentes nas formas do parasito utilizado. Para a realização das potências em análise, foi utilizada solução fisiológica a 0,9%, baseado nos trabalhos de Martini et al., 1993.

---

---

Dessa forma, o grupo tratado com o Bioterápico 2 (amastigota) na potência 30DH, apresentou resultados mais satisfatórios, pois a forma amastigota utilizada no bioterápico é a encontrada no hospedeiro submetido ao tratamento. Portanto, de acordo com a terapêutica homeopática, quanto mais próximo da semelhança, melhor será a eficácia do tratamento. No entanto, a cura parasitológica não foi alcançada, pois a reconstituição completa do tecido não foi estabelecida, provavelmente pelo esquema terapêutico escolhido e adotado.

O mesmo ocorreu com Ribeiro et al., (1989), que avaliaram os efeitos dos fatores humorais de camundongos tratados com Bioterápico Trypanosominum TC D 30, em testes de lise de *T. cruzi* realizados *in vitro*. Nesse experimento foram utilizados soros de camundongos tratados com o bioterápico, onde a lise correspondeu a aproximadamente 50% em presença do soro imune, enquanto que os tripomastigotas incubados com soro humano inativo não foram lisados.

De forma semelhante também, Lopes et al., 1994, realizaram um estudo histopatológico do fígado e coração de camundongos infectados com *T. cruzi*, avaliando a eficácia do Bioterápico Trypanosominum TC D30, os autores observaram também uma melhor eficácia do Bioterápico Trypanosominum TC na potência 30DH, ressaltando-se que não houve a cura parasitológica completa, sendo que na fase crônica da doença foram encontrados pequenos ninhos de amastigotas nos tecidos em análise, embora em números bastante inferiores quando comparados com o grupo controle.

É importante mencionar que no presente trabalho as lesões de alguns animais permaneceram com a presença de uma casca escura, característica da fase exsudativa da cicatrização. Porém decorridos 30 dias após o término do tratamento, as lesões foram reativadas levando os animais à morte.

---

---

Em homeopatia, pouco se retrata em relação à pesquisa de medicamentos antiparasitários, especialmente em relação à leishmaniose.

Em relação a outros tripanosomatídeos, existem trabalhos experimentais e clínicos, demonstrando a utilização desse tipo de medicamento no tratamento da doença de Chagas experimental e clínica, sendo o mesmo preparado a partir de formas de cultivo de *T. cruzi*.

Em ensaios clínicos, utilizando-se o bioterápico Trypanosominum TC D 30 em um grupo de pacientes portadores da doença de Chagas na forma crônica sintomática, foi observado melhora do quadro sintomatológico da doença, com maior evidência de formas iniciais e intermediárias dessa fase da infecção. Em relação à fase crônica tardia, não se obteve resultados positivos (GERALDINO, 1986).

Avaliação de camundongos infectados com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*, e tratados com o Bioterápico Trypanosominum TC D 30, nifurtimox e benzonidazol, foi realizado por Ribeiro et al., 1987. Os resultados obtidos em relação à cepa Y foram de 60% de cura dos animais tratados com o bioterápico, contra 35% do nifurtimox e 57% do benzonidazol. Os autores observaram ainda que o nifurtimox não apresentou resultados satisfatórios, em relação à cepa Bolívia, enquanto que o benzonidazol apresentou 18% de índice de cura, contra 52% do medicamento bioterápico, além de não ter sido observado efeito tóxico nos camundongos tratados com o Trypanosominum TC D 30.

A avaliação dos fatores humorais de camundongos tratados com Bioterápico Trypanosominum TC D 30, em testes de lise de *T. cruzi* realizados *in vitro*, foi realizada por Ribeiro et al. (1989). Neste experimento foram utilizados soros de camundongos tratados com o

---

---

Bioterápico, onde a lise correspondeu a aproximadamente 50% em presença do soro imune, enquanto que os tripomastigotas incubados com soro humano inativo não foram lisados.

Martini et al. (1993) verificaram as alterações em protozoários do gênero *Giardia* e da mucosa duodenal de camundongos portadores desse parasito, após tratamento com Flagil, medicamento conhecido comercialmente, e com o Bioterápico Giardinum. Os autores observaram alterações morfológicas dos cistos do protozoário no grupo tratado com Bioterápico Giardinum 200CH não sendo possível verificar alterações do duodeno, pois esses animais não resistiram até o final da medicação devido a preparação do Bioterápico ter sido efetuada e administrada à base de álcool.

Pontin, em 2003, avaliou experimentalmente as lesões de camundongos determinadas por *L. (V.) braziliensis* e tratados com Bioterápico, obtidos de formas promastigota, provenientes de cultivo, em diversas potências. No entanto, os resultados não foram muito satisfatórios devido ao processo de inativação realizada, (lise por ultra-som de formas promastigotas) e a obtenção do bioterápico.

Alguns pesquisadores acreditam que os processos de inativação pelo ultra-som, utilizado por Pontin (2003), e pelo choque térmico, descrito na FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA (1997), possam interferir nas características energéticas do Bioterápico, promovendo uma diminuição da sua eficácia. Dessa forma, acreditamos que, a inativação pelo álcool 70% ou pela água deionizada, proporcionaram melhores resultados em relação à metodologia descrita pela FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA (1997), visto que elas pouco alteram as características biológicas do parasito.

---

---

b) Avaliação hematológica

**b1) Eritrócitos**

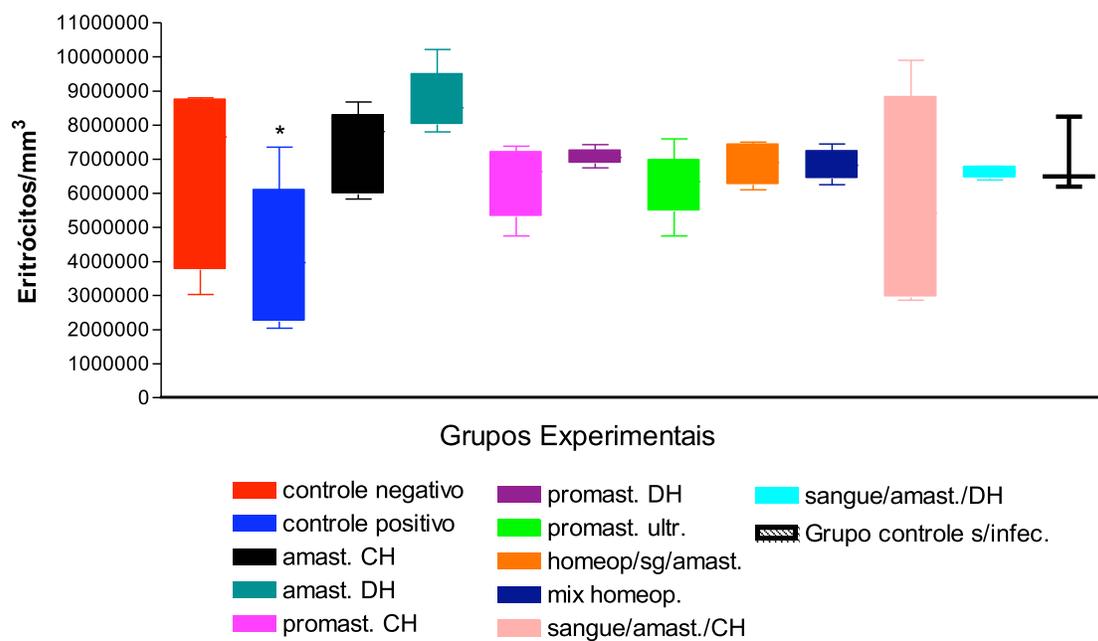
Poucos são os relatos referentes às alterações do perfil eritropoiético na vigência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Algumas alterações mais significativas somente são observadas quando da submissão de indivíduos parasitados a agentes quimioterápicos (SANTOS, et al., 1995).

Situação semelhante foi observada no presente experimento. Em termos de variação numérica, os animais infectados e aqueles não infectados e tratados com o Bioterápico 2 (forma amastigota inativado por álcool 70%), na potência 30DH apresentaram, numericamente maior quantidade de eritrócitos (Figura 5), porém sem diferenças estatisticamente significativas, quando realizada a comparação com o grupo controle negativo infectado. Já o grupo controle positivo apresentou menor número de eritrócitos ( $p < 0,05$ ), situação semelhante àquela encontrada por Santos et al. (1995), os autores demonstram a redução do número de eritrócitos mediante a administração de itraconazol, como medicamento alternativo para o tratamento da LTA.

Porém, o tratamento com os outros bioterápicos utilizados não proporcionaram qualquer nível de alterações estatisticamente significativas em relação à esse parâmetro ( $p > 0,05$ ).

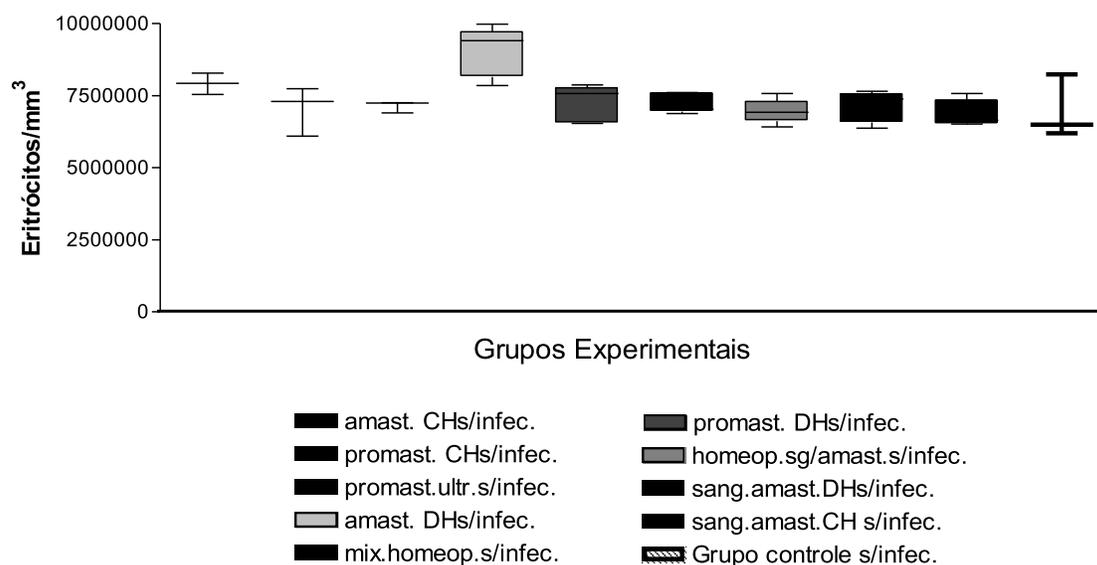
Na infecção por *T.cruzi*, sabe-se que existe uma queda do número de eritrócitos durante a fase aguda da infecção determinada por diferentes estímulos (Mallvezi et al, 2004).

Apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas, pelos dados obtidos no presente trabalho observamos uma possível ação do Bioterápico 2 em estimular a eritropoiese.



**Figura 5:** Contagem de eritrócitos de *Mus musculus* machos infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*  $p < 0,05$ ).

No sentido de avaliarmos a possibilidade do Bioterápico 2 apresentar essa propriedade de estímulo da produção eritrocítica, apresentamos na Figura 6 os resultados da avaliação entre os grupos sem infecção e tratados com os Bioterápicos propostos.



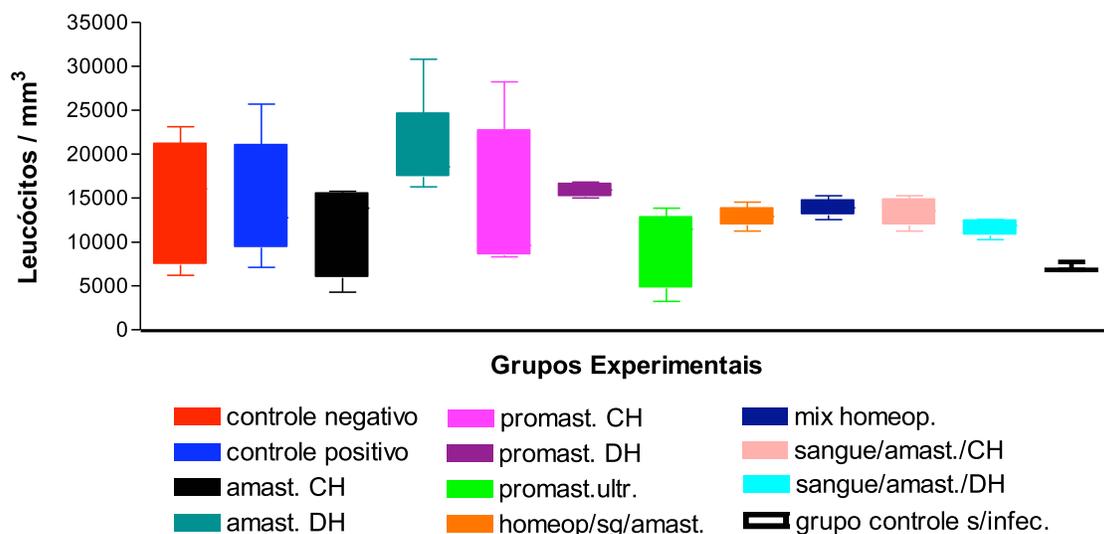
**Figura 6:** Contagem de eritrócitos de *Mus musculus* machos sem infecção e tratados com os diversos Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett.

Pela avaliação realizada observamos um comportamento semelhante ao acontecido aos grupos infectados por *L. (V.) braziliensis*, revelando apenas uma elevação dos valores para o grupo tratado com o Bioterápico 2 na escala DH, sem no entanto, determinar alterações estatisticamente significativas.

## b2) Leucócitos

Quando avaliamos o comportamento dos diferentes grupos em relação ao número de leucócitos, observamos que os animais infectados e tratados com o Bioterápico 2 (forma amastigota) na potência 30DH apresentou discreta leucocitose (Figura 7). O grupo infectado e tratado com o Bioterápico 1 (forma promastigota inativado por ultra-som) apresentou valores inferiores de leucócitos. Apesar da visualização gráfica desses resultados, nenhum grupo

apresentou alteração estatisticamente significativa em relação aos resultados obtidos para o grupo controle negativo, infectado com *L. (V.) braziliensis*.

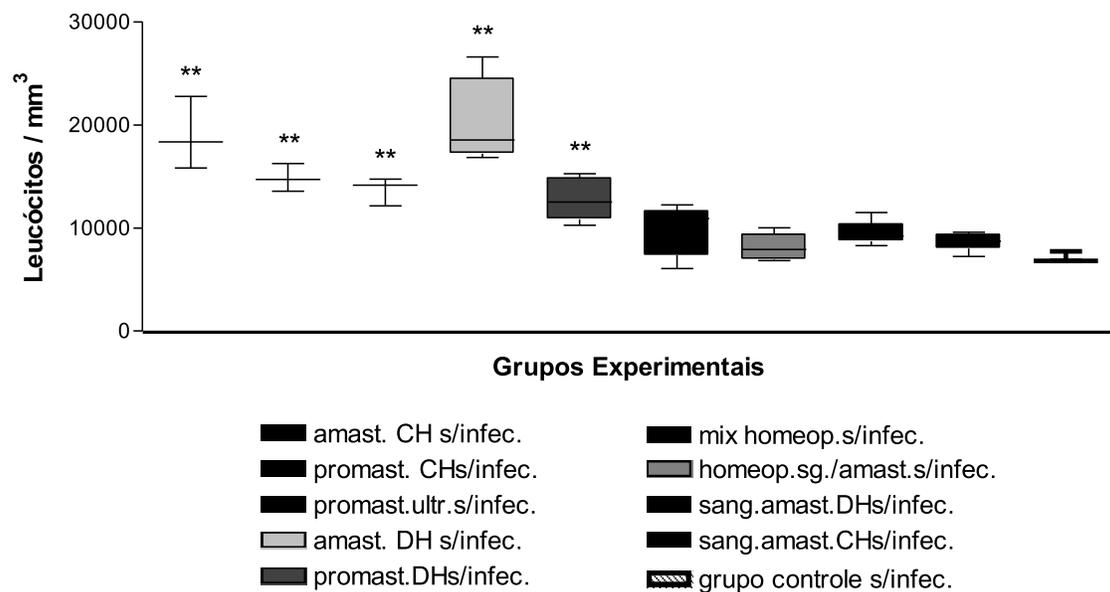


**Figura 7:** Contagem de leucócitos de *Mus musculus* machos infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett.

Quando confrontados os dados obtidos dos grupos sem infecção e tratados, observamos que os grupos preparados com Bioterápicos provenientes exclusivamente de formas do parasito, observamos que o estímulo do sistema imune é altamente significativo, independentemente da forma de obtenção (Figura 8).

Para esses grupos observamos uma leucocitose significativa ( $p < 0,01$ ), o que sugere um efeito imunoestimulatório. Dessa forma pode-se aventar a possibilidade que os animais tratados como o Bioterápico 2 com ou sem infecção exerceu uma ação imunoestimulatória mais eficaz em relação aos outros utilizados, promovendo uma leucocitose estatisticamente significativa que favorece uma melhor resposta celular (Th1) promovendo uma melhor evolução clínica de cura da lesão leishmaniótica, uma vez que essa resposta é de significativa importância para o controle de interleucina 10 (IL-10), a qual regula diretamente a

inibição da função de macrófagos e células dendríticas, principalmente na produção de citocinas pró-inflamatórias por essas células (MOORE et al., 2001).

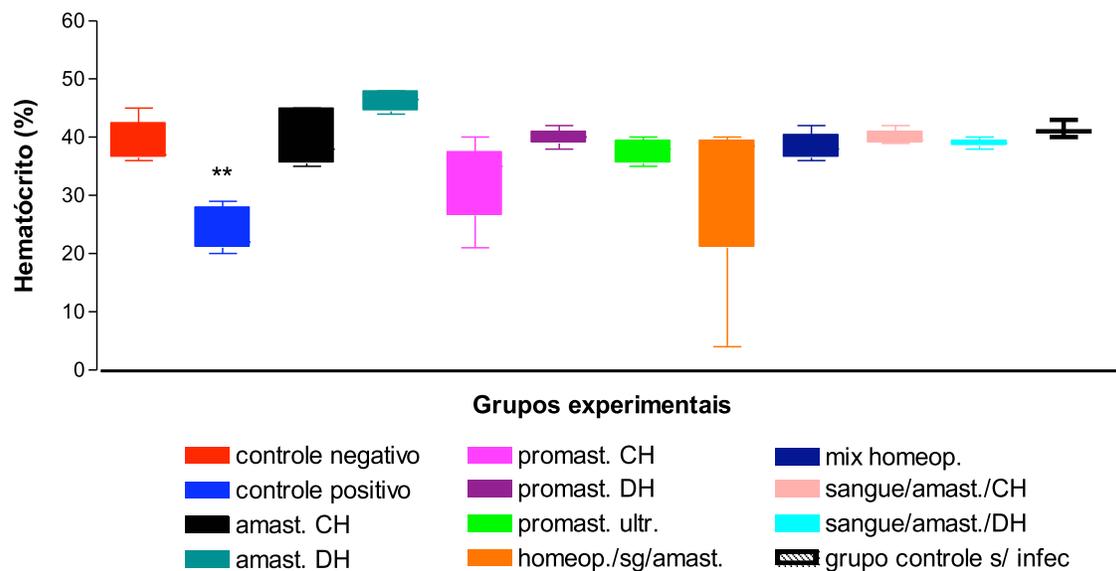


**Figura 8:** Contagem de leucócitos para os grupos experimentais constituídos de *Mus musculus* machos sem infecção e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*\*  $p < 0,01$ ).

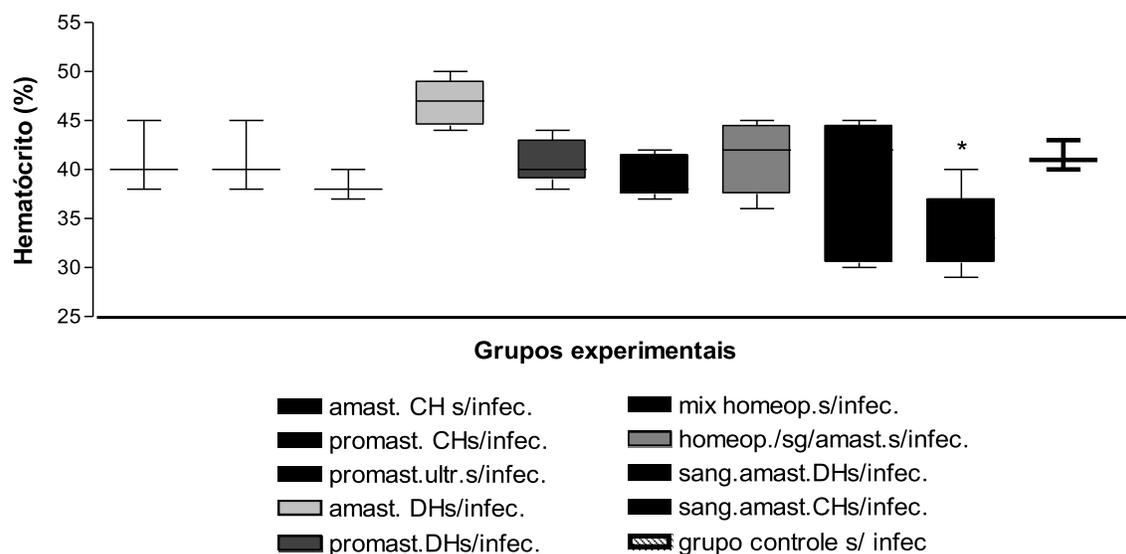
### b3) Hematócrito

Os animais infectados tratados com o Bioterápico 2 (forma amastigota) na potência 30DH apresentaram hematócritos maiores quando comparados com os demais grupos, porém não foi observado valores estatisticamente significativos (Figura 9). Os animais do grupo controle positivo apresentaram menores valores de hematócrito, sendo significativo ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao controle negativo infectado, resultado esperado, tendo em vista os resultados obtidos para a contagem do número de eritrócitos (Figura 5). Os nossos dados são

coerentes desde que a avaliação do hematócrito aproxima-se das variações normais referentes ao número de eritrócitos, com algumas exceções como em crianças e algumas espécies experimentais e certos aspectos patológicos como por exemplo microcitose eritrocítica.



**Figura 9:** Hematócrito dos grupos experimentais em *Mus musculus* machos infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*\*  $p < 0,01$ ).



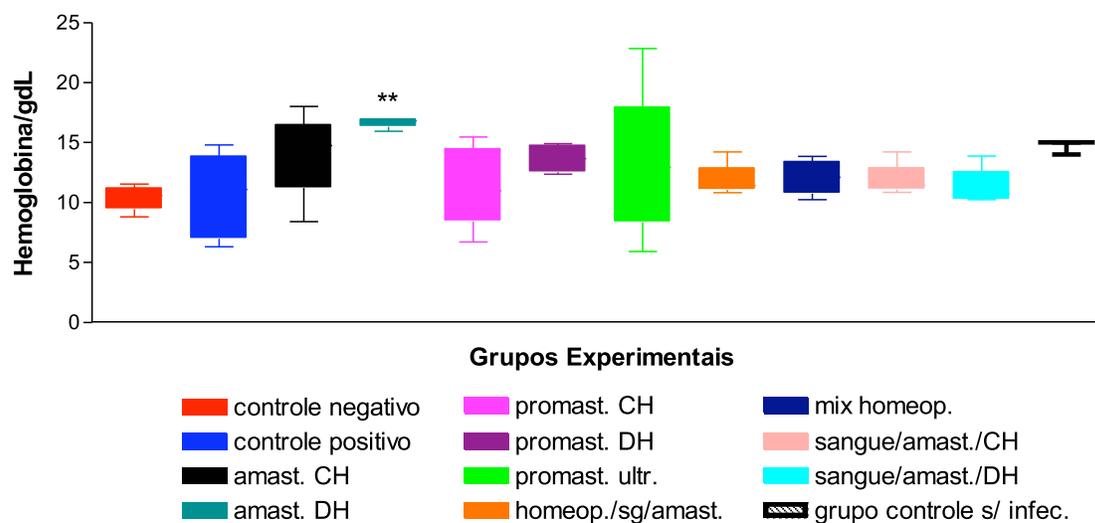
**Figura 10:** Hematócrito para os grupos experimentais constituídos de *Mus musculus* machos sem infecção e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*  $p < 0,05$ ).

#### b4) Hemoglobina

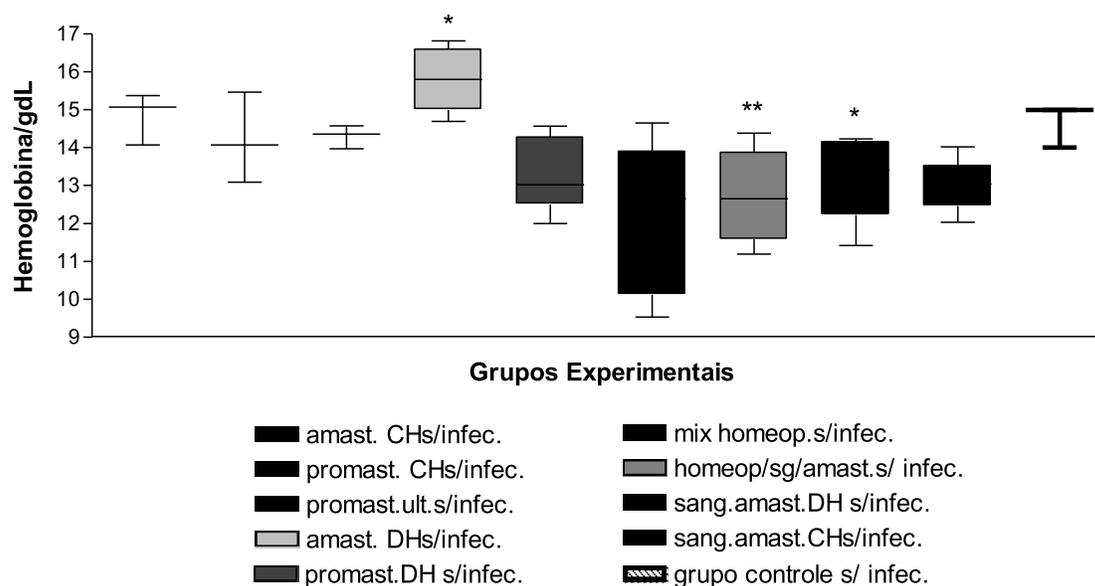
Os animais infectados e tratados com o Bioterápico 2 (forma amastigota) na potência 30DH, e os animais sem infecção tratados com o Bioterápico 2 na escala DH, apresentaram maiores níveis de hemoglobina, sendo que apenas o grupo tratado com o Bioterápico 2 (amastigota DH) apresentou valores estatisticamente significativos ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo controle negativo, infectado com *L. (V.) braziliensis* (Figura 11).

Situação semelhante foi observada quando comparados os grupos sem infecção por *L. (V.) braziliensis* e tratados com o Bioterápico 2. Os valores comparativos em relação ao grupo controle demonstram um aumento da concentração de hemoglobina ao nível de  $p < 0,05$  (Figura 12).

Um possível mecanismo de ação do Bioterápico 2 poderia se ocorrer mediante a estimulação da eritropoetina, um hormônio produzido pelas células renais, que por sua vez induz a produção de maior número de hemácias conseqüentemente aumentando a concentração de hemoglobina.



**Figura 11:** Concentração de Hemoglobina, em g/dL, dos grupos experimentais em *Mus musculus* machos infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*\*  $p < 0,01$ ).

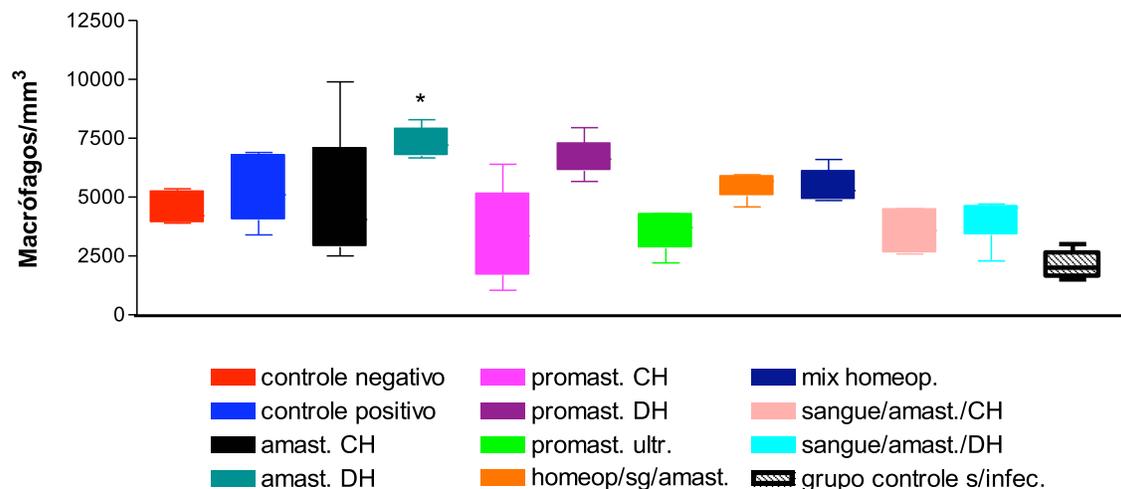


**Figura 12:** Concentração de Hemoglobina, em g/dL, dos grupos experimentais constituídos de *Mus musculus* machos sem infecção e tratados com os diversos Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### b5) Macrófagos

Os animais infectados e tratados com o Bioterápico 2 e 3 (forma amastigota) e (forma promastigota – alc. 70%), respectivamente, na potência 30DH e os animais não infectados e tratados com os Bioterápicos 2 (forma amastigota) e 3 (forma promastigota - alc. 70%) na diluição decimal (DH) apresentaram um acréscimo no número de macrófagos, fato esse visível na (Figura 13). Entretanto, a alteração estatisticamente significativa se apresenta somente para a comparação ocorrida entre o grupo controle negativo, infectado por *L. (V.) braziliensis*, e o grupo tratado pelo Bioterápico 2 (amastigota DH -  $p < 0,05$ ). Apesar de não termos avaliado nenhum

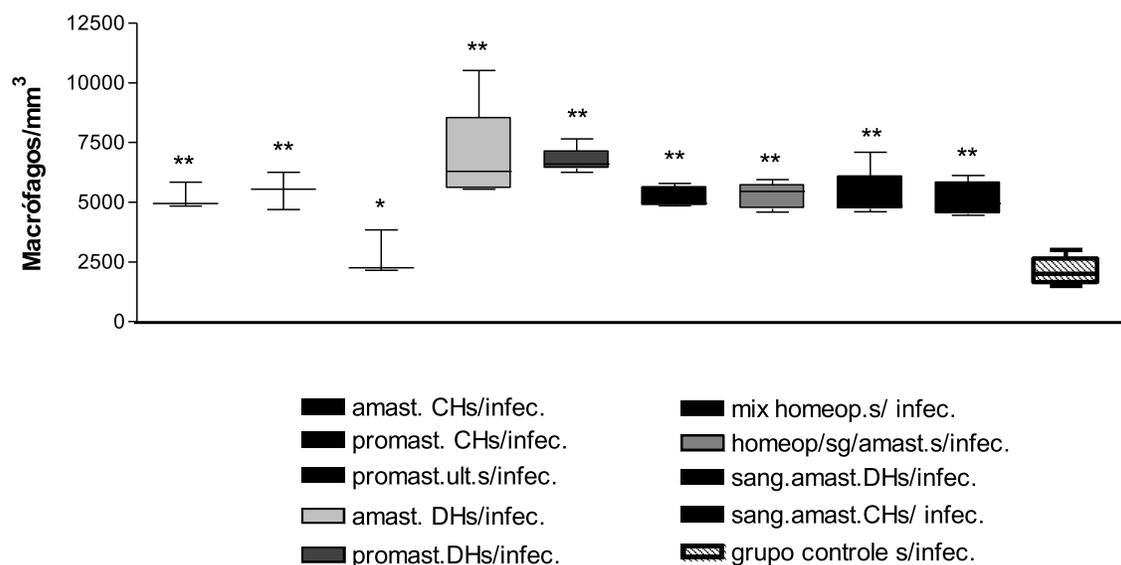
parâmetro imunológico, uma contagem mais elevada de macrófagos peritoneais revela uma possível estimulação da resposta imune.



**Figura 13:** Número de macrófagos/mm<sup>3</sup> dos grupos experimentais em *Mus musculus* machos infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\* p<0,05).

Comparando os diferentes grupos tratados com o grupo controle, todos sem infecção, observamos uma situação que reflete acentuadamente a ação dos diversos bioterápicos preparados sobre o hospedeiro vertebrado. Todos os bioterápicos determinaram nos animais um aumento significativo do número de macrófagos, demonstrando capacidade em estimular os processos de defesa desse organismo (Figura 14) (p<0,01).

Especial atenção deve ser dada ao Bioterápico 2 que foi o grupo que promoveu maior estímulo, tanto para o grupo infectado com *L. (V.) braziliensis*, quanto para o grupo sem infecção, representando assim um potencial agente terapêutico para o combate da leishmaniose determinada por essa espécie e que merece estudos complementares para melhor avaliação dos efeitos desse Bioterápico sobre o sistema imune do hospedeiro.



**Figura 14:** Número de macrófagos/mm<sup>3</sup> dos grupos experimentais em *Mus musculus* machos sem infecção e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\* p<0,05; \*\* p<0,01).

Os macrófagos têm a função de processar e apresentar os antígenos parasitários ao linfócito T CD8+ que determinarão uma resposta celular (Th1), ou humoral (Th2), culminando com a regressão ou progressão da doença, dependendo das quimiocinas que dirigem a integração leucocitária no organismo hospedeiro (WILSON, 1988 e REED, 1993).

Na leishmaniose, tanto a resposta Th1 quanto Th2 estão envolvidas no controle da infecção. Neste processo de defesa os macrófagos, associados às células dendríticas são responsáveis pela produção de interleucina 12 (IL-12) e interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), os quais são responsáveis pelo desencadeamento da resposta Th1 (GARRA & VIEIRA, 2007).

Dessa forma, são aumentados principalmente os níveis de IL-12 e INF- $\gamma$ , citocinas pelas quais o mecanismo celular de controle da infecção é estabelecido (MOORE et al., 2001).

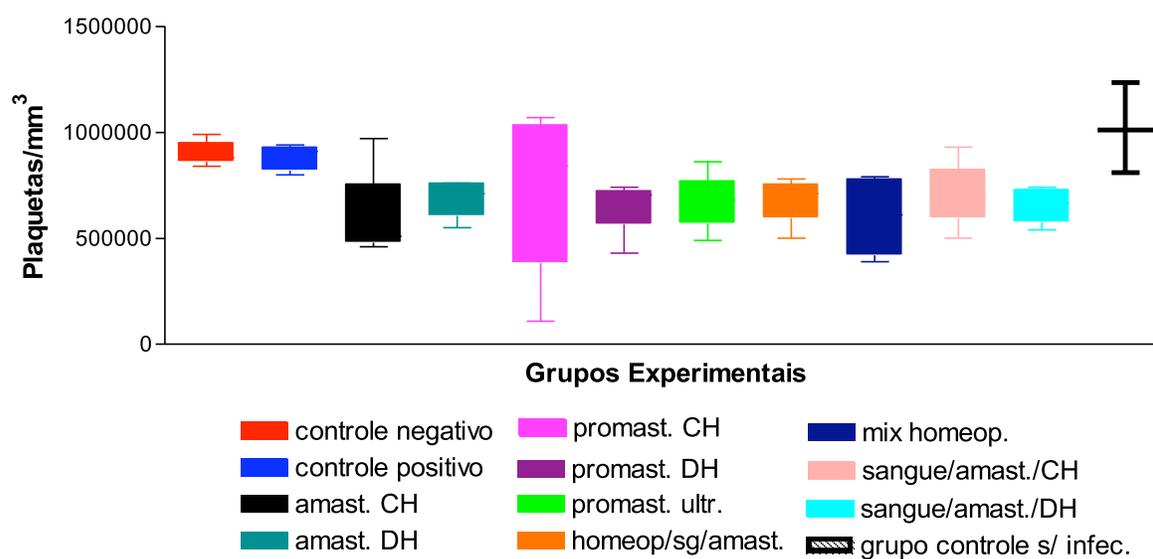
## b6) Plaquetas

Os dados experimentais obtidos da contagem diferencial de plaquetas não demonstraram qualquer variação estatisticamente significativa, quando realizada a comparação entre os grupos infectados tratados com o respectivo controle (Figura 15) e entre os grupos tratados não infectados com o controle sem infecção (Figura 16).

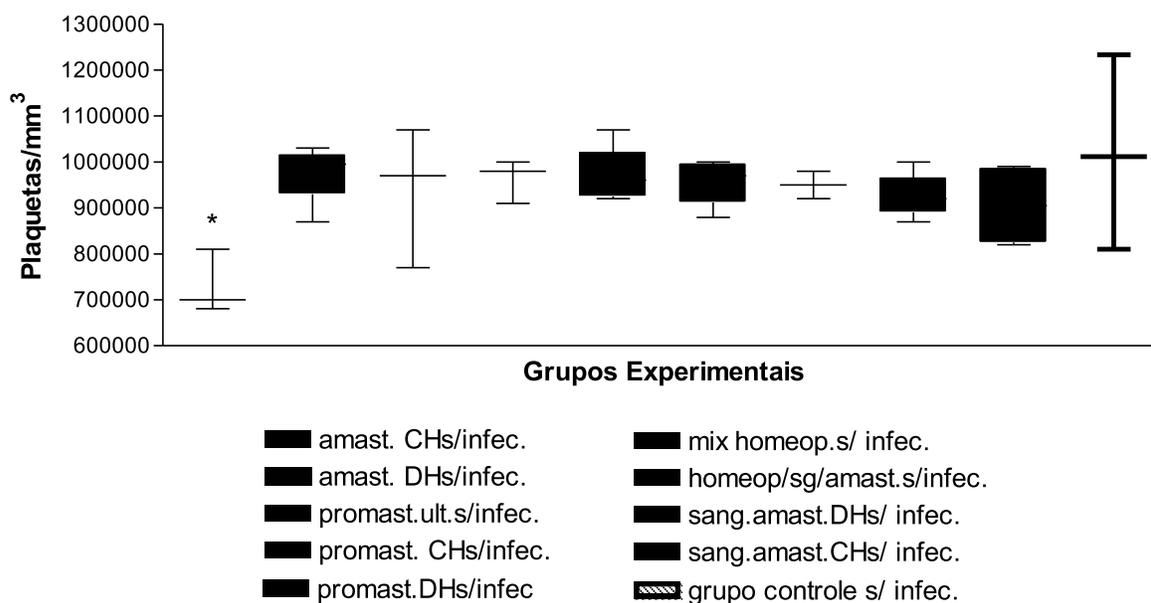
Mesmo assim, quando observamos os aspectos relacionados à variação média de plaquetas, verificamos que os animais com infecção e tratados com os Bioterápicos apresentaram, de um modo geral, uma discreta plaquetopenia, quando comparados aos grupos de animais não infectados e tratados com diferentes Bioterápicos juntamente com o controle, excetuando-se o grupo de animais sem infecção tratados com o Bioterápico 2, preparado na dinamização de 30CH, o qual apresentou plaquetopenia significante, frente ao seu respectivo controle ( $p < 0,01$ ).

É de conhecimento que camundongos inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam uma intensa trombocitopenia (Cardoso & Brener, 1980) e neutropenia seguidos por neutrofilia e eosinofilia (REPKA et al., 1985). Alterações hematológicas similares também tem sido descritas na tripanosomíase africana (IKEDE et al., 1977) sendo uma característica comum na infecção pelo vírus da AIDS (CLASTER, 2002) e malária (WEATHERALL et al., 2002 e PAUL & BREY., 2003).

Dessa forma aventamos a possibilidade de que a plaquetopenia que se faz presente durante a fase aguda da leishmaniose experimental venha contribuir para uma melhor modulação da resposta imune, conseqüentemente reduzindo o processo de replicação parasitária.



**Figura 15:** Número de plaquetas/mm<sup>3</sup> dos grupos experimentais em *Mus musculus* machos infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett.

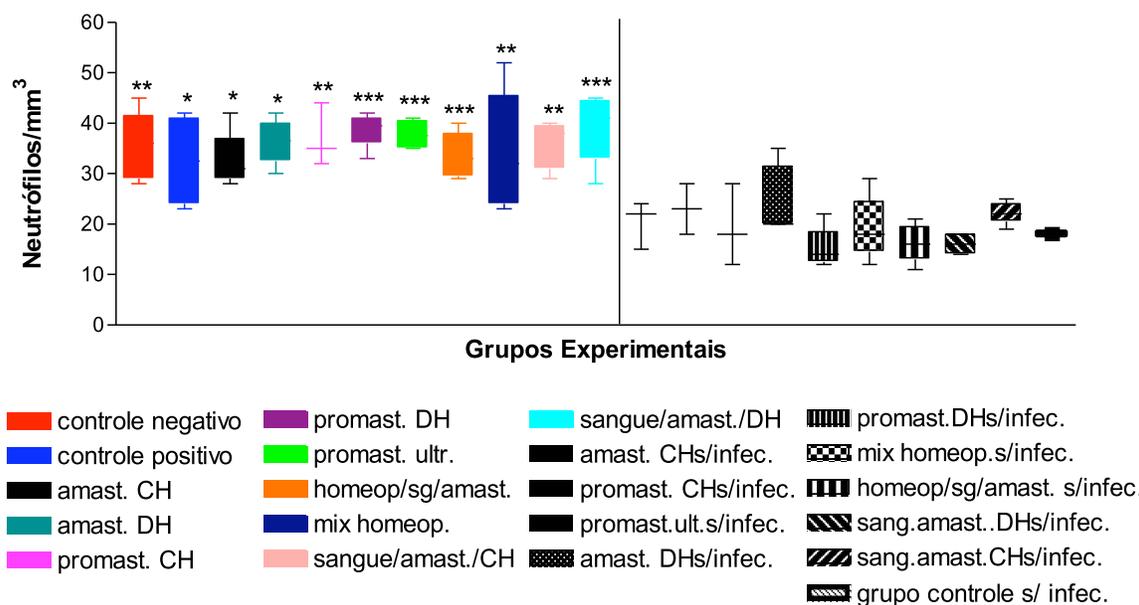


**Figura 16:** Número de plaquetas/ $\text{mm}^3$  em *Mus musculus* machos sem infecção e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*\*  $p < 0,01$ ).

### b7) Neutrófilos

O perfil de neutrofilia é uma situação que ocorre com frequência nos casos de leishmaniose, principalmente no que diz respeito à LTA, sendo uma das principais células efetoras do efeito antiparasitário primário na resposta imune inata (LASKAY et al., 2008).

Todos os grupos infectados e tratados com os diversos tipos de Bioterápicos juntamente com os controles negativo e positivo, apresentaram neutrofilia estatisticamente significativa, quando comparados aos grupos não infectados e tratados com os Bioterápicos (Figura 17).



**Figura 17:** Quantificação de neutrófilos segmentados em *Mus musculus* machos infectados e não infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Vale salientar que as comparações realizadas entre os grupos testados com características similares, ou seja, entre os grupos com infecção e entre os grupos sem infecção, não demonstraram qualquer variação estatisticamente significativa, demonstrando que essa característica de indução da neutrofilia se deve exclusivamente à infecção leishmaniótica, resultado esse que indica que os Bioterápicos aqui avaliados não induzem o aumento do perfil desse polimorfonuclear.

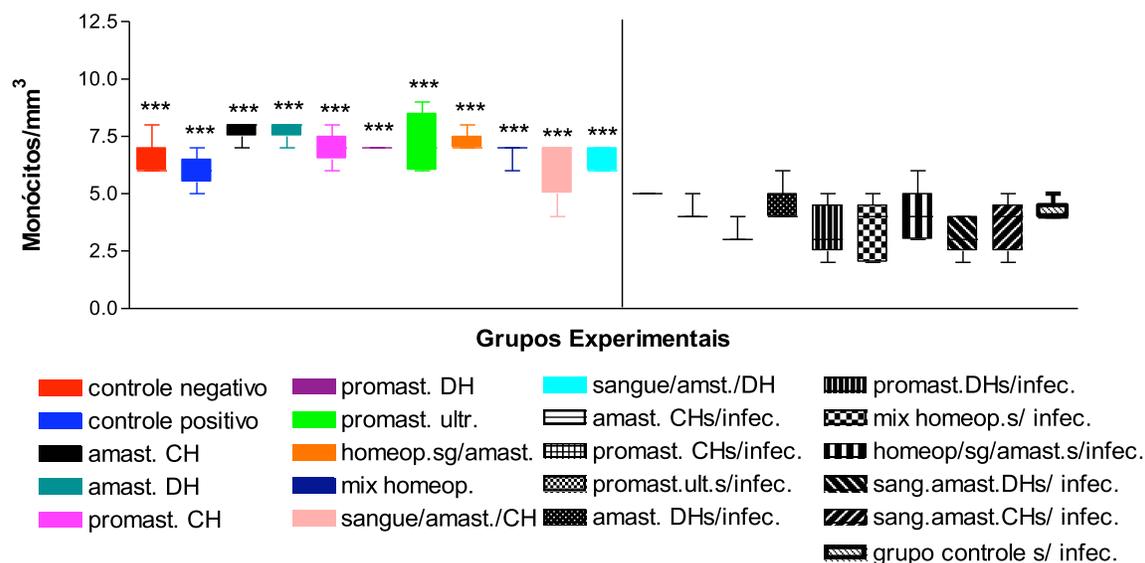
Quando comparamos o papel dos neutrófilos aos macrófagos, no desenvolvimento do parasitismo, é verificado que a função dos neutrófilos é menos esclarecida em leishmaniose (BELKAID et al., 2000).

Chen et al. (2005) demonstraram a importância dessas células no desenvolvimento da resposta imune protetora, avaliando em animais *knock-out* que a depleção de neutrófilos no início da infecção aumenta os níveis de IL-4 e, conseqüentemente, exacerbam o quadro clínico da leishmaniose, com o aumento parasitário, caracterizado principalmente com aumento do diâmetro e desenvolvimento da lesão.

### **b8) Monócitos**

A avaliação do número de monócitos revelou comportamento similar ao apresentado e discutido anteriormente para os neutrófilos, revelando uma monocitose significativa nos grupos infectados em relação aos grupos não infectados e tratados com Bioterápicos (Figura 18).

Um aumento do número de monócitos desencadeia uma resposta imune mais efetiva já que essas células têm por função fagocitar patógenos invasores e apresentá-los as células imunes competentes. Além disso, possui um importante papel, ao lado dos neutrófilos e dos mastócitos, na segunda fase do desenvolvimento da resposta imunológica em leishmaniose, durante o processo de migração e ativação celular no início do processo de formação da lesão (VON STEBUT, 2007).

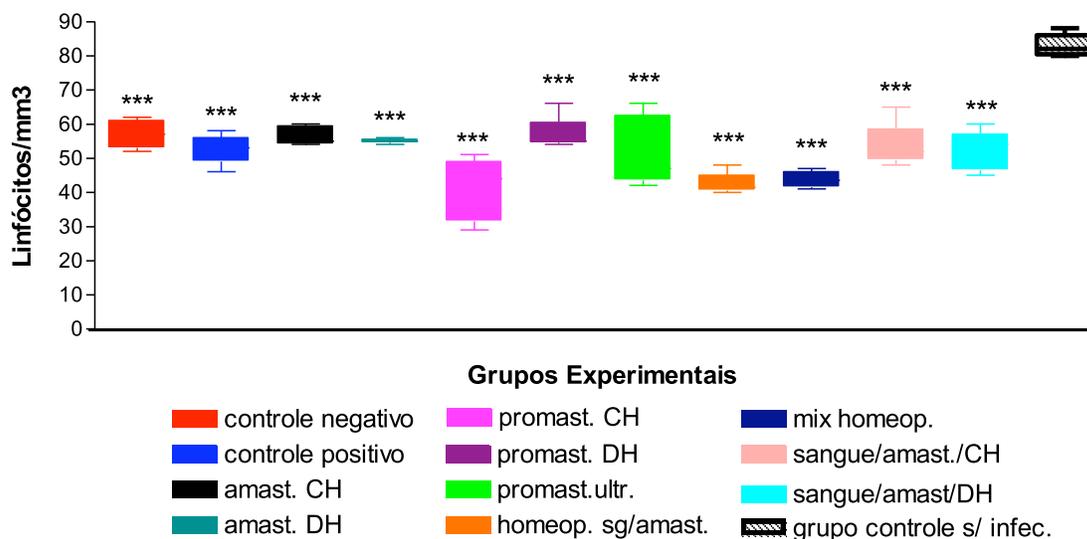


**Figura 18:** Quantificação de monócitos em *Mus musculus* machos infectados e não infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*\* $p < 0,001$ ).

### b9) Linfócitos

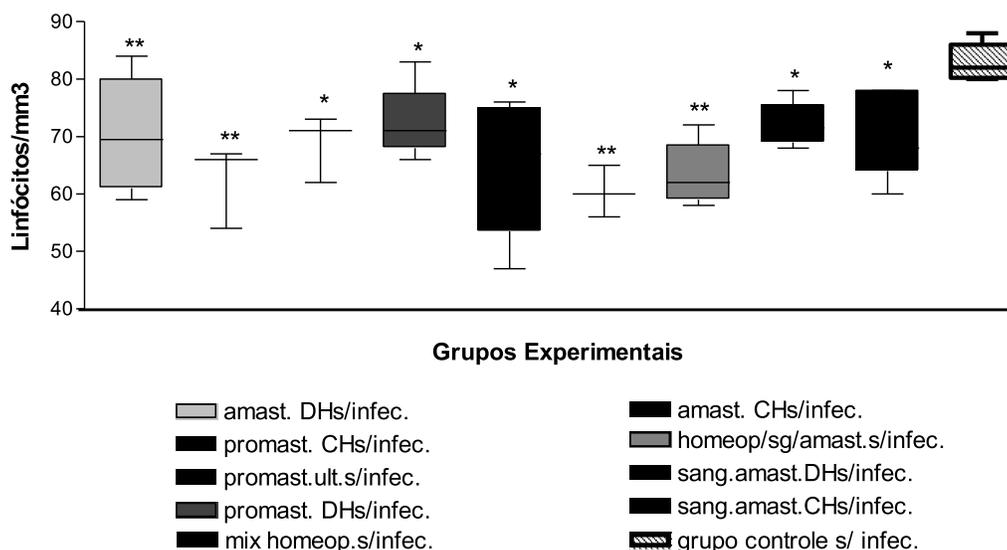
Observa-se na Figura 19, a ocorrência de uma linfopenia significativa em todos os grupos infectados, quando comparados com o controle sem infecção.

Na comparação dos dados entre os grupos semelhantes, ou seja, entre o grupo infectado por *L. (V.) braziliensis* e entre o grupo não infectado, observamos que para a primeira situação houve apenas um confronto estatisticamente significativo, entre o grupo controle negativo e aquele tratado com o Bioterápico produzido a partir de formas promastigotas inativadas com álcool na dinamização de 30CH ( $p < 0,01$ ).



**Figura 19:** Avaliação comparativa de linfócitos em *Mus musculus* entre machos infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados com os Bioterápicos propostos e o grupo controle não infectados. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

Comparando-se os dados obtidos para os animais do grupo tratado sem infecção, com o grupo controle com as mesmas características, observamos que alguns dos Bioterápicos determinam a linfopenia nos animais experimentais utilizados.



**Figura 20:** Avaliação entre número de linfócito em *Mus musculus* machos sem infecção e tratados com os Bioterápicos propostos. Avaliação estatística pelo método One-Way Anova com avaliação complementar de Dunnett (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

A observação dos esfregaços sanguíneos corados com Leishmann demonstrou que a infecção apresenta um perfil linfomonocitário característico, o mesmo acontecendo em outras parasitoses como a tripanosomíase (CARDOSO E BRENER, 1980). Apesar do aumento de neutrófilos, o perfil geral do hemograma se mantém característico da espécie de roedor utilizado, onde encontramos um perfil linfomonocitário típico.

No tocante à série eritrocítica, notamos que os animais infectados e tratados apresentaram uma ligeira queda dos valores de hemoglobina e eritrócitos sendo esta mais acentuada para o grupo submetido ao tratamento com Glucantine, o que nos leva a crer que esse medicamento de alguma forma, está interferindo na produção de eritrócitos por vários e desconhecidos motivos, como a influencia negativa na produção de células blásticas da medula óssea, lisando ou levando à apoptose as hemácias e seus precursores, ou ainda agindo sobre a

eritropoietina, ocasionando uma discreta anemia. De uma forma geral, todos os grupos infectados apresentaram uma tendência de diminuição dos valores eritrocitários.

Quanto ao número de macrófagos peritoneais, verificou-se um aumento significativo principalmente nos grupos de animais com e sem infecção e tratados com os Bioterápicos 2 e 3 na escala DH, entretanto esses Bioterápicos, apresentaram uma estimulação do sistema imunológico o que pode ser evidenciado por um aumento do número de macrófagos.

Silva et al. (1993), trabalhando com a resposta imune celular em camundongos portadores de tumor ascítico de Erlich, verificaram que o tratamento com o Bioterápico homeopático proporcionou aumento das células linfóides na cavidade peritoneal dos animais. Já Nasi et al. (1994), trabalhando com a ativação de macrófagos, em camundongos infectados com *T. cruzi* e submetidos a tratamento com Bioterápico, verificaram redução da parasitemia. Dessa forma, pode-se concluir que a ação imunoestimuladora dos Bioterápicos se faz presente, porém, insuficiente para garantir ou promover uma regressão total das lesões, ocasionadas pelo parasita.

---

---

## 6. CONCLUSÕES

1. O grupo de animais tratado com o Bioterápico 2 (obtido a partir de formas amastigotas) provenientes de lesões de camundongos infectados com o protozoário *L. (V.) braziliensis*, na escala decimal, apresentou uma redução significativa da lesão, em comparação aos outros grupos de tratamentos.
2. Houve um aumento significativo do número de macrófagos para os animais tratados pelos Bioterápicos 2 e 3, na escala decimal, evidenciando uma possível estimulação do sistema imunológico pelos Bioterápicos.
3. Os diversos Bioterápicos analisados acarretaram um efeito estimulador da resposta imunológica evidenciado pelo aumento de neutrófilo, monócitos e do número de plaquetas submetidos aos respectivos tratamentos.
4. Os Bioterápicos elaborados a partir das formas amastigotas acarretaram redução significativa das lesões, comparativamente àqueles produzidos com formas promastigotas.
5. O Bioterápico na escala decimal promoveu uma redução média do tamanho das lesões de 73,5% ( $p < 0,001$ ) enquanto na escala centesimal, a redução foi de 53,5% ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo controle negativo.

---

## 7. REFERÊNCIAS

- ABECASSIS, J. Fabrication du médicament homéopathique. In: NETIEN, G., TRAISNEL, M., VERAIN, A. **Galenica**. Paris Technique et Documentation. v.16, p.69-82, 1980.
- ARMSON, A., KAMAU, S.W., GRIMM, F., REYNOLDSON, J.A., BEST, W.M., MacDONALD, L.M., THOMPSON, R.C.A. A comparison of effects of a benzimidazole and the dinitronitriles against *Leishmania infantum*. **Acta Trop.**, v.73, p.303-11, 1999.
- ASHFORD, R. WDESJEAUX, P. DERAADT. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v.8, p.104-105, 1992.
- ARAÚJO, C. A. C., ALEGRIO, L. V. & LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**. v. 49, p. 751-754, 1998.
- BELKAID, Y., MENDEZ, S., LIRA, R., KADAMBI, N., MILON, G., SACKS, D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.** v.165, p.969-77, 2000.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v.24, p.684-703, 1997.
- BERGMANN, B. R., COSTA, S. S. & MORAES, V. L.G. Brazillian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Braz. J. Assc. Adv. Sci.**, v. 49, p. 395-402, 1997.
- BRECHER, G., CRONKITE, E. P. Morphology and enumeration of human blood platelets. **J. Appl. Physiol.**, 3365-3377, 1950.
- BROCHU, C., WANG, J., ROY, G., MESSIER, N., WANG, X. Y., SARAVIA, N. G., OUELLETTE, M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47, p. 3073-3079, 2003.
- CAIRO, N. Guia de Medicina Homeopática. 21<sup>a</sup> ed., livraria Teixeira, 1979, São Paulo, 1979. pp. 1058.
- CAMACHO, M. R., PHILLIPSON, J. D., CROFT, L. S., KIRBY, G. C., WARHURSR, D. C. & SOLIS, P. N. Terpenoides from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**. v. 56, p. 203-210, 2000.
- CARDOSO, J.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 75:97-104, 1980.

---

CHANG, K. P., CHAUDHURI, G. Molecular determinants of Leishmania virulence. **Ann. Rev. Microbiol.**, 44, p. 499-529, 1990.

CHEN, L., ZHANG, Z.H., WATANABE, T., YAMASHITA, T., KOBAYAKAWA, T., KANEKO, A., FUJIWARA, H., SENDO, F. The involvement of neutrophils in the resistance to Leishmania major infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitol Int.** v.54, p.109-18, 2005.

CLASTER, S. Biology of anemia, differential diagnosis, and treatment options in human immunodeficiency virus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 85, p. 105-109, 2002.

CROFT, S.L., COOMBS, G. H. Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, 19, p. 502-508, 2003.

DACIE, J. V, LEWIS, S. M. **Practical haematology**, 6 ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 453, 1984.

DIAS, A.F., **Fundamentos de homeopatia: princípios da prática homeopática**. Rio de Janeiro, 2001 – Editora Cultura Médica, Capítulo 3, Fundamentos da homeopatia, p. 39 – 49.

DND*i*, consultado no endereço <http://www.dndi.org/diseases/vl.html>, em 13 de junho de 2012.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2. ed., 98p., São Paulo, 1997.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 3. ed., 98p., São Paulo, 2011.

FONTES, O. L, CESAR, A. T., TEIXEIRA, M. Z., KISHI, M. A., AMORIM, V. O. Farmácia Homeopática – Teoria e Prática. Capítulo I, p. 1-22, 2000.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A., MUÑOZ, V., HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Antileishmanial Activity of a Tetralone Isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. **Plant. Med.**, v.60, p.8-12, 1994.

FRANCO, M. A. Determinação de antimoniais (SbIII e SbV) em fármacos. **(Tese de Mestrado) Universidade de Brasília**, Brasília, DF, 1992.

GERALDINO, J. M. Ensaios clínicos com o bioterápico *Trypanosoma cruzi* D30 nas formas crônicas e sintomáticas da doença de Chagas. **Pesq. Homeopática**, v.9, n.1, p.40-50, 1986.

GRANDONI, L., GRAMICCIA, M. *Leishmania infantum* tropism: Strain genotype or host immune status? **Parasitol. Today**, 10 (7), p. 264-267, 1994.

GRIMALDI, JR. G. Leishmanioses Tegumentares: Aspectos Clínicos e Imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 77(2), p.195-215, 1982.

---

---

HAHNEMANN, S. Exposição da doutrina homeopática ou Organon da arte de curar. Traduzido da 6ª edição alemã pelo grupo estudos homeopáticos .§- 116 – 117 **Técnica de Experimentação** “BENOIT MURE” – 182 p., São Paulo, 1984.

HEPBURN, N. C., TIDMAN, M. J., JUNTER, J. A. A. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.88, p.700-703, 1994.

IKEDE, B. O., LULE, M., TERRY, R. J. Anemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with *Trypanosoma congolense* or *T. brucei*. **Acta Trop.**, v. 34, p. 53-60, 1977.

JHA, T.K., SUNDAR, S., THAKUR, C.P., BACHMANN, P., KARBWANG, J., FISCHER, C., VOSS, A., BERMAN, J. Miltefosine an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, 341, p. 1795-1800, 1999.

KAYSER, O., KIDERLEN, A. F., LAATSCH, H., CROFT, S. L. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Trop.**, v.77, p.307-314, 2000.

KAM, T. S., SIM, K. M., KOYANA, T., TOYOSHIMA, M., HAYASH, M. & KOMIYAMA, K. Cytotoxic and Leishmanicidal aminoglycoesteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 1332-1336, 1997.

KEDZIERSKI L, ZHU, Y., HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, v.133, Suppl:S87-112, 2006.

JARAMILLO, M.C., ARANGO, G.J., GONZÁLEZ, M.C., ROBLEDO, S.M., VELEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, p. 183-186. 2000.

KIM, H. M., KIM, M. J., LI, E., LYU, Y. S., HWANG, C. Y., AN., N. H. The nitric oxideproduction properties of *Solanum lyratum*. **J. Ethnopharm.**, v. 67, p. 163-169, 1999.

KOSSAC – ROMANACH, A . **Homeopatia em 1000 conceitos**. Capítulo XXXI, pg. 337 a 598, São Paulo: Elcid, 1984.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 2.ed. Sarvier, 1995. 839p.

LOPES, R. A., RIBEIRO, R. D., NASI, A. M. T. T. Parasitismo Tissular e Histometria em órgãos de camundongos tratados com Bioterápico D 30 e desafiados com cepas do *T. cruzi*, Morfológicamente distintas. **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.24-25, 1994.

---

LUX, H., HEISE, N., KLENNER, T., HART, D., OPPERDOES, F. R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 111, p. 1-14, 2000.

MACHADO, E. S., BRAGA, M. P., CRUZ, A. M., COUTINH, S . G., VIEIRA, A. R. M., RUTOWITSCH, M. S., CUZZI-MAYA, T., GRIMALDI JR., MENEZES, J. A. Disseminated american mucotaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 87 (4), p. 487-492, 1992.

MALVEZI, A. D., CECCHINI, R., DE SOUZA, F., TADOKORO, C. E., RIZZO, L. V., PINGE-FILHO, P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF – alfa in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Med. Microbiol.**, v. 41, p. 69-67, 2004.

MARINHO, F. A., GONÇALVES, K. C., OLIVEIRA, S. S., OLIVEIRA, A. C., BELLIO, M., D'AVILA-LEVY C. M., SANTOS, A. L., BRANQUINHA, M. H. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.106, n. 4, p.507-509, 2011.

MARSDEN, P. P. Selective primary health care: strategies for control of diseases in the developing world XIV. Leishmaniasis. **Ver. Infect. Dis.** v.6, n.5, p.736-744, 1984.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia”, ESCOMEL, 1911). **Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.** v.80, p.859-876, 1985a.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.18, p.187-198, 1985b.

MARTINI, A. S., BUAINAIN, A., GIAZZI, J. F; ROSA, J. A; NETO BELDA, F. M; NETO OLIVEIRA, L. C. Tratamento exoerimental comparativo de giardíase com produto alopático e homeopático. **Pesq. Homeop.**, v.8, n. 2, p. 35, 1993.

MÉNDEZ, A .**Tratado de farmacotécnica homeopático, Alfa/beta**, A. Buenos Aires, 1997.

MOURA, R. A., WADA, C. S., PURCHIO, A., ALMEIDA, T. V. Técnicas de Laboratório, 3 edição, São Paulo, editora Atheneu, 511p. 2002.

MOORE, K. W., DE WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R. L., O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** v.19, p.683-765, 2001.

NAPIER, L. E. The pentavalent compounds of Antimony in the treatment of Kala-Azar. Na Analysis of the results of the treatment in the first 61 cases. **Ind. J. Méd. Res.**, v.15, p.181-186, 1927.

---

NASI, A.M.T.T., RIBEIRO, R.D., LOPES, R.A. Ativação de macrófagos de camundongos com o emprego de Bioterápico. **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.3-4, 1994.

O'GARRA, A., PAULO VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat. Rev. Immunol.** v.7, p.425-428, 2007.

OUELLETTE, M., PAPADOPOULOU, B. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 9 (5), p. 150-153, 1993.

OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J., PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Res. Upd.**, v. 7, p. 257-266, 2004.

PASTORINO, A. C., JACOB, C. M., OSELKA, G. W., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Visceral Leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **J. Pediatr.**, v. 78(2), p. 120-127, 2002.

PAUL, R. E., BREY, P. T. Malaria Parasites and red blood cells: from anaemia to transmission. **Mol. Cells**, v.15, p. 139-149, 2003.

PEARSON, D. R., WHEELER, D., HARRISON, H. L., KAY, D. The immunobiology of leishmaniasis. **Rev. Infec. Dis.**, v.5, p.907-927, 1983.

PEREA, W. A., ANCELLES, T., MOREN, A., NAGELKERKE, M., SONDORP, E. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** Jan-Feb; v.85, n.1, 48-53, 1991.

PEREZ-VICTORIA, F. J., CASTANYS, S., GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrob. Agents Chemother.** V. 47, p. 2397-2403, 2003.

PETERS, C., AEBISCHER, T., STIERHOF, Y. D., FUCHS, M., OVERRATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 3715-3724, 1995.

PLOCK, A., SOKOLOWSKA-KOHLER, W., PRESBER, W., Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. **Exp. Parasitol.**, v.97, p. 141-153, 2001.

PONTIN, K. **Determinação da atividade Biológica de Bioterápico e Extrato de própolis “in vitro” e “in vivo” na infecção experimental determinada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2003. f. 89, Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

POZETTI, G.L. Notas de Farmácia Homeopática. **Inst. Homeop. François Lamasson**. P. 91, 1990.

---

RAMOS, D. C. C., CARDOSO, A. G. T., SPENGER, P. J., NASCIMENTO, N. MESTRINGER., C. L. B., COTRIM, P. C. Growth inhibition of *Leishmania* spp. by irradiated snke venons. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, suppl. II, p.311-312, 2000.

REPKA, D., RANGEL, H. A., ATTA, A. M., GAVINO, V.A., PIEDRABUENA, A. E. Experimental Chagasás diseases in mice infected with one LD50 of parasite. **Rev. Bras. Biol.**, v. 45, p. 309-316, 1985.

RIBEIRO, R.D., LOPES, R.A., CARMO, T.A., GARCIA, T.A.R., ALBUQUERQUE, S., TOLDO, P. R. A. Estudo comparativo dos índices de cura de camundongos tratados com quimioterápicos e TRYPANOSOMINUM (TCD30). **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.19-21, 1987.

RIBEIRO, R.D., LOPES, R. A., NASI, A. M. T. T., GARCIA, T. A. R., CARRARO, A. A. Efeitos de Fatores humorais do Camundongo Tratado com Trypanosominum TC D30, em testes de Lise do *Tripanosoma cruzi* "in vitro". **Pesq. Homeop.**, v.4, p.10-14, 1989.

RODRIGUES, RF., DA SILVA, E. F., ECHEVARRIA, A., FAJARDO-BONIN, R., AMARAL, V. F., LEON, L. L., CANTO-CAVALHEIRO, M. M. A comparative study of mesoinic compounds in *Leishmania* sp. And toxicity evaluation. **Eur. J. Med. Chemistry**. v. 42, p. 1039-1043, 2007.

ROSA, M. D. S., et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Cróton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 47, p. 1895-1901, 2003.

SAMPAIO, S.A.P., RIVITTI, E.A. Dermatologia. São Paulo, **Artes Médicas**, 1998. cap. 45, p. 565-574: Leishmaniose e outras dermatoses por protozoários.

SANTOS, I., SANTOS, I.B., MONTENEGRO, D., LEMOS, E.R., PEREIRA, T. Uso de itraconazol em 26 pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana. **An.Bras.Dermatol.**, v.70, n.2, p.103-7, 1995.

SANTOS, E. C. T., PAIVA, S. R., KAPLAN, M. A. C., BERGMANN, B. R. Atividade anti-leishmania de *Plumbago scandens* (Plumbaginaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v.78, n.1, p.13-15, 1997.

SANTOS, F. F. **Avaliação in vitro e in vivo dos derivados de Ftalimida sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2003. f. 83, Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

SAUVAIN, M., DEDET, J. P., KUNESCH, N., POISSON, J. Isolation of flavans from the Amazonian shrub *Faramea guianensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 403-406, 1994.

---

---

SILVA, I. M; CARVALHO, J. C. T; CUNHA L. C. Bioterápico. Estudo preliminar da resposta imune celular em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich. **Pesq. Homeop.**, v.8, n. 2, p. 44, 1993.

SOTO, J, TOLEDO, J., GUTIERREZ, P., NICHOLLS, R.S., PADILLA, J., ENGEL, J., FISHER, C., VOSS, A., BERMAN, J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. E57-E61, 2001.

SOUZA, M.L. Controlled trials in homeopathy individualization x bias: **In Congress of the Liga Medicorum Homoeopahica Internationalis**. v. 54, p. 47, 1999.

SUNDAR, S., JHA, T. K., THAKUR, C. P., ENGEL, J., SINDERMANN, H., FISCHER, C., JUNGE, K., BRYCESON, A., BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl. J. Méd.** v. 347, p. 1739-1746, 2002.

VANNIER, L. **A idéia da homeopatia na história**. Tradução de José Batista. Revista APH, v. 59, nr. 1. 1994

VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, 2Ed., vol. 2. São Paulo: Atheneu, 1999.

VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**, 2Ed., vol. 2. São Paulo: Atheneu, 2002.

VISCHNIAC, I. Influence doses infinitésimales de Plomb sur l'évolution de l'intoxication au Plomb chez l'animal. **Homoeopath. Fr.** v.53, p.21-33, 1965.

VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **Eur J Dermatol.** v.17, n.2, p.115-22, 2007.

WEATHERALL, D. J., MILLER, L. H., BARUCH, D. I., MARSH, K., DOUMBO, O. K., CASALS-PASCUAL, C., ROBERTS D. J. Malaria and red cell. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)**, p. 35-57, 2002.

World Health Organization. Consulta realizada no site <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> em 20 de junho de 2011.

WURMSER, L. Influence des doses infinitesimales sur la cinétique des éliminations. **Doc. L.H.F.** v.39, p.13, 1957.

WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 17; 279 (38) p. 39925-32, 2004.

YAN-JIA, L. A review of Kalazar in China from 1949 to 1959. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.76, p.531-537, 1982.