

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Patologia

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *LEISHMANIA*  
(*LEISHMANIA*) *CHAGASI* EM HAMSTERS (*MESOCRICETUS AURATUS*) PELO  
TRATAMENTO COM O COMPLEXO DE MEDICAÇÕES ULTRA-DILUÍDAS  
FATORES DE AUTO-ORGANIZAÇÃO

Silvio Leite Monteiro da Silva

Belo Horizonte  
2010

SILVIO LEITE MONTEIRO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *LEISHMANIA*  
(*LEISHMANIA*) *CHAGASI* EM HAMSTERS (*MESOCRICETUS AURATUS*) PELO  
TRATAMENTO COM O COMPLEXO DE MEDICAÇÕES ULTRA-DILUÍDAS  
FATORES DE AUTO-ORGANIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Patologia (Área de concentração: Patologia Geral).

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilene Suzan Marques Michalick

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Barbara Goloubeff

Belo Horizonte  
2010

S586a Silva, Silvio Leite Monteiro da.  
Avaliação da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em hamsters (*Mesocricetus auratus*) pelo tratamento com o complexo de medicações ultra-diluídas [manuscrito]: fatores de auto-organização. / Silvio Leite Monteiro da Silva. - - Belo Horizonte: 2010. 71f.: il.  
Orientador: Wagner Luiz Tafuri.  
Co-Orientador: Marilene Suzan Marques Michalick, Barbara Goloubeff.  
Área de concentração: Patologia Geral.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Infecção. 2. *Leishmania infantum*/patogenicidade. 3. *Mesocricetus*. 4. Leishmaniose Visceral/parasitologia. 5. Homeopatia. 6. Cinquenta Milsimal. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Tafuri, Wagner Luiz. II. Michalick, Marilene Suzan Marques. III. Goloubeff, Barbara. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.  
NLM: QX 70



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **SILVIO LEITE MONTEIRO DA SILVA**, nº de registro 2008652704. Às quatorze horas do dia quatro do mês de fevereiro de dois mil e dez, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DO COMPLEXO DE MEDICAÇÃO ULTRADILUIDA FATORES DE AUTO-ORGANIZAÇÃO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* EM HAMSTERS MESOCRICETUS AURATUS”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da comissão, Prof. Wagner Luiz Tafuri, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri/Orientador  
Profa Dra. Leoni Villano Bonamin  
Profa. Dra. Haydeé Maria Moreira  
Profa. Dra. Barbara Goloubeff

Instituição: UFMG  
Instituição: UNIP  
Instituição: FMEMA  
Instituição: UFMG

Indicação: APROVADO  
Indicação: APROVADO  
Indicação: APROVADO  
Indicação: APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 04 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri/Orientador \_\_\_\_\_

Profa Dra. Leoni Villano Bonamin \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Haydeé Maria Moreira \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Barbara Goloubeff \_\_\_\_\_

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) \_\_\_\_\_

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.  
PROF. GEOMANNI DANTAS CASSALI  
Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina/UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
E-mail: cpg@medicina.ufmg.br



## DECLARAÇÃO

Declaramos que **SILVIO LEITE MONTEIRO DA SILVA**, no dia quatro de fevereiro de dois mil e dez, defendeu dissertação intitulada: "**AValiação DO COMPLEXO DE MEDICAÇÃO ULTRADILUIDA FATORES DE AUTO-ORGANIZAÇÃO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR Leishmania (Leishmania) chagasi EM HAMSTERS MESOCRICETUS AURATUS**"; foi aprovado, obtendo o título de Mestre em Patologia – Área de Concentração em Patologia Investigativa, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2013.



**Sophia Ferreira Corrêa da Silva**  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

# *Agradecimentos*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Norma Melo pela cultura e inóculos de *Leishmania chagasi* gentilmente cedidos;

Técnicas Elza Moreira de Souza, Rosálida Estevam Nazar Lopes, Soraia de Oliveira Silva, Vânia Aparecida N. Silva, Rosângela, Mirna Maciel D'Auriol Souza, Rosângela e Cassiana por toda atenção imprescindível e atividades desempenhadas;

Prof. Dr. Adolfo Firmino da Silva Neto pelos anticorpos gentilmente cedidos;

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda Quércia Vieira e Prof. Dr. Alfredo Goes pelos adjuvantes gentilmente cedidos;

Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte pela câmara gentilmente cedida;

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Martha Bernardi pela colaboração na análise e interpretação dos resultados;

Prof.<sup>a</sup> Vanessa Galego Arias Pecorari pela revisão final da estatística;

Miria de Amorim, equipe FAO e Farmácia Alquiotupã pelas sugestões, medicação, vidros, insumos gentilmente cedidos;

Bárbara Laurice Araújo Verçosa pelo apoio nas atividades e sugestões, em especial às leituras do índice de LDU;

Carolina e Marta pelo excepcional apoio nas atividades;

Estagiário Leonardo Arruda Moraes Raso atenção ímpar às solicitações;

Adeline, Dri, Elencj, Mari, Mari Joe, Isabela pela parte não-acadêmica;

Elo, Eliana, Rodrigo e Adão e a todos os colegas de pós-graduação e demais que estiveram presentes no convívio ou participaram de qualquer forma;

Todos os parentes e amigos;

Especiais aos orientadores – meus professores – como exemplos de pessoas humanas e profissionais, pelo processo de ensino e aprendizado, e pela oportunidade ímpar para a realização desta pesquisa;

Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri;

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilene Suzan Marques Michalick;

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Barbara Goloubeff;

Aos animais.

# *Dedicatória*

Dedico este trabalho aos meus pais, Waldemar e Sara, que me proporcionaram as mais importantes referências de paz, amor e felicidade que desfruto hoje.

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, no Departamento de Patologia Geral e no Departamento de Parasitologia, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



# Sumário

LISTA DE FIGURAS E TABELAS . . . . .	V
ABREVIATURAS E SIGLAS . . . . .	VIII
RESUMO . . . . .	X
<i>1</i> <i>Introdução</i> . . . . .	12
1.1 <b>O Hamster como Modelo Experimental</b> . . . . .	13
1.2 <b>Tratamento recomendado para Leishmaniose</b> . . . . .	13
1.3 <b>Medicações Ultra-diluídas</b> . . . . .	15
<i>2</i> <i>Objetivos</i> . . . . .	16
2.1 <b>Objetivo Geral</b> . . . . .	16
2.2 <b>Objetivos específicos</b> . . . . .	16
<i>3</i> <i>Material e métodos</i> . . . . .	17
3.1 <b>Animais</b> . . . . .	17
3.2 <b>Infecção experimental</b> . . . . .	17
3.3 <b>Tratamento</b> . . . . .	18
3.4 <b>Avaliação Clínica</b> . . . . .	21
3.5 <b>Coleta de Material</b> . . . . .	22
3.6 <b>Histopatologia</b> . . . . .	23
3.6.1 <i>Baço</i> . . . . .	23
3.6.2 <i>Fígado</i> . . . . .	25
3.7 <b>Índice de LDU e Índice do órgão</b> . . . . .	25
3.8 <b>Imunoistoquímica</b> . . . . .	26
3.9 <b>Produção do anticorpo policlonal de coelho</b> . . . . .	27
3.10 <b>Análise estatística</b> . . . . .	28
3.11 <b>Ética em experimentação animal</b> . . . . .	28
<i>4</i> <i>Resultados</i> . . . . .	29
4.1 <b>Avaliação Clínica</b> . . . . .	30
4.1.1 <i>Sobrevida</i> . . . . .	30
4.1.2 <i>Evolução da massa corpórea</i> . . . . .	31
4.1.3 <i>Consumo de ração</i> . . . . .	34
4.1.4 <i>Aspectos clínicos</i> . . . . .	35
4.2 <b>Baço</b> . . . . .	37
4.2.1 <i>Análise Morfométrica do parasitismo tecidual</i> . . . . .	37
4.2.2 <i>Índice de LDU e índice esplênico</i> . . . . .	37
4.2.3 <i>Histopatologia - Interpretação histopatológica</i> . . . . .	38
4.3 <b>Fígado</b> . . . . .	42
4.3.1 <i>Parasitismo tecidual - Análise Morfométrica</i> . . . . .	42
4.3.2 <i>Índice de LDU e índice hepático</i> . . . . .	42
4.3.3 <i>Histopatologia - Interpretação histopatológica</i> . . . . .	43
4.4 <b>Sumário dos resultados</b> . . . . .	49
<i>5</i> <i>Discussão</i> . . . . .	50
<i>6</i> <i>Conclusões</i> . . . . .	57
<b>ABSTRACT</b> . . . . .	58
<i>7</i> <i>Referências Bibliográficas</i> . . . . .	59
<i>8</i> <i>Anexos</i> . . . . .	65
8.1 <b>Anexo I - Certificado para pesquisa com animais</b> . . . . .	66
8.2 <b>Anexo II - Protocolo de imunização para coelhos</b> . . . . .	67
8.3 <b>Anexo III – Figuras 3, 4 e 5 em preto-e-branco</b> . . . . .	68

# *Lista de figuras e tabelas*

**Figura 1.** Fluxograma parcial do delineamento experimental dos animais infectados. **18**

**Figura 2.** Reprodução da cartela original onde eram apresentados os medicamentos para administração. Cada número de 1 (um) a 25 (vinte e cinco) correspondia a um frasco que continha 5 (cinco) glóbulos da medicação indicada. **19**

**Tabela 1.** Sequência da medicação utilizada com ordem de administração na sequência da série, potência, escala e intervalos utilizados. **20**

**Gráfico 1.** Fêmeas: curva de sobrevida entre o grupo experimental e o grupo controle positivo, Log-Rank Test (Collett), \* valor de  $p < 0,05$ . **30**

**Gráfico 2.** Machos: curva de sobrevida entre o grupo experimental e o grupo controle positivo, Log-Rank Test (Collett), valor de  $p > 0,05$ . A sobrevida é apresentada com  $n = 13$  animais entretanto existem dados histológicos para  $n = 12$ . Este fato é devido a uma perda entre o dia da finalização da análise da sobrevida e a coleta de material, por isso há diferença de uma unidade no universo amostral entre estes parâmetros. A autólise do material ao ser encontrado impede seu aproveitamento para as análises histológicas. **31**

**Gráfico 3.** Evolução ponderal de machos e fêmeas com a análise de variância de duas vias. \*  $p < 0,001$ . No gráfico são apresentados a média e erro padrão. **32**

**Tabela 2.** Relação da massa média, desvio padrão e  $n$  dos animais dos diversos grupos em relação ao tempo. **33**

**Gráfico 4.** Evolução ponderal do consumo de ração diária individual ajustada por animal para os grupos durante o tempo. \* valor de  $p < 0,05$  entre o grupo experimental de machos e o grupo controle positivo de machos. **34**

**Tabela 3.** Relação da média de consumo de ração individual diário por semana nos diversos grupos em relação ao tempo. **35**

**Tabela 4.** Resultados das avaliações clínicas.

36

**Tabela 5.** Resumo das observações histopatológicas no baço de hamsters infectados por *Leishmania chagasi* nos diferentes grupos.

**Figura 3 - imagens A, B, C, D, E, F, G e H.** Cortes histológicos parafinados de baço de hamsters (grupo controle) infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Microfotografia mostrando parênquima esplênico evidenciando a polpa branca caracterizada pela presença da arteríola central (corte longitudinal). HE. Barra = 32µm; (B) Em aumento maior observar a substituição de linfócitos da bainha peri-arteriolar por células de núcleos grandes e claros de cromatina frouxa (setas). HE. Barra = 16 µm; AC (Arteriola Central); BP (Bainha Peri-arteriolar); PB (Polpa Branca) ; (C) Observar polpa branca (PB) sem formação de centro germinativo e depleção de linfócitos próximos a arteríola central (AC) (setas) HE. Barra = 16 µm; (D) Presença de formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas na área de depleção linfocitária (setas). Estreptoavidina peroxidase. HE. Barra = 16 µm. (E) Formação de granulomas (Gr) na Zona Marginal (ZM) esplênica (setas). HE. Barra = 16 µm. PV (Polpa Vermelha); (F) Formação de três granulomas na polpa vermelha esplênica (PV) HE. Barra = 16 µm; (G) Presença de inúmeras formas amastigotas de *Leishmania*

**Tabela 6.** Resumo das observações histopatológicas no fígado de hamsters infectados por *Leishmania chagasi* nos diferentes grupos.

**Figura 4 – imagens A, B, C, D, E, F, G e H.** Cortes histológicos parafinados de fígado de hamsters (grupo controle, exceto (F) infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Microfotografia panorâmica mostrando espaço-porta com discreto infiltrado inflamatório. HE. Barra = 62µm; (B) Microfotografia mostrando espaço-porta com intenso infiltrado inflamatório intenso HE. Barra = 32 µm e em (C), em maior aumento, notar que o infiltrado forma um granuloma com presença de células epitelióides HE. Barra = 16 µm (setas); (D) Observar a formação de um granuloma no lóbulo hepático (granuloma intralobular hepático) (seta) próximo ao espaço-porta; HE. Barra = 16 µm; (E) Detalhe das células que compõe os granulomas intralobulares constituídos principalmente por macrófagos epitelióides (setas) e linfócitos (cabeça de setas) HE= 16 µm; (F) Presença de formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas no granuloma intralobular a

direita (cabeças de seta). Estreptoavidina peroxidase. HE. Barra = 16 µm; (G) Infiltrado inflamatório de células mononucleares localizado no interior do lóbulo hepático. Notar o grande número de plasmócitos (cabeças de seta) seguido de pequenos linfócitos (pequenas setas) e macrófagos (grandes setas). Presença de um megacariócito (M) adjacente ao infiltrado inflamatório. HE. Barra = 16 µm; (H) Ao centro da foto notar a presença de hepatócitos aumentados de volume e citoplasma de vacuolizado indicando esteatose. Barra = 16 µm.

**Figura 5 – imagens A, B, C, D, E e F.** Cortes histológicos parafinados de fígado **49** de hamsters (grupo controle) infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Observar a formação de granuloma no espaço porta com presença de célula gigante contendo no seu citoplasma material hialino em destaque (seta). HE. Barra = 16 µm. (B) e (C) Formação de granuloma intralobular hepático com presença de célula gigante contendo no seu interior material hialino em destaque (seta). HE. Barra = 16 µm; (D) Presença de algumas formas amastigotas imunomarcadas de *Leishmania* no interior de macrófagos do granuloma (setas). Notar a célula gigante do tipo Langhans (seta). Estreptoavidina peroxidase. HE. Barra = 16 µm. (E) Espessamento da cápsula com contigüidade a um espaço-porta. HE. Barra = 16 µm. (F) Observar macrófagos abarrotados de formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas Estreptoavidina peroxidase. HE. Barra = 16 µm.

**Figura 6.** Diagrama dos resultados e sua relação de significância entre os grupos **51** experimental e controle positivo para o respectivo sexo ao valor de  $p < 0,05$  e tendências à significância com valor de  $p$  entre 0,10 e 0,05. A origem da seta indica que o grupo apresenta maior valor para o parâmetro indicado do que o grupo representado na extremidade de destino.

# Abreviaturas e siglas

%	Por cento
+	Uma cruz
++	Duas cruces
+++	Três cruces
<	Menor que
=	Igual a
>	Maior que
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°C	Graus Centígrados
<b>100x</b>	Aumento de cem vezes
<b>10x</b>	Aumento de dez vezes
<b>1X</b>	Uma vez
<b>20x</b>	Aumento de vinte vezes
<b>40x</b>	Aumento de quarenta vezes
<b>AC</b>	Arteriola central
<b>AC</b>	Arteriola central
<b>AG</b>	antígeno
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i>
<b>antiCR3</b>	Anticorpo para o receptor 3 do sistema complemento
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BP</b>	Bainha periarteolar
<b>BR</b>	Brasil
<b>CD11b</b>	Componente da integrina da cadeia alfa do heterodímero CR3
<b>CEBIO</b>	Centro de Bioterismo
<b>CETEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>CF</b>	controle positivo de fêmeas
<b>CM</b>	controle positivo de machos
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico (dióxido de carbono)
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DL50</b>	Dose Letal que afeta 50% da população exposta
<b>Dr.</b>	Doutor
<b>Dr.<sup>a</sup></b>	Doutora
<b>EF</b>	experimental de fêmeas
<b>EM</b>	experimental de machos
<b>FAO</b>	Fatores de Auto-organização
<b>g</b>	gramas
<b>GIEMSA</b>	Método de coloração histológica

<b>Gr</b>	Granulomas
<b>h</b>	horas
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>Kd</b>	Unidade de peso Kilo Daltons
<b>L.</b>	<i>Leishmania</i>
<b>L. chagasi</b>	<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
<b>LDU</b>	<i>Leishman Donovan Unit</i>
<b>LM</b>	Escala cinquenta milésimal
<b>LPL</b>	Laboratório de Patologia das Leishmanioses
<b>MAbs</b>	<i>Monoclonal antibodies</i>
<b>MEM</b>	Meio Essencial Mínimo para cultura de bactérias
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	miliLitros
<b>mM</b>	miliMolar
<b>N</b>	Universo amostral
<b>n</b>	Universo amostral
<b>NNN</b>	Meio de cultura Novy, McNeal e Nicolle
<b>p53</b>	Proteína de 53 Kd expressa pelo gene supressor de tumor p53
<b>PB</b>	Polpa branca
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Saline</i> - Tampão Salina Fosfato
<b>Prof.</b>	Professor
<b>Prof.<sup>a</sup></b>	Professora
<b>PV</b>	Polpa vermelha
<b>RJ</b>	Rio de Janeiro
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> – desvio padrão
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i> - erro padrão
<b>SP</b>	São Paulo
<b>TGF-beta</b>	<i>Transforming growth factor - beta</i>
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UI</b>	Unidades Internacionais
<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>ZM</b>	Zona marginal
<b>µL</b>	Micro Litros

# Resumo

A Leishmaniose é uma doença antiga, negligenciada e reincidente que merece uma solução nova. Distribui-se entre os trópicos e os subtropicais, apresenta-se nas formas visceral, muco-cutânea e cutânea; ocorre em pessoas e especialmente em cães. A interação hospedeiro-parasito é afetada pelo sexo devido à influência hormonal na imunidade. O agente etiológico utilizado neste estudo é o protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, conhecido também por *Leishmania infantum*, cepa MHON/BR/1972/BH400 originária da forma visceral canina na concentração de  $1 \times 10^6$  promastigotas. O hamster é um dos modelos clássicos e foi utilizado neste estudo porque é susceptível à doença, apresenta sinais clínicos, histológicos e parasitológicos com alta letalidade. Os tratamentos estabelecidos para humanos apresentam resistência, efeitos colaterais, são tóxicos aos rins e fígado, mas se não for tratada é fatal. A Terapêutica FAO (Fatores de Auto-organização) é uma modalidade da Homeopatia concebida como pesquisa-ação e trata diversas patologias clínicas para humanos e animais. As medicações ultra diluídas que compõem a série são: *Antimonium crudum* (sulfeto de antimônio); *Kali carbonicum* (carbonato de potássio); *Mercurius solubilis* (nitrito de mercúrio); *Sulphur* (enxofre); *Natrum muriaticum* (cloreto de sódio); *Aurum metallicum* (ouro); *Ammonium muriaticum* (cloreto de amônia). As potências 5 (cinco) e 3 (três); e 12 (doze) e 3 (três) da escala cinquenta milesimal, popularmente conhecida como LM, foram utilizadas nesta ordem e administradas em 2 (duas) séries penta, realizadas aos 17 (dezesete) e 20 (vinte) dias após a inoculação do agente. Os sinais clínicos avaliados foram sobrevida, evolução da massa corporal, consumo de ração, alopecia, diminuição das atividades, desidratação, caquexia e ascite. Os sinais da carga parasitária para o baço e fígado foram imunoistoquímica para amastigotas de *Leishmania*, índice de LDU de baço e de fígado, índice esplênico e hepático. Os sinais das alterações macroscópicas e microscópicas avaliados por análise semi-quantitativa ou qualitativa para a histopatologia do baço foram: parasitismo tecidual, presença de granulomas esplênicos, hiperplasia dos macrófagos da polpa vermelha, e presença de depleção da polpa branca; e para o fígado foram: parasitismo tecidual, presença de granulomas intralobulares, inflamação portal, hiperplasia das células de Kupffer, amiloidose, hiperemia (congestão). As comparações foram realizadas entre os grupos experimental e controle positivo do mesmo sexo e foram considerados significantes valores de  $p < 0,05$ . Foram utilizados os testes de Lilliefors para normalidade, teste t, Mann-Whitney, análise da variância de duas vias, Log-Rank test e teste exato de Fisher. Este estudo teve aprovação prévia do comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CONCEA) de registro 210/2007. O sucesso da infecção no modelo foi confirmado por demonstração direta do parasito no esfregaço. Os animais foram acompanhados a partir dos 3 (três) meses de vida até o 106º dia de infecção, e o fator sexo influenciou o desenvolvimento da doença e o efeito do tratamento. Significativamente, a sobrevida e a redução da alopecia foram menor e a imunoistoquímica maior, todos para as fêmeas medicadas; houve aumento da evolução da massa corporal para machos e fêmeas medicados; e houve redução na formação de granulomas para os machos medicados; todos comparados em relação aos seus respectivos controles positivos. Os parâmetros: consumo de ração, imunoistoquímica de baço para machos, depleção, parasitismo, células de Kupffer, índice hepático, apresentaram ausência de significância com valor de p entre 0,05 e 0,10. Ao considerar que a relação hospedeiro-parasito será influenciada pelo sexo através da ação de hormônios; a determinação para evolução da doença no baço ou a resolução com formação de granulomas no fígado, em última instância, será determinada por um ajuste fino na resposta do sistema imunológico; e que as medicações ultra diluídas são capazes de causar imunomodulação e *cicle arrest*, observamos que a medicação alterou o curso da doença de forma significativa, em especial favorável a fêmeas. Futuros trabalhos podem identificar os mecanismos deste fenômeno; avaliar o risco de transmissão do parasito na pele; os efeitos em relação à ampla gama de escalas e potências; associada ou não a outros tratamentos, a fim de determinar a melhor relação entre efeito-escala-potência para esta ferramenta terapêutica.

# 1. Introdução

As Leishmanioses são doenças de distribuição mundial e ocorrem principalmente em zonas tropicais e subtropicais. Apresentam-se sob as formas clínicas cutânea, cutâneo-mucosa, e visceral em humanos. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* os quais são transmitidos por vetores flebótomos fêmeas no momento da picada. Ocorrem em animais silvestres como roedores, canídeos, marsupiais, dasipodídeos, felídeos e eqüídeos (ROTUREAU, 2006, ARRAES et al., 2008). A forma visceral pode ser fatal para o homem e o cão doméstico ao participar do ciclo do parasito se não forem tratados. Inicialmente restrita a áreas rurais, é hoje encontrada em áreas periurbana e urbana. Crianças desnutridas, co-infectados pelo HIV e portadores de doenças metabólicas (como diabéticos) estão entre a população de maior risco (MURRAY; NATHAN, 2005).

O protozoário pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. Seu ciclo de vida é heterogênico e compreende forma extracelular, promastigota no inseto vetor. A outra forma é intracelular obrigatória, encontrada em mamíferos quando se apresenta na forma amastigota. Ao se alimentar no hospedeiro vertebrado o vetor fêmeas da ordem *Diptera*, sub-família *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, ingere formas amastigotas e após o desenvolvimento do parasito no seu trato digestivo, torna o inseto infectado. No repasto sanguíneo seguinte, o inseto inocula com sua saliva, formas promastigotas na fase metacíclica e assim completa-se o ciclo (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Após a infecção nos hospedeiros vertebrados, as formas promastigotas metacíclicas, permanecem no espaço extracelular, promovendo ativação de complemento e conseqüente leucotaxia. Durante este processo, algumas formas promastigotas são destruídas pelos polimorfonucleares, enquanto outras são internalizadas pelos macrófagos e envolvidas pela membrana fagossômica, resultando no vacúolo parasitóforo onde se multiplicam (MARSELLA; GOPEGUI, 1998).



O grau de complexidade biológica apresentado pela doença, a insuficiência de resultados apresentados com as ferramentas atuais para o seu controle, assim como os fatores de ordens políticas, socioeconômicas e ambientais agravam o desafio à uma solução para esta doença (WHO, 2004).

### **1.1 O Hamster como modelo experimental**

O hamster é um animal utilizado no estudo da leishmaniose experimental desde a década de 30 do século passado (ADLER; THEODOR, 1931; GATTERMANN et al., 2002). Desde esta época o modelo é reconhecido pela sua susceptibilidade a diversas espécies de *Leishmania* (RIÇA-CAPELA et al., 2003) além de apresentar o perfil de evolução progressiva e fatal da leishmaniose visceral. Este desenvolvimento é semelhante ao que ocorre em humanos, na ausência de um tratamento, e em grande número de cães infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Entretanto, assim como em outros modelos experimentais, sabe-se que ocorrem variações na carga parasitária marcada pela individualidade da relação hospedeiro parasito (AWASTHI et al., 2004) e um balanço imunológico fino irá determinar se haverá resposta no sentido de promover a eliminação parcial do parasito no fígado ou se irá promover a patologia no baço (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

O hamster apresenta notável influência de acordo com o sexo para as infecções por *Leishmania*. A infecção por *Leishmania donovanni* foi investigada em hamsters gonadectomizados e animais tratados com hormônios sexuais. Hamsters de ambos os sexos que receberam testosterona aumentaram a contagem de parasitos enquanto que a administração de estradiol suprimiu a infecção de forma notável (ANURADHA; KATIYAR, 1990). Foram identificadas lesões cutâneas maiores e mais severas em hamsters machos infectados com *Leishmania (Viannia) spp.* Observaram-se duas linhas de evidência indicando diferenças relacionadas ao sexo na evolução da doença. A primeira observação se refere aos animais pré-púberes machos que apresentam lesões cutâneas menos intensas. A segunda é a intensa infecção observada em fêmeas tratadas com testosterona. Foi identificado que a severidade da doença no macho comparado à

fêmea, deve-se à expressão intralésional da interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), além da presença do fator de necrose tumoral beta (TGF-beta) (TRAVI et al., 2002).

As alterações esperadas da doença são: anemia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, desidratação, caquexia, ascite e óbito. Alterações histológicas como hipoplasia da polpa branca (depleção da área T dependente) e predomínio da polpa vermelha esplênica e inflamação crônica portal granulomatosa no fígado, podem ser observadas. O aumento gradual desses órgãos pode ser explicado pela reatividade tecidual (hiperplasia e hipertrofia de macrófagos, granulomas, fibrose) em virtude da presença dos parasitos, pois esses animais são altamente suscetíveis como descrito anteriormente. A deposição de substância amilóide em órgão como fígado, baço e rins também é uma alteração potencialmente útil para caracterização da infecção por *Leishmania chagasi* (CORBETT et al., 1992; RIÇA-CAPELA et al., 2003).

## **1.2 Tratamento recomendado para Leishmaniose**

O medicamento de primeira escolha recomendado para o tratamento de Leishmaniose Visceral Humana é o antimônio pentavalente injetável, uma droga cardiopéptica que causa diversos efeitos colaterais. Existe cerca de 10% de insucesso no tratamento. Além disso, na Índia tem sido relatada resistência à droga, com aumento de dez vezes na concentração da dose e três vezes a duração do tratamento desde que foi utilizada inicialmente (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Há troca de material genético do agente como mecanismo de escape. Esse processo ocorre no vetor flebótomo, e assim, os parasitos híbridos são transmitidos pela picada (AKOPYANTS et al., 2009).

O modelo atual da biomedicina alcançou grande visibilidade no sucesso que obtém nas condições agudas, entretanto, com o aumento progressivo dos custos de tratamento das doenças, da prevalência de doenças crônicas e das dificuldades para evitá-las, dos efeitos colaterais e mortalidade ocasionados pela toxicidade das drogas prescritas e crescente resistência a antimicrobianos, tudo isso motivou o aumento da procura por

tratamentos com medicações ultra diluídas na Europa e no Brasil (MONTEIRO; IRIAT, 2007), com objetivos de reduzir a ocorrência de efeitos tóxicos, principalmente para doenças crônicas (EUROPEAN COMMITTEE FOR HOMEOPATHY, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) recomenda a incorporação da homeopatia aos sistemas de saúde e em seus programas desde a década de 80 e esta ação se adere ao princípio da liberdade de escolha terapêutica pelos cidadãos (WHO, 2009). O Brasil é um exemplo que tem a homeopatia considerada como especialidade médica, médico-veterinária e farmacêutica adequadamente regulamentadas. A Homeopatia faz parte do Programa Nacional de Práticas Integrativas Complementares no Sistema Único de Saúde do Brasil (BRASIL, 2006; WHO, 1999) e esta ação reflete a opinião da demanda social e a consequente pressão política a seu favor (GALHARDI; BARROS, 2008).

A literatura científica atual contém um corpo maciço substancial de evidências e provas para a utilização das medicações ultra-diluídas, sob condições experimentais bem conhecidas, que permitem a compreensão da utilização e dos fenômenos que relacionam-se ao método, particularmente relacionadas ao sistema imunológico e defesas do organismo (BELLAVITE et al., 2005; BONAMIN et al. 2013).

Observa-se sensibilidade de sistemas vivos, além das modulações *in vitro*, induzidas por ultra-diluições de substâncias naturais ou endógenas, em imun alergologia. BELLAVITE et al., 2006a apresentaram resultados de diferentes trabalhos demonstrando a existência de efeitos por preparados ultra-diluídos, principalmente na inflamação e no sistema imune, concluindo que as bases científicas relacionadas com este método podem ser acessadas por meio de várias abordagens teóricas e experimentais.

A ação das ultra-diluições deve-se ao efeito de modulação e não na deflagração do efeito biológico. Observa também que o aspecto mais intrigante em relação às propriedades das ultra-diluições seja a não linearidade e a globalidade de efeitos (BONAMIN et al., 2007).

### 1.3 Medicções Ultra-diluídas

Na investigação de mecanismos de ação de substâncias ultra diluídas, o *cicle arrest* é o fenômeno que interrompe o ciclo do agente estudado. Este fenômeno foi observado na apoptose de células tumorais *in vitro* (FRENKEL et al., 2009), via p53 e outras proteínas de modulação do crescimento celular. O mesmo foi observado nos processos de imuno modulação por *Calcareia carbonica* (SAHA et al., 2013). O *cicle arrest* também ocorre na ativação de macrófagos de camundongos Swiss com aumento significativo da fagocitose mediante a presença de células neoplásicas (LOPES et al., 2006). Na relação hospedeiro-parasita também se observa fenômeno semelhante. O tratamento de camundongos com *Arsenicum album* aumentou a quantidade de plasmodium fagocitado mas evitou a ocorrência de fatalidades (LIRA-SALAZAR et al., 2006).

A utilização de outro complexo de medicações ultra-diluídas *in vivo* no modelo camundongos Balb/c e *Leishmania (L.) amazonensis*, afetou o mecanismo regulatório de controle da infecção determinando a cicatrização mais precoce da ferida em relação ao grupo controle e reduziu o parasitismo no baço e linfonodo dos animais. *In vitro*, estes autores observaram a redução da infecção e o aumento significativo da produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (PEREIRA et al., 2005).

Os efeitos do complexo homeopático “Fatores de Auto-organização” foram relatados na desintoxicação aguda experimental em ratos machos Wistar na dose letal que afeta metade do grupo por pesticida organofosforado sem causar efeitos colaterais, o tratamento possibilitou de sobrevida de todos os animais (MOREIRA; AMORIM, 2008). Da mesma forma, camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich apresentaram sobrevida por mais de dois ano (MOREIRA et al, 2011). Este método tem sido empregado na clínica homeopática humana para diversos fins (AMORIM et al., 2008; MITSUHASHI et al., 2008), assim como na clínica veterinária, como nos casos de osteomielite (MONTEIRO DA SILVA; GOLOUBEFF, 2008), infecções do trato urinário, dermatites atópicas (GOLOUBEFF; MONTEIRO DA SILVA, 2008), especialmente em casos recorrentes em que os tratamentos convencionais não surtem efeito ou há recidivas.

# 2. *Objetivos*

## 2.1 **Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho é avaliar os sinais clínicos e anátomo-patológicos que ocorrem na infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) chagasi* para modelo experimental hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas pelo tratamento com o complexo de medicações ultra diluídas Fatores de Auto-organização.

## 2.2 **Objetivos específicos**

1- Avaliar os parâmetros clínicos sobrevida, consumo de ração, evolução da massa corpórea individual dos animais, astenia, esplenomegalia, hepatomegalia, alopecia, ascite, caquexia, desidratação, diminuição das atividades.

2- Realizar a imunoistoquímica, o índice de LDU do fígado e do baço, massa do baço e massa do fígado para avaliar a carga parasitária.

3- Avaliar as alterações macroscópicas e microscópicas presentes no fígado e no baço relevantes para a Leishmaniose por meio de exames anátomo-patológicos qualitativos e avaliação em escalas.

# 3. *Material e Métodos*

## 3.1 Animais

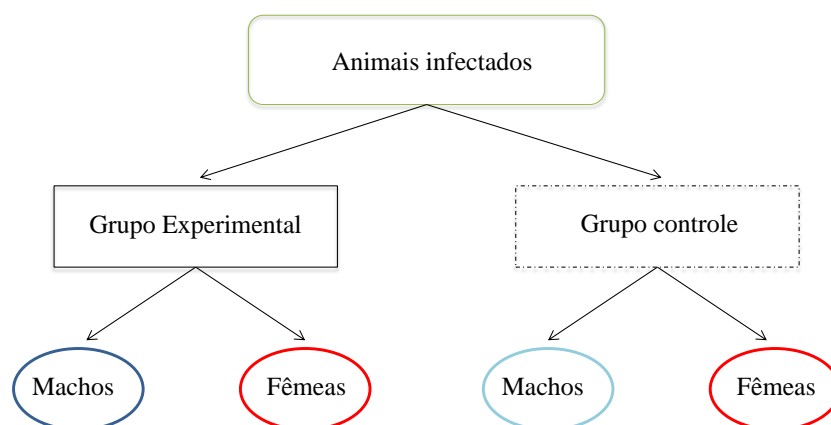
Cinquenta e dois hamsters (*Mesocricetus auratus*), 26 (vinte e seis) machos e 26 (vinte e seis) fêmeas, com idade de 3 (três) meses e de padrão sanitário convencional foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG). Foram separados em dois grupos para cada sexo de forma que o grupo experimental tivesse 10 (dez) animais e o grupo controle positivo tivesse 15 (quinze) animais distribuídos em 5 (cinco) gaiolas, para cada sexo, no total de 10 (dez) gaiolas. Todos foram mantidos no biotério que serve ao Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG com temperatura controlada a 25°C em estante ventilada com filtros de ar, isolamento acústico e de radio frequência (Alesco<sup>®</sup>, duas portas).

As gaiolas foram providas de cobertura de material absorvente de dejetos no fundo, repostos e todas higienizadas semanalmente. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. As gaiolas foram distribuídas alternadamente nas prateleiras da estante em sala com dispositivos de segurança necessários.

## 3.2 Infecção Experimental

Todos os animais foram experimentalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* cepa MHON/BR/1972/BH400, notória pela sua virulência, isolada de cão na UFMG, mantido por passagem *in vivo* de hamster para hamster, e crescidos antes da 5<sup>a</sup> (quinta) passagem em cultura. A infecção pode ser confirmada parasitologicamente *post mortem* por esfregaço por aposição (*imprint*) de baço/GIEMSA. A denominação *Leishmania chagasi* é utilizado no Brasil e foi demonstrado que o agente é geneticamente muito semelhante à *Leishmania infantum*.

Os animais foram inoculados com  $1 \times 10^6$  formas promastigotas dos parasitos na fase estacionária de crescimento suspensos em 500 $\mu$ L do meio via intraperitoneal, e crescidos em meio de cultura NNN/alfa-MEM (Gibco-BRL-USA) com 10% soro fetal bovino inativado (Cultilab-SP-BR) contendo 2mM glutamina, 100UI/mL de penicilina G e 100g/mL de estreptomicina, mantidos a 23°C em incubadora (Fanem<sup>®</sup> modelo 347).



**Figura 1.** Fluxograma parcial do delineamento experimental dos animais infectados.

### 3.3 Tratamento

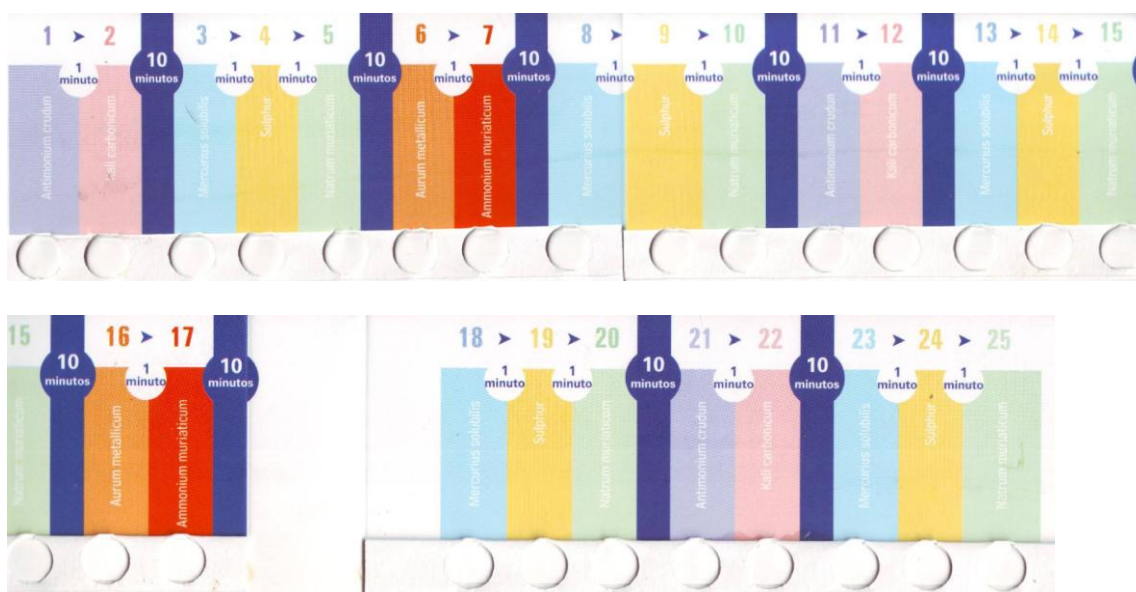
Após 17 (dezesete) dias da infecção experimental 40 (quarenta) dos 50 (cinquenta) animais receberam o tratamento conforme o grupo: complexo de medicação ou placebo e foram administrado em duas séries com 3 (três) dias entre elas. Aqueles pertencentes ao grupo experimental receberam o complexo de medicação ultra-diluída, denominada Fatores de Auto-organização, composto pelos medicamentos descritos a seguir com as denominações homeopáticas em latim e a substância que o originou:

- (1) *Antimonium crudum* (sulfeto de antimônio);
- (2) *Kali carbonicum* (carbonato de potássio);
- (3) *Mercurius solubilis* (nitrato de mercúrio);
- (4) *Sulphur* (enxofre);
- (5) *Natrum muriaticum* (cloreto de sódio);
- (6) *Aurum metallicum* (ouro);
- (7) *Ammonium muriaticum* (cloreto de amônia).

A maioria dos medicamentos ultradiluídos derivam-se de vegetais, minerais ou animais e cada medicamento é feito pelas técnicas de diluição e dinamização seriadas das substâncias (KHUDA-BUKHSH, 2006). De acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA):

*"O farmacêutico homeopata transforma essas substâncias em medicamentos homeopáticos através de uma técnica especial chamada dinamização. Essa técnica libera as propriedades medicinais da substância original."*

Foram utilizadas as potências 5 (cinco) e 3 (três) cinquenta milesimal e 12 (doze) e 3 (três) cinquenta milesimal para cada série com intervalos fixos entre as medicações de 1 (um) ou 10 (dez) minutos de forma que os sete primeiros componentes da série medicamentosa na potência 5 (cinco) cinquenta milesimal na primeira vez e 12 (doze) cinquenta milesimal na segunda vez, vide Figura 2 e Tabela 1. Todas os demais componentes da série foram ministrados na potência 3 (três) cinquenta milesimal. O intervalo entre a administração das duas foi de 3 (três) dias e este procedimento foi realizado simultaneamente para o grupo em cego tratado com placebo.



**Figura 2.** Reprodução da cartela original onde eram apresentados os medicamentos para administração. Cada número de 1 (um) a 25 (vinte e cinco) correspondia a um frasco que continha 5 (cinco) glóbulos da medicação indicada.



**Tabela 1.** Sequência da medicação utilizada com ordem de administração na sequência da série, potência, escala e intervalos utilizados.

<i>Ordem</i>	<i>Nome da medicação</i>	<i>Potência na primeira série</i>	<i>Potência na segunda série</i>	<i>Escala de ambas potências</i>	<i>Intervalo para medicação seguinte</i>
1	<i>Antimonium crudum</i>	5	12	Cinquenta milesimal	1 minuto
2	<i>Kali carbonicum</i>	5	12	Cinquenta milesimal	10 minutos
3	<i>Mercurius solubilis</i>	5	12	Cinquenta milesimal	1 minuto
4	<i>Sulphur</i>	5	12	Cinquenta milesimal	1 minuto
5	<i>Natrum muriaticum</i>	5	12	Cinquenta milesimal	10 minutos
6	<i>Aurum metallicum</i>	5	12	Cinquenta milesimal	1 minuto
7	<i>Ammonium muriaticum</i>	5	12	Cinquenta milesimal	10 minutos
8	<i>Mercurius solubilis</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
9	<i>Sulphur</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
10	<i>Natrum muriaticum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	10 minutos
11	<i>Antimonium crudum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
12	<i>Kali carbonicum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	10 minutos
13	<i>Mercurius solubilis</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
14	<i>Sulphur</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
15	<i>Natrum muriaticum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	10 minutos
16	<i>Aurum metallicum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
17	<i>Ammonium muriaticum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	10 minutos
18	<i>Mercurius solubilis</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
19	<i>Sulphur</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
20	<i>Natrum muriaticum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	10 minutos
21	<i>Antimonium crudum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
22	<i>Kali carbonicum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	10 minutos
23	<i>Mercurius solubilis</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
24	<i>Sulphur</i>	3	3	Cinquenta milesimal	1 minuto
25	<i>Natrum muriaticum</i>	3	3	Cinquenta milesimal	-

*Nota: de acordo com o protocolo da terapêutica Fatores de Auto-organização em 2008.*

A escolha da potência e escala de dinamizações utilizadas foi realizada especificamente para este estudo. O protocolo era aviado pelos médicos habilitados a esta terapêutica com núcleo de atuação na cidade do Rio de Janeiro – RJ, com diversas variações na escala e potência aos pacientes humanos conforme anamnese e evolução terapêutica. A utilização deste método é caracterizada pelo estilo de delineamento pesquisa-ação (TRIPP, 2005) porque tanto a potência quanto a escala variam seu uso conforme o tempo e os critérios de eleição por características inerentes ao trabalho.

A escala cinquenta milesimal é uma das formas farmacêuticas derivadas que representa o resultado do processo de dinamização. Utiliza a concentração decrescente de insumos ativos por meio de diluições seguidas de sucessivas triturações e succussões (BRASIL, 2006) e obedece a proporção de 1:50.000 partes de Insumo ativo:Insumo inerte. Esta escala é conhecida popularmente no Brasil pela abreviação “LM”. A medicação foi preparada em um estabelecimento de referência, [Farmácia Alquioutupã Ltda. (RE 2923), Rio de Janeiro - RJ], com registro na ANVISA adaptado da Farmacopéia Homeopática Brasileira 3 (BRASIL, 2011).

Foram colocados 3 (três) glóbulos da apresentação original do medicamento em 15 mL de solução hidroalcoólica, sem agitar, em 25 vidros âmbar grau de pureza tipo III, identificados com a ordem da seqüência padronizada e codificados conforme tratamento, fechados com batoques e tampas de plástico. O álcool de cereais com grau farmacêutico foi diluído em água bidestilada deionizada e essa solução hidroalcoólica a 5% foi o veículo utilizado, igualmente distribuídos, tanto nos frascos para o grupo controle positivo como para o grupo experimental. Foram administradas 3 (três) gotas de cada frasco da série do protocolo para cada hamster via oral.

### **3.4 Avaliação clínica**

Durante o período experimental, os animais foram acompanhados semanalmente para a determinação da sobrevivência, do consumo de ração, evolução da massa corporal individual dos animais, e os parâmetros clínicos no dia da eutanásia: astenia, esplenomegalia, hepatomegalia, alopecia, ascite, caquexia, desidratação, diminuição das

atividades, peso do baço e peso do fígado. O período de acompanhamento foi de 106 dias e em seguida os animais foram eutanasiados. Este período foi determinado com o início do risco de redução do n no grupo controle com início acentuado de perdas após 90 dias de infecção.

### **3.5 Coleta de material**

Todos os animais foram eutanasiados através do método câmara de CO<sub>2</sub> por 5 (cinco) minutos (BRASIL, 2013) seguida imediatamente pelo deslocamento cervical. A eutanásia por barbitúricos é desaconselhada se for realizar esfregações por aposição a fresco devido à congestão causada no baço e fígado, que impede a camada fina na impregnação da lâmina por aposição e produz uma camada muito espessa de células de forma que impede a identificação e contagem do material.

Os procedimentos de necrópsia e preparo dos materiais para exames histológicos e imunoistoquímicos foram realizados no Laboratório de Patologia das Leishmanioses do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LPL/ICB/UFMG). Todos os animais foram eutanasiados por meio do método câmara de CO<sub>2</sub> por 5 (cinco) minutos (BRASIL, 2013), equipamento gentilmente cedido pelo prof. Dr. Igor Dimitri G. Duarte (Departamento de Farmacologia/ICB/UFMG).

Esfregaços por aposição a fresco (*imprints*) em lâminas limpas e desengorduradas foram realizados com baço e fígado para o LDU. As lâminas foram fixadas em solução de álcool metílico por 5 (cinco) minutos e, após secagem em temperatura ambiente, armazenadas e posteriormente coradas por solução de GIEMSA a 10% (diluição em água destilada).

Amostras de fragmentos do baço e fígado foram coletadas para exames histológicos e imunoistoquímicos. O material foi fixado em solução de formol a 10% tamponada para processamento histológico de rotina, armazenado por mais de 72 h (setenta e duas horas), desidratado, diafanizado, incluído em parafina, cortado em duplicata com 3-4

(três a quatro) micrômetros de espessura, um corado pela Hematoxilina-Eosina (HE) e o outro para imunohistoquímica ilustrados nas figuras 3 e 4.

### **3.6 Histopatologia**

Foram avaliados em escalas os seguintes parâmetros para o baço e fígado:

#### **3.6.1 Baço**

Parasitismo Tecidual – Utilizou-se microscopia óptica convencional, com uso de objetiva de 40x, observando campos histológicos do parênquima esplênico de forma aleatória, mas evitando-se a polpa branca. Consideramos os seguintes parâmetros:

- Discreto: de < 5 amastigotas por campo (+);
- Moderado: 5 a 20 amastigotas por campo (++);
- Intenso > 20 amastigotas por campo (+++);

Presença dos granulomas esplênicos - Utilizou-se microscopia óptica convencional, com uso de objetiva de 20x, observando campos histológicos do parênquima esplênico (polpa vermelha) de forma aleatória, mas evitando-se a polpa branca. Consideramos os seguintes parâmetros:

- Discreto: < 1 por campo (+);
- Moderado: 1 a 3 por campo (++);
- Intenso: > 3 por campo (+++);

Hiperplasia dos macrófagos da polpa vermelha: Utilizou-se microscopia óptica convencional, com uso de objetiva de 40x, observando campos histológicos do

parênquima esplênico (polpa vermelha), mas evitando-se a polpa branca. Consideramos os seguintes parâmetros:

- Discreto: < 40 células por campo (+);
- Moderado: 40 a 80 células por campo (++);
- Intenso: > 80 células por campo (+++);

De forma qualitativa avaliamos:

- A presença de depleção da polpa branca caracterizada pela substituição dos linfócitos da bainha periarteriolar da polpa branca esplênica
- Hipertrofia dos macrófagos da polpa vermelha.
- As alterações vasculares como a hiperemia (congestão).

### 3.6.2 Fígado

Parasitismo Tecidual – Utilizou-se microscopia óptica convencional, com uso de objetiva de 40x, observando campos histológicos do parênquima hepático de forma aleatória, mas evitando-se os espaço-porta. Consideramos os seguintes parâmetros:

- Discreto: de < 5 amastigotas por campo (+);
- Moderado: 5 a 20 amastigotas por campo (++);
- Intenso > 20 amastigotas por campo (+++);

Presença dos granulomas intralobulares - Utilizou-se microscopia óptica convencional, com uso de objetiva de 20x, observando campos histológicos do parênquima hepático de forma aleatória, mas evitando-se os espaço-porta. Consideramos os seguintes parâmetros:

- Discreto: < 1 por campo (+) ;
- Moderado: 1 a 3 por campo (++);
- Intenso: > 3 por campo (+++);

Inflamação portal: Utilizou-se microscopia óptica convencional, com uso de objetiva de 10x, observando campos histológicos do parênquima hepático de forma aleatória, mas evitando-se os lóbulos, isto é, focando os espaço-porta. Consideramos os seguintes parâmetros:

- Discreto: < 30% de comprometimento dos espaço-porta com inflamação por campo (+);
- Moderado: de 30 a 50% de comprometimento dos espaço-porta por campo (++);
- Intenso: > 50% de comprometimento dos espaço-porta com inflamação por campo (+++);

Hiperplasia das células de Kupffer: Utilizou-se microscopia óptica convencional, com uso de objetiva de 40x, observando campos histológicos do parênquima hepático de forma aleatória, mas evitando-se os espaço-porta, isto é, focando os sinusoides nos lóbulos hepáticos. Consideramos os seguintes parâmetros:

- Discreto: 1 a 5 por campo (+);
- Moderado: 5 a 10 por campo (++);
- Intenso: > 10 por campo (+++);

De forma qualitativa avaliamos:

- Presença de lesões regressivas como os processos degenerativos, fibróticos e deposição de amilóide (amiloidose);
- Hipertrofia das células de Kupffer;
- As alterações vasculares de hiperemia (congestão).

### 3.7 Índice de LDU e índice esplênico

Determinou-se, em cada lâmina de esfregaço por aposição de baço, por meio da contagem microscópica de luz (em objetiva de imersão, objetiva de 100x), o número de amastigotas em um mil núcleos de células mononucleadas. A movimentação da lâmina durante a leitura foi realizada de forma sistemática para todo o material. O cálculo do Índice de *Leishman Donovan Units* (LDU) para baço ou fígado consiste na razão do número de amastigotas identificadas à contagem de mil núcleos de células mononucleares, multiplicando-se pelo peso do órgão (STAUBER, 1958).

O índice esplênico avalia o percentual do peso do órgão em relação ao peso vivo do animal. O valor estimado para o baço de animais não infectados selvagens capturados em 2001 é de  $0,08 \pm 0,01$  para machos e  $0,11 \pm 0,02$  para fêmeas. Para baço de hamsters da linhagem de laboratório em um instituto da Alemanha é de  $0,11 \pm 0,01$  para machos e  $0,17 \pm 0,03$  para fêmeas (GATTERMANN et al., 2002). Estes dados foram apresentados para referência sem valor comparativo para este grupo de animais.

### 3.8 Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi utilizada para marcação de formas amastigotas de *Leishmania* em material embebido em parafina (TAFURI et al., 2004) com modificações, de baço e fígado visando detectar a presença do parasito nos órgãos.

As lâminas foram hidratadas em soluções de álcoois decrescentes, e submetidas aos banhos em PBS 1X. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 4% (30 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente, um bloqueio de reações inespecíficas (relacionadas ao anticorpo secundário) foi realizado com leite em pó (caseína) a 6% em PBS 1X, em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente, com lavagem em PBS 1X. Os cortes foram incubados com soro primário 1:200 (anticorpo policlonal *in house* de coelho anti-

*leishmania*) por 24 horas em câmara úmida a 4°C. No dia anterior o anticorpo secundário biotilado foi adicionado por 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Passado este tempo o complexo estreptoavidina peroxidase é adicionado por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A revelação é procedida com a adição da solução reveladora *Diaminobenzidina* (DAB) a 0,024%, acrescida da solução de peróxido de hidrogênio, por cinco minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água corrente e contra-coradas com HE e posteriormente lavadas novamente e desidratadas em álcoois crescentes, diafanizadas em xilol, e montadas com bálsamo do Canadá.

Para cada bateria de 20 (vinte) lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo da reação. O controle negativo, na imunoistoquímica para amastigotas de *Leishmania*, foi feito utilizando-se PBS, em substituição ao anticorpo primário. O controle positivo foi feito utilizando-se uma lâmina com corte histológico de cão com soro de cão 1:50 sabidamente infectado com observação ao microscópio óptico.

A técnica foi padronizada utilizando baço de um hamster altamente parasitado e sabidamente infectado por demonstração parasitológica direta em *imprint* do mesmo órgão (1.497 amastigotas para 1.000 macrófagos) nas diluições do anticorpo primário policlonal em 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. O controle negativo da reação foi uma lâmina do mesmo material incubada com PBS no lugar do anticorpo primário e o controle positivo foi tecido de cão, incubado com anticorpo primário policlonal, soro de cão, 1:50. Todas as diluições testadas, a não ser o controle negativo, marcaram amastigotas no tecido. A melhor marcação obtida foi com 1:200.

### **3.9 Produção do anticorpo policlonal *in house* de coelho anti-*leishmania***

O soro hiperimune de coelho utilizado na imunoistoquímica como anticorpo primário da reação foi produzido *in house* com três inoculações de formas promastigotas, inativadas a 60°C por 10 (dez) minutos, de *Leishmania (Leishmania) chagasi* cepa MHON/BR/1972/BH400 na concentração de  $1 \times 10^6$  da fase estacionária de crescimento, mesma cepa e passagem em cultura utilizada para a infecção experimental



dos hamsters. Foi utilizado Adjuvante de Freud completo e incompleto nas inoculações de dois coelhos, vide protocolo no ANEXO I, provenientes da Fazenda Helio Barbosa da UFMG (Igarapé/MG).

### **3.10 Análises estatísticas**

Para a sobrevida foi utilizado o *Log-Rank test* (método Collett). Para os resultados considerados paramétricos ao teste de Lilliefors foi utilizado o teste t. Os resultados considerados não paramétricos ao teste de Lilliefors e os resultados de escalas em cruces (+, ++ ou +++) foram analisados ao teste de Mann-Whitney. Teste Exato de Fisher foi utilizado para analisar os dados com presença ou ausência do parâmetro avaliado. Todos os testes citados anteriormente e estatística descritiva foram realizados através do programa BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007). Para a evolução da massa corpórea foi utilizado o teste de Lilliefors e o teste variância de duas vias pelo programa GraphPad Prism: *Two-way ANOVA with Bonferroni's post tests was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com*. Foram considerados significantes os resultados com valor bilateral de  $p < 0,05$ .

### **3.11 Ética em experimentação animal**

Esse estudo foi aprovado para realização pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sob o número 210/07, com certificado apresentado no ANEXO II.

## 4. Resultados

A infecção dos animais foi confirmada *post mortem* por demonstração parasitológica direta pelas análises dos tecidos de baço e fígado corados por HE; pelos esfregaços por aposição corados com GIEMSA; e também por demonstração indireta do parasito pela imunoistoquímica.

Os machos e fêmeas controles positivos (infectados) das caixas que estavam identificadas em cego e que receberam placebo demonstraram ausência de diferença estatística para os parâmetros da imunoistoquímica em relação aos animais infectados e sabidamente não tratados que estava fora da identificação em cego e, portanto, foram unificados. Assim, após esta união, os grupos foram denominados grupo experimental de machos (EM), grupo controle positivo de machos (CM); grupo experimental de fêmeas (EM) e grupo controle positivo de fêmeas (CF).

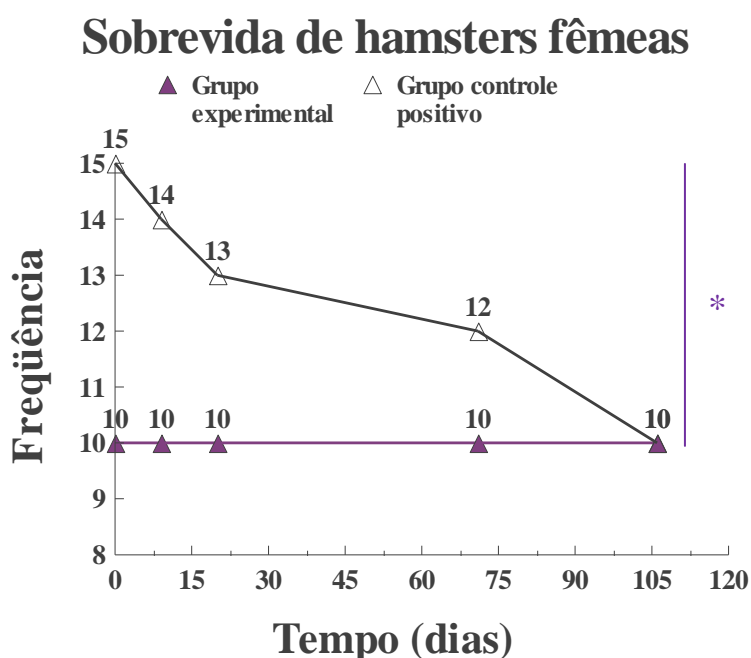
Ao final do experimento 1 (um) animal de cada sexo nos respectivos grupos controles em cego apresentaram-se clinicamente muito diferente dos demais animais. Um deles apresentava infecção purulenta no maxilar e o outro havia perdido a visão, mas ambos apresentavam redução drástica da massa corporal (peso vivo), cerca da metade em relação aos demais animais do grupo. Posteriormente, estes animais apresentaram resultados à imunoistoquímica de baço de 5005 e 3262 amastigotas em 20 campos, estes dados foram considerados discrepantes pois estavam muito fora da faixa em relação aos demais animais do mesmo grupo, portanto foram censurados para todas as análises possíveis, a não ser pelo consumo de ração que foi avaliado de forma coletiva por caixa. Portanto, são apresentados os resultados para 50 (cinquenta) animais, 25 (vinte e cinco) para cada sexo de forma que 10 (dez) para o grupo experimental e 15 (quinze) para o grupo controle positivo.

## 4.1 Clínica

### 4.1.1 Sobrevida

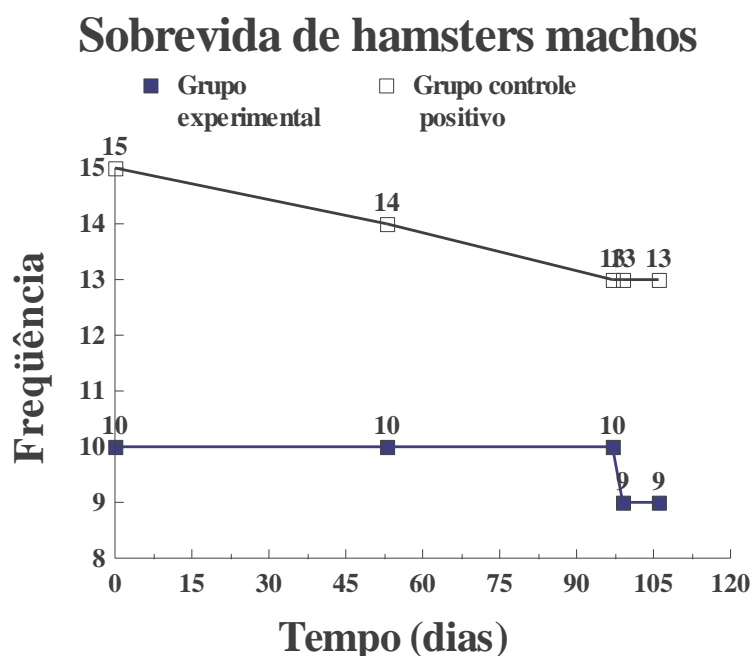
A análise da curva de sobrevida realizada ao Log-Rank Test (método Collett) comparou os eventos de sobrevida ocorridos durante o período avaliado do dia 1º (primeiro) ao 106º (centésimo sexto) dia de observação a partir do primeiro tratamento, na frequência de uma vez ao dia de segunda-feira à sexta-feira. Portanto, os intervalos e frequências de avaliação foram concomitantes e idênticos entre os respectivos grupos experimentais e controles positivos de cada sexo.

Há diferença significativa com valor de  $p < 0,05$  (valor de  $p = 0,04$ ) na sobrevida dos animais submetidos ao tratamento do grupo experimental de fêmeas em relação ao grupo controle positivo de fêmeas.



**Gráfico 1.** Fêmeas: curva de sobrevida entre o grupo experimental e o grupo controle positivo, Log-Rank Test (Collett), \* valor de  $p < 0,05$ .

Para machos há ausência de diferença significativa com  $p > 0,05$  (valor de  $p = 0,76$ ) no tempo de sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento do grupo experimental em relação ao grupo controle positivo.



**Gráfico 2.** Machos: curva de sobrevivência entre o grupo experimental e o grupo controle positivo, Log-Rank Test (Collett), valor de  $p > 0,05$ . A sobrevivência é apresentada com  $n = 13$  animais entretanto existem dados histológicos para  $n = 12$ . Este fato é devido a uma perda entre o dia da finalização da análise da sobrevivência e a coleta de material, por isso há diferença de uma unidade no universo amostral entre estes parâmetros. A autólise do material ao ser encontrado impede seu aproveitamento para as análises histológicas.

#### 4.1.2 Evolução da massa corporal

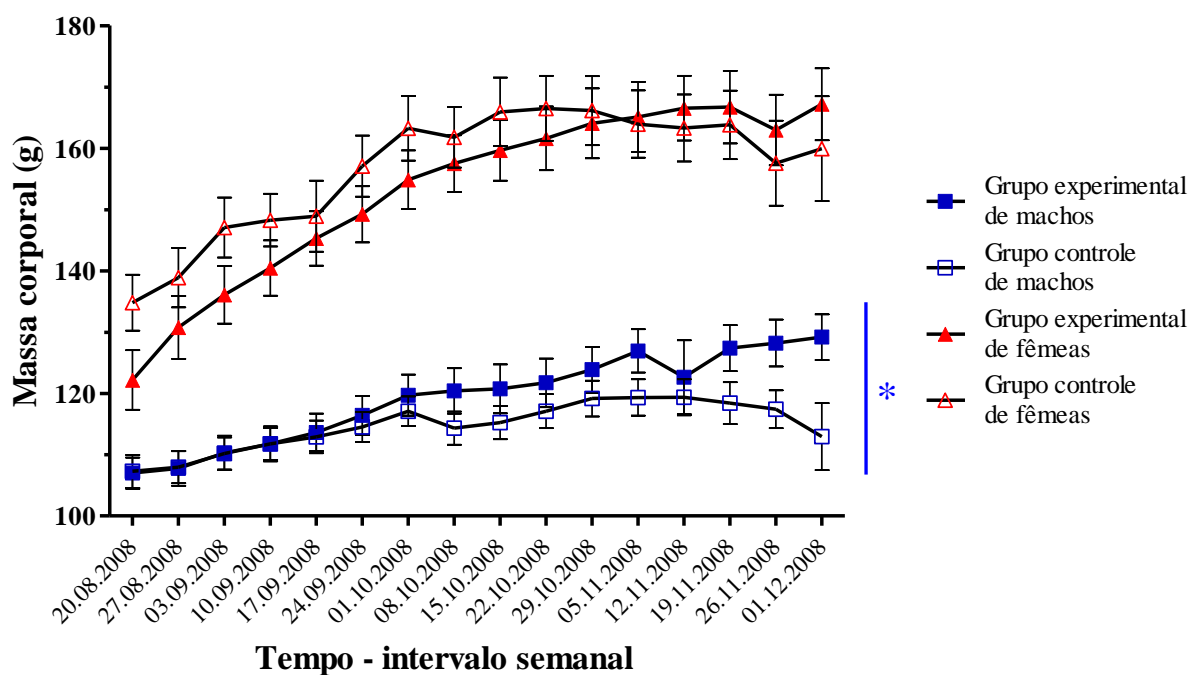
A evolução da massa corporal dos animais foi aferida de forma individual semanalmente, sempre ao mesmo dia da semana no horário médio  $13h30 \pm 2$  h durante o dia. Cada aferição foi realizada em triplicata e considerou-se a média das três aferições como a massa corpórea do animal. A balança digital tinha precisão de uma casa decimal após a grama. Após o teste de Lilliefors, foi realizada as análises de variância (ANOVA) de duas vias, independentes por sexo, que consideraram data,

média e desvio padrão da massa, e o número de eventos para o gráfico 3. Todos os dados são apresentados no mesmo gráfico com a média e o erro-padrão.

Entre o grupo experimental de fêmeas e controle positivo de fêmeas, a ANOVA de duas vias mostrou que o Tratamento não afetou muito os resultados [F 1/333 = 3,43, p = 0,06] mas o Tempo afetou [F 1/333 = 9,65, p < 0001]. Não houve interação entre os fatores [F 1/333 = 0,60, p = 0,87].

Entre o grupo experimental de machos e o grupo controle positivo de machos a ANOVA de duas vias mostrou que o Tratamento afetou os resultados [F 1/356 = 15,02, p = 0001] e o Tempo também [F 1/356 = 5,32, p < 0001]. Não houve interação entre os fatores [F 1/356 = 0,97, p = 0,48].

### Evolução da massa corporal (peso vivo) de hamsters em relação ao tempo



**Gráfico 3.** Evolução ponderal de machos e fêmeas dos grupos com a análise de variância de duas vias. \* p < 0,001, No gráfico são apresentados a média e erro padrão.

**Tabela 2.** Relação da massa média, desvio padrão e n dos animais dos diversos grupos em relação ao tempo.

<i>Tempo (semana)</i>	<i>Peso Machos Experimental*</i>			<i>Peso Machos Controle</i>			<i>Peso Fêmeas Experimental</i>			<i>Peso Fêmeas Controle</i>		
<i>Data dd.mm.aaaa</i>	<i>Média</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>SD</i>	<i>n</i>
20.08.2008	107,00	8,05	10	107,27	10,43	15	122,17	15,39	10	134,80	17,72	15
27.08.2008	107,78	9,01	10	107,94	10,15	15	130,76	16,20	10	138,87	18,77	15
03.09.2008	110,28	8,92	10	110,19	10,12	15	136,08	14,94	10	147,07	18,33	14
10.09.2008	111,76	9,00	10	111,76	10,16	15	140,44	14,30	10	148,26	15,55	13
17.09.2008	113,63	9,70	10	112,92	10,32	15	145,28	14,06	10	148,92	20,89	14
24.09.2008	116,39	9,99	10	114,51	9,49	15	149,23	14,51	10	157,08	18,01	13
01.10.2008	119,71	10,54	10	117,10	9,37	15	154,87	15,09	10	163,25	19,04	13
08.10.2008	120,40	11,72	10	114,33	10,43	15	157,49	14,70	10	161,79	17,80	13
15.10.2008	120,72	12,60	10	115,24	10,10	14	159,66	15,63	10	165,92	20,10	13
22.10.2008	121,71	12,54	10	117,10	10,47	14	161,61	16,47	10	166,50	19,10	13
29.10.2008	123,86	11,78	10	119,16	10,89	14	164,05	18,04	10	166,14	19,48	12
05.11.2008	126,92	11,21	10	119,33	11,19	14	165,10	18,04	10	163,93	19,05	12
12.11.2008	122,63	19,10	10	119,35	10,99	14	166,52	16,71	10	163,30	18,96	12
19.11.2008	127,39	11,90	10	118,41	12,73	14	166,70	18,68	10	163,80	19,39	12
26.11.2008	128,21	11,42	9	117,41	11,13	13	162,99	18,16	10	157,57	24,01	12
01.12.2008	129,18	11,20	9	112,96	19,69	13	167,18	18,58	10	159,95	27,05	10

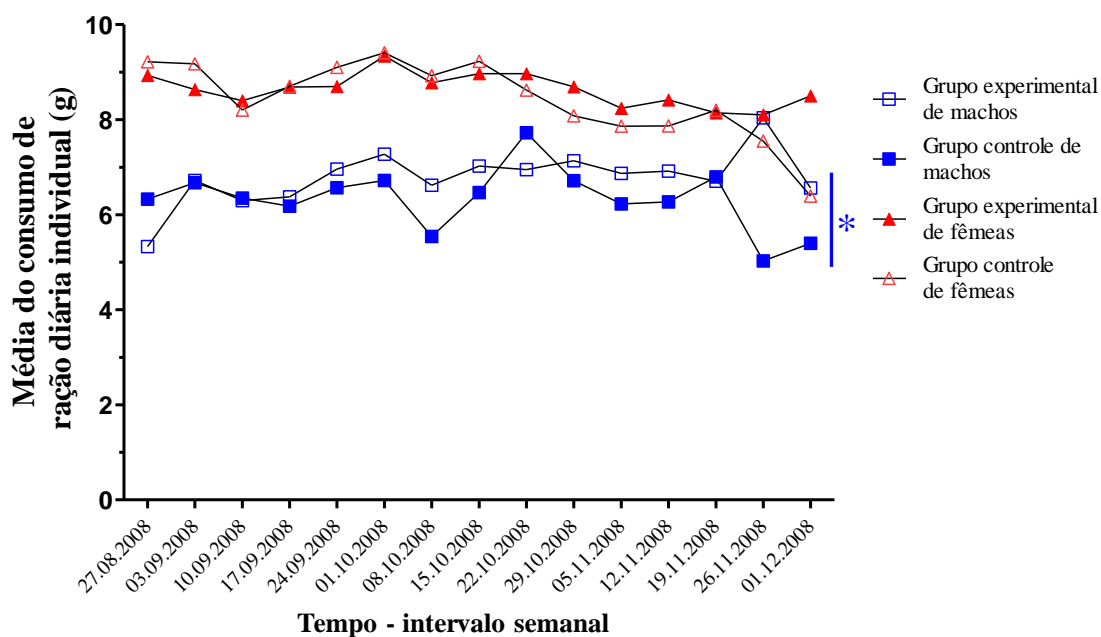
\* valor e  $p < 0,05$ . *SD* = desvio-padrão; *n* = universo amostral. A evolução da massa corporal (peso vivo) é apresentada com  $n = 13$  animais, entretanto existem dados histológicos para  $n = 12$ . Este fato é devido a uma perda entre o dia da finalização da análise da evolução da massa corporal e o dia da eutanásia para coleta de material, por isso há diferença de uma unidade no universo amostral entre estes parâmetros

### 4.1.3 Consumo de ração

O consumo de ração foi aferido de forma coletiva em cada uma das dez gaiolas utilizadas e ajustado para o consumo individual pela média simples da massa (g) da ração restante, subtraída da massa da ração total ofertada anteriormente, em seguida dividido pelo número de animais que consumiram a ração por dia. A aferição ocorreu a cada 7 (sete) dias, sempre ao mesmo dia da semana e durante o dia, em horário médio  $13h30 \pm 2$  h. A balança digital possuía precisão de uma casa decimal após a grama.

Após o teste de normalidade de Lilliefors, houve diferença significativa ao teste de Mann-Whitney para a massa do consumo de ração (g) entre os grupos experimental de machos e controle positivo de machos (valor de  $p < 0,05$ , valor de  $p = 0,01$ ), e ausência de diferença para os grupos experimental de fêmeas e controle positivo de fêmeas (valor de  $p > 0,05$ , valor de  $p = 0,66$ ). O consumo aparente é maior para fêmeas e coincide com o fato deste sexo apresentar massa corpórea altamente significante maior em relação aos machos.

### Evolução ponderal do consumo de ração diária individual por animal durante o tempo



**Gráfico 4.** Evolução ponderal do consumo de ração diária individual ajustada por animal para os grupos durante o tempo. \* valor de  $p < 0,05$  entre o grupo experimental de machos e o grupo controle positivo de machos.

**Tabela 3.** A média do consumo de ração individual diário nos diversos grupos em relação ao tempo.

<i>Tempo (data dd.mm.aaaa)</i>	<i>Experimental de machos*</i>	<i>Controle positivo de machos</i>	<i>Experimental de Fêmeas</i>	<i>Controle positivo de fêmeas</i>
27.08.2008	5,3	6,3	8,9	9,2
03.09.2008	6,7	6,7	8,6	9,2
10.09.2008	6,3	6,3	8,4	8,2
17.09.2008	6,4	6,2	8,7	8,7
24.09.2008	7,0	6,6	8,7	9,1
01.10.2008	7,3	6,7	9,3	9,4
08.10.2008	6,6	5,5	8,8	8,9
15.10.2008	7,0	6,5	9,0	9,2
22.10.2008	7,0	7,7	9,0	8,6
29.10.2008	7,1	6,7	8,7	8,1
05.11.2008	6,9	6,2	8,2	7,9
12.11.2008	6,9	6,3	8,4	7,9
19.11.2008	6,7	6,8	8,1	8,2
26.11.2008	8,0	5,0	8,1	7,6
01.12.2008	6,6	5,4	8,5	6,4
<i>Média</i>	6,8	6,3	8,3	8,4

\* Valor de  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Aspectos clínicos

Houve diferença significativa ao teste exato de Fisher com valor de  $p < 0,05$  (valor de  $p = 0,02$ ) para a presença de alopecia entre os grupos experimental de fêmeas e controle de fêmeas. Houve ausência de diferença estatística significativa (valor de  $p > 0,05$ ) para os parâmetros a astenia, espelomegalia, hepatomegalia, ascite, caquexia, desidratação e diminuição das atividades ao teste exato de Fisher.



**Tabela 4.** Resultados das avaliações clínicas.

<i>Parâmetros clínicos</i>	<i>Sobrevida</i>	<i>Astenia</i>	<i>Esplenomegalia</i>	<i>Hepatomegalia</i>	<i>Alopecia</i>	<i>Ascite</i>	<i>Perda de peso: caquexia</i>	<i>Desidratação</i>	<i>Diminuição das atividades</i>
<i>Grupo experimental de machos</i>	9 de 10	0 de 9	1 de 9	0 de 9	4 de 9	0 de 9	0 de 9	0 de 9	0 de 9
<i>Grupo controle positivo de machos</i>	13 de 15	0 de 12	0 de 12	0 de 12	3 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12	0 de 12
<i>Grupo experimental de fêmeas</i>	10 de 10*	0 de 10	3 de 10	0 de 10	2 de 10*	1 de 10	0 de 10	0 de 10	0 de 10
<i>Grupo controle positivo de fêmeas</i>	10 de 15	0 de 10	0 de 10	0 de 10	8 de 10	0 de 10	1 de 10	0 de 10	0 de 10

\* Valor de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas de forma independente por sexo e as informações são condensadas na mesma tabela. A sobrevivida é apresentada com  $n = 13$  animais, entretanto existem dados histológicos para  $n = 12$ . Este fato é devido a uma perda entre o dia da finalização da análise da sobrevivida e a coleta de material, por isso há diferença de uma unidade no universo amostral entre estes parâmetros.

## **4.2 Baço**

### **4.2.1 Análise morfométrica do parasitismo tecidual**

Procedeu-se com a análise não paramétrica após o teste de normalidade de Lilliefors. O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de diferença estatística significativa com valor de  $p$  (valor de  $p = 0,05$ ), portanto há tendência para diferença na quantidade de amastigotas imunomarcadas identificadas à morfometria entre o grupo experimental de machos e o grupo controle positivo de machos.

O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de diferença estatística significativa com valor de  $p$  entre 0,05 e 0,10 (valor de  $p = 0,07$ ), portanto não há diferença na quantidade de amastigotas imunomarcadas identificadas à morfometria entre o grupo experimental de fêmeas e o grupo controle positivo de fêmeas.

### **4.2.2 Índice de LDU para baço e índice esplênico**

Procedeu-se com a análise não paramétrica após o teste de normalidade de Lilliefors. O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de diferença estatística significativa com valor de  $p > 0,05$  (valor de  $p = 0,12$ ), portanto não há diferença para o índice de LDU para baço entre o grupo experimental de machos tratados com medicação e o grupo controle positivo de machos.

O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de diferença estatística significativa com valor de  $p > 0,05$  (valor de  $p = 0,91$ ), ao índice de LDU de baço entre o grupo experimental de fêmeas tratadas e o grupo controle positivo de fêmeas.

Procedeu-se com a análise paramétrica após o teste de normalidade de Lilliefors. Houve diferença significativa ao teste  $t$  com valor de  $p < 0,05$  (valor de  $p = 0,02$ ) para a massa do baço a fresco entre o grupo experimental de machos e controle de machos, a média da massa do grupo tratado foi superior ao do grupo controle positivo. Houve

diferença significativa ao teste t com valor de  $p < 0,05$  (valor de  $p = 0,03$ ) para a massa dos machos à eutanásia, o grupo experimental deve média superior ao grupo controle positivo. Houve ausência de diferença significante com valor de  $p > 0,05$  (valor de  $p = 0,13$ ) para o peso do baço a fresco entre o grupo experimental de fêmeas e controle positivo de fêmeas, assim como para a massa do animal à eutanásia, valor de  $p > 0,05$  (valor de  $p = 0,49$ ).

#### **4.2.3 Histopatologia - Interpretação histopatológica dos achados**

Para o parâmetro parasitismo no baço ao teste de Mann-Whitney foi encontrada ausência de significância com valor de  $p$  entre 0,05 e 0,10 (valor de  $p = 0,08$ ) entre os grupos experimental de machos e controle de machos. Para o parâmetro depleção no baço foi encontrada ausência de significância com valor de  $p$  entre 0,05 e 0,10 (valor de  $p = 0,08$ ) entre os grupos experimental de fêmeas e controle de fêmeas. Houve ausência de diferenças significativas (valor de  $p > 0,05$ ) para as alterações histológicas presença de granulomas, reatividade da polpa branca, polpa vermelha (hipertrofia e hiperplasia), observadas entre os grupos de mesmo sexo.

As lesões fundamentais encontradas foram:

(1) Depleção linfocitária da bainha periarteriolar da polpa branca. De fato, observou-se com freqüência a substituição de linfócitos da bainha periarteriolar (área T-dependente) por macrófagos vacuolizados e não raro com presença de formas amastigotas de *Leishmania*;

(2) Hiperplasia e hipertrofia dos macrófagos da polpa vermelha. Era notória a população dessas células sempre apresentando citoplasma abundante e cromatina frouxa. Muitos apresentavam ainda morfologia de célula epitelíode caracterizada por citoplasma amplo, hipocorado, cromatina frouxa e núcleo alongado;

(3) Formação de estruturas nodulares constituídas por macrófagos de formato epitelíode denominadas “granulomas”. Muitas vezes esses macrófagos eram parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* (Figura 3 - imagens A, B, C e D).

**Tabela 5.** Resumo das observações histopatológicas no baço de hamsters infectados por *Leishmania chagasi* nos diferentes grupos.

Baço	Imunoistoquímica de baço (mediana, máximo e mínimo)	Índice LDU de baço (mediana, máximo e mínimo)	Índice esplênico (mediana, máximo e mínimo)	Peso do baço (média ± desvio-padrão)	Parasitismo	Granulomas	Depleção	Reatividade da polpa branca	Polpa vermelha (hipertrofia e hiperplasia)
Grupo experimental de machos	421 (89-1.025)*	15,6 (1,7-145,5)	0,41 (0,25-0,60)	0,53±0,15*	"+" n=2; "++" n=5; "+++" n=2; em 9	"+" n=3; "++" n=4; "+++" n=2; em 9	9 de 9	0 de 9	"+" n=0; "++" n=7; "+++" n=2; em 9
Grupo controle positivo de machos	151 (49-1.147)	6,1 (0,0-132,5)	0,32 (0,23-0,50)	0,39±0,10	"+" n=8; "++" n=2; "+++" n=3; em 12	"+" n=5; "++" n=6; "+++" n=1; em 12	11 de 12	0 de 12	"+" n=0; "++" n=11; "+++" n=1; em 12
Grupo experimental de fêmeas	145 (26-509)	0,9 (0,0-317,3)	0,81 (0,18-1,25)	1,26±0,51	"+" n=3; "++" n=6; "+++" n=1; em 10	"+" n=3; "++" n=2; "+++" n=3; em 10	9 de 10	0 de 10	"+" n=1; "++" n=4; "+++" n=5; em 10
Grupo controle positivo de fêmeas	28 (6-569)	0,3 (0,0-117,2)	0,65 (0,11-1,03)	0,94±0,39	"+" n=6; "++" n=2; "+++" n=1; em 10	"+" n=1; "++" n=4; "+++" n=5; em 10	5 de 10	0 de 10	"+" n=1; "++" n=3; "+++" n=6; em 10

\* valor de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas de forma independente por sexo e as informações são condensadas nesta tabela. Os parâmetros "+"; "++"; "+++" apresentam ao lado do "n =" a indicação do número de animais que se enquadraram em cada faixa, seguido ao final do número total de animais avaliados no grupo.

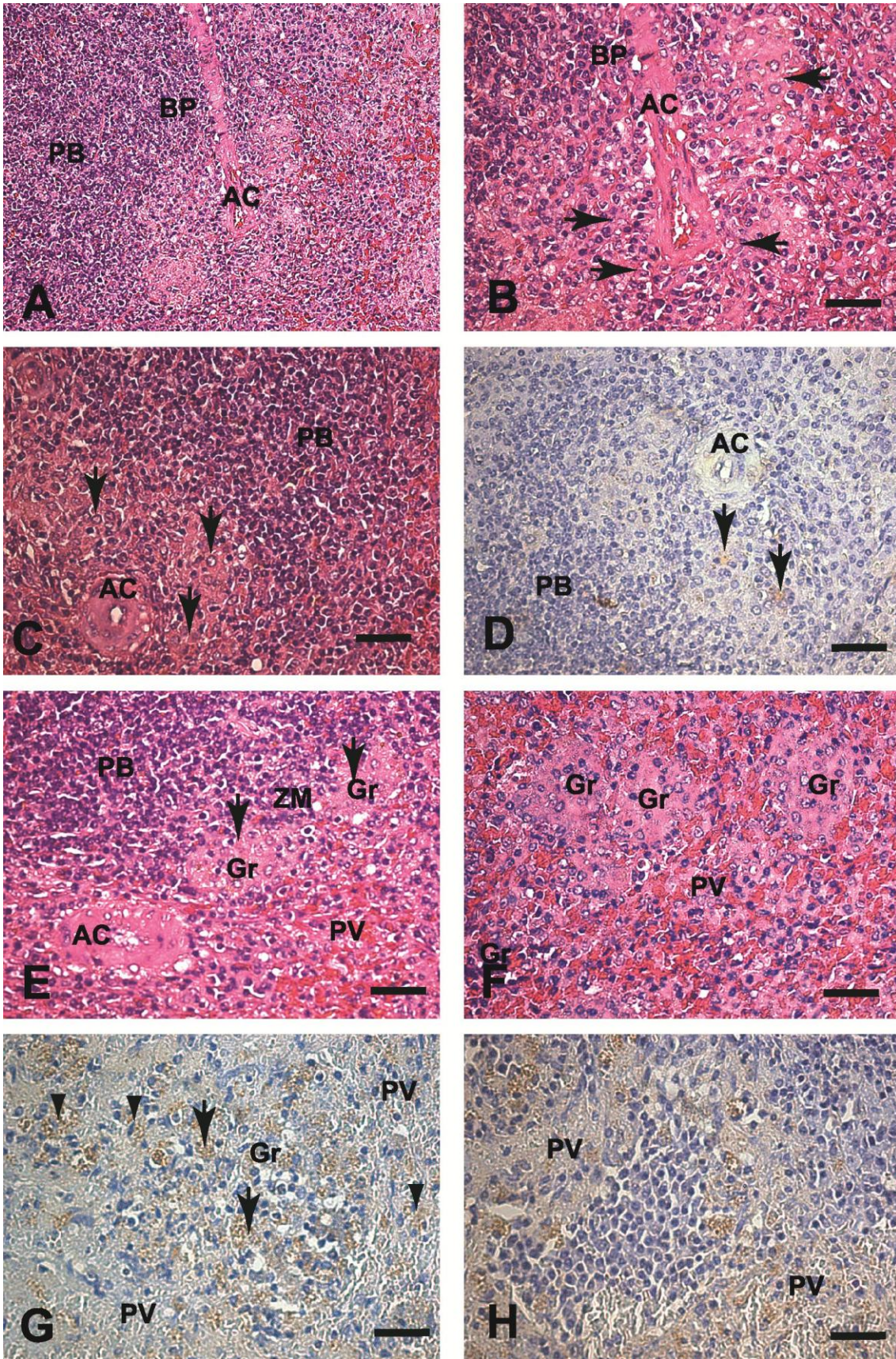


Figura 3 - imagens A, B, C, D, E, F, G e H

**Figura 3 - imagens A, B, C, D, E, F, G e H.** Cortes histológicos parafinados de baço de hamsters (grupo controle) infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. (A) Microfotografia mostrando parênquima esplênico evidenciando a polpa branca caracterizada pela presença da arteríola central (corte longitudinal). HE. Barra = 32 $\mu$ m; (B) Em aumento maior observar a substituição de linfócitos da bainha periarteriolar por células de núcleos grandes e claros de cromatina frouxa (setas). HE. Barra = 16  $\mu$ m; AC (Arteriola Central); BP (Bainha Periarteriolar); PB (Polpa Branca) ; (C) Observar polpa branca (PB) sem formação de centro germinativo e depleção de linfócitos próximos a arteriola central (AC) (setas) HE. Barra = 16  $\mu$ m; (D) Presença de formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas na área de depleção linfocitária (setas). Estreptoavidina peroxidase. HE. Barra = 16  $\mu$ m. (E) Formação de granulomas (Gr) na Zona Marginal (ZM) esplênica (setas). HE. Barra = 16  $\mu$ m. PV (Polpa Vermelha); (F) Formação de três granulomas na polpa vermelha esplênica (PV) HE. Barra = 16  $\mu$ m; (G) Presença de inúmeras formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas no interior de macrófagos constituintes de um granuloma ao centro (setas) e no interior de outros macrófagos da Polpa Vermelha (PV) (cabeças de setas). Estreptoavidina peroxidase Barra = 16  $\mu$ m; (H) Ao centro da foto observar grande número de plasmócitos localizados na polpa vermelha (PV) esplênica caracterizando uma plasmocitose. Formas imunomarcadas de amastigotas de *Leishmania* podem ser visualizadas. Estreptoavidina peroxidase. Barra = 16  $\mu$ m;

### **4.3 Fígado**

#### **4.3.1 Parasitismo tecidual (Carga Parasitária) - Análise Morfométrica**

Procedeu-se com a análise não paramétrica após o teste de normalidade de Lilliefors. O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de significância estatística, valor de  $p > 0,05$  (valor de  $p = 0,32$ ), portanto não há diferença na quantidade de amastigotas imunomarcadas identificadas à morfometria entre o grupo experimental de machos e o grupo controle positivo.

O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de significância estatística, valor de  $p > 0,05$  (valor de  $p = 0,57$ ), portanto não há diferença na quantidade de amastigotas imunomarcadas identificadas à morfometria entre o grupo experimental de fêmeas tratadas com medicação e o grupo controle positivo.

#### **4.2.2 Índice de LDU de fígado e índice hepático**

Após o teste de normalidade de Lilliefors procedeu-se com a análise não paramétrica. O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de significância estatística, valor de  $p < 0,05$  (valor de  $p = 0,67$ ), portanto não há diferença ao Índice de LDU de fígado entre o grupo experimental de machos tratados com medicação e o grupo controle positivo.

O Teste de Mann-Whitney demonstrou ausência de significância estatística, valor de  $p < 0,05$  (valor de  $p = 0,96$ ), portanto não há diferença ao Índice de LDU de fígado entre o grupo experimental de fêmeas tratadas com medicação e o grupo controle positivo. Houve ausência de diferença estatística significativa (valor de  $p > 0,05$ ) para o peso do fígado ao Mann-Whitney; a relação do peso baço:fígado também não apresentou diferença.

Para o índice hepático ao teste de Mann-Whitney foi encontrado ausência de diferença significativa com valor de p entre 0,05 e 0,10 (valor de p = 0,07) entre o grupo experimental de fêmea e controle positivo de fêmea; e ausência de significância com valor de p > 0,05 (valor de p = 0,78) entre o grupo experimental de macho e o grupo controle positivo de macho.

#### 4.3.3 Histopatologia - Interpretação histopatológica dos achados

Em geral todos os cortes histológicos de fígado de todos os animais, independentemente dos diferentes grupos experimentais, apresentaram as seguintes lesões: Inflamação crônica portal, variando de discreta a intensa, caracterizada por infiltrado celular predominantemente constituído por células mononucleares sendo macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Os macrófagos, por sua vez, na grande maioria dos casos, apresentavam citoplasma abundante, hipocorado e núcleo alongado e cromatina frouxa caracterizando morfologicamente macrófagos epitelióides. Não raro, formas amastigotas de *Leishmania* puderam ser encontradas no interior dos macrófagos. Polimorofucleares neutrófilos foram observados de permeio, mas nunca predominavam no infiltrado inflamatório portal. Todavia, esse infiltrado de mononucleares, em alguns casos, formava estruturas nodulares com presença das células epitelióides conferindo, então, inflamação granulomatosa no espaço portal (Figura 4 – imagens A, B, C e D);

(1) Formação de granulomas intralobulares hepáticos compostos por macrófagos, plasmócitos, linfócitos e raros neutrófilos. Esses granulomas eram de tamanhos e formas variáveis, com ou sem células (macrófagos) contendo formas amastigotas de *Leishmania* no seu citoplasma. Fato importante foi a alta frequência da presença de macrófagos epitelióides como células constituintes desses granulomas (Figura 4 – imagens E e F).

(2) Presença de grande número de plasmócitos, as vezes, predominava no infiltrado de mononucleares conferindo uma plasmocitose (Figura 4 – imagem G);



(3) Alterações regressivas como degeneração hidrópica e esteatose foram observadas, mas a primeira sempre mais freqüente que a segunda. A degeneração hidrópica foi diagnosticada morfológicamente onde os hepatócitos encontravam-se aumentados de volume e citoplasma de aspecto granuloso e hipocorado, comprimindo os sinusoides, esses sempre exangues em áreas intensamente degeneradas. A congestão, por sua vez, podia ser observada pelo aspecto vacuolado dos hepatócitos e também sempre aumentados de volume. Na preparação de nosso estudo, Hematoxilina-Eosina, esses vacúolos são interpretados como imagem negativa da gordura (Figura 4 – imagem H),

(4) A congestão dos vasos e espaço porta foi um achado freqüente. De fato, em geral, os vasos portais eram calibrosos e dilatados e com a luz repleta de hemácias e em alguns casos com aspecto homogêneo, como uma grande massa eosinofílica. Os sinusóides e as veias centro-lobulares também apresentavam quadro semelhante. Todavia, em nenhum dos casos houve observação de deposição de pigmentos derivados da hemoglobina, principalmente hemossiderina, muitas vezes correlacionada aos quadros de congestão.

Nesse estudo é importante relatar três casos que chamaram atenção por apresentarem patologias marcantes e que fugiram das alterações histológicas descritas anteriormente. Dois casos foram em machos, um do grupo controle e outro do grupo experimental, que apresentaram lesões granulomatosas nos espaço-porta e no lóbulo, mas os granulomas eram constituídos em sua maioria por células gigantes. Nos outros animais isso não foi observado com tamanha freqüência como observado nesses dois animais. Além disso, as células gigantes, em sua maioria do tipo Langhans (Figura 5 – imagens A, B, C e D), continham no seu interior uma substância de aspecto eosinofílico, amorfo e refringente e em alguns casos apresentava-se de aspecto lamelar como drusas de uma cebola (Figura 5 - imagem D: fêmea do grupo controle). Outro animal, também do grupo controle positivo de machos, apresentou quadro de fibrose. Histologicamente observou-se intensa deposição colagênica nos espaço-porta e na cápsula promovendo espessamento de ambas as estruturas.

**Tabela 6.** Resumo das observações histopatológicas no fígado de hamsters infectados por *Leishmania chagasi* nos diferentes grupos.

Fígado	Imunoistoquímica de fígado (mediana, máximo e mínimo)	Índice LDU de fígado (mediana, máximo e mínimo)	Índice Hepático (mediana, máximo e mínimo)	Peso do fígado (média ± desvio-padrão)	Parasitismo	Hipertrofia e hiperplasia macrófago	Granuloma intralobular	Inflamação do espaço porta	Esteatose
Grupo experimental de machos	89 (55-726)	70,7 (8,8-341,9)	5,43 (4,27-6,29)	7,11±1,05	"+" n=5; "++" n=1; "+++" n=3; em 9	"+" n=1; "++" n=4; "+++" n=4; em 9	"+" n=0; "++" n=3; "+++" n=6; em 9 *	"+" n=1; "++" n=3; "+++" n=5; em 9	0 de 9
Grupo controle positivo de machos	94 (4-801)	62,9 (1,9-1.634,5)	5,42 (4,26-7,08)	6,57±0,70	"+" n=8; "++" n=2; "+++" n=2; em 12	"+" n=4; "++" n=7; "+++" n=1; em 12	"+" n=4; "++" n=5; "+++" n=3; em 12	"+" n=3; "++" n=6; "+++" n=3; em 12	1 de 12
Grupo experimental de fêmeas	48 (4-120)	18,7 (0,0-456,3)	5,47 (3,43-6,16)	8,97±1,66	"+" n=10; "++" n=0; "+++" n=0; em 10	"+" n=5; "++" n=4; "+++" n=1; em 10	"+" n=4; "++" n=4; "+++" n=2; em 10	"+" n=2; "++" n=6; "+++" n=2; em 10	0 de 10
Grupo controle positivo de fêmeas	40 (1-92)	42,7 (0,0-610,3)	6,27 (4,71-9,42)	8,49±1,81	"+" n=8; "++" n=1; "+++" n=0; em 9	"+" n=3; "++" n=5; "+++" n=1; em 9	"+" n=2; "++" n=6; "+++" n=1; em 9	"+" n=5; "++" n=2; "+++" n=2; em 9	1 de 9

\* valor de  $p < 0,05$  ao teste exato de Fisher para a presença de granulomas intralobulares. Os parâmetros "+"; "++"; "+++" apresentam ao lado do "n =" a indicação do número de animais que se enquadraram em cada faixa, seguido ao final do número total de animais avaliados no grupo.

Houve diferença significativa para avaliação a presença de granulomas intralobulares entre o grupo experimental de machos e controle positivo de machos ao teste de Mann-Whitney, valor de  $p < 0,05$  (valor de  $p = 0,04$ ). Há subtração de 1 (um) ao número de animais do grupo controle positivo de fêmeas devido a alteração na coleta do fígado de um animal.

Para a presença de hipertrofia e hiperplasia (macrófagos-células de Kupffer) ao teste de Mann-Whitney foi encontrado ausência de significância com valor de  $p$  entre 0,05 e 0,10 (valor de  $p = 0,09$ ) entre o grupo experimental de machos e controle de machos.

Foi observada ausência de diferença significativa (valor de  $p > 0,05$ ) para os parâmetros parasitismo, hipertrofia e hiperplasia (macrófagos - células de Kupffer) para fêmeas, granulomas intralobulares para fêmeas, inflamação do espaço porta e esteatose avaliados no fígado ao teste de Fisher.

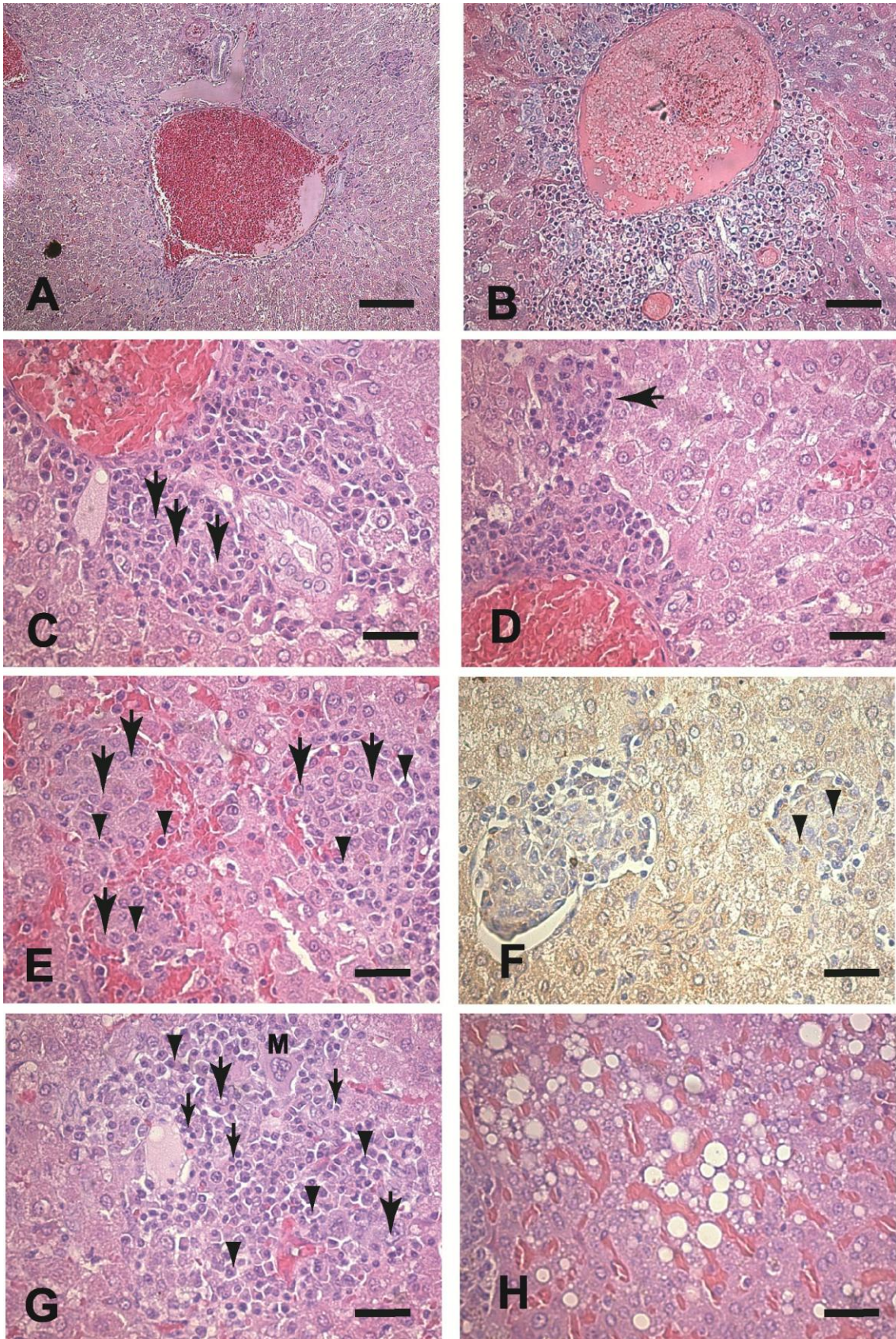
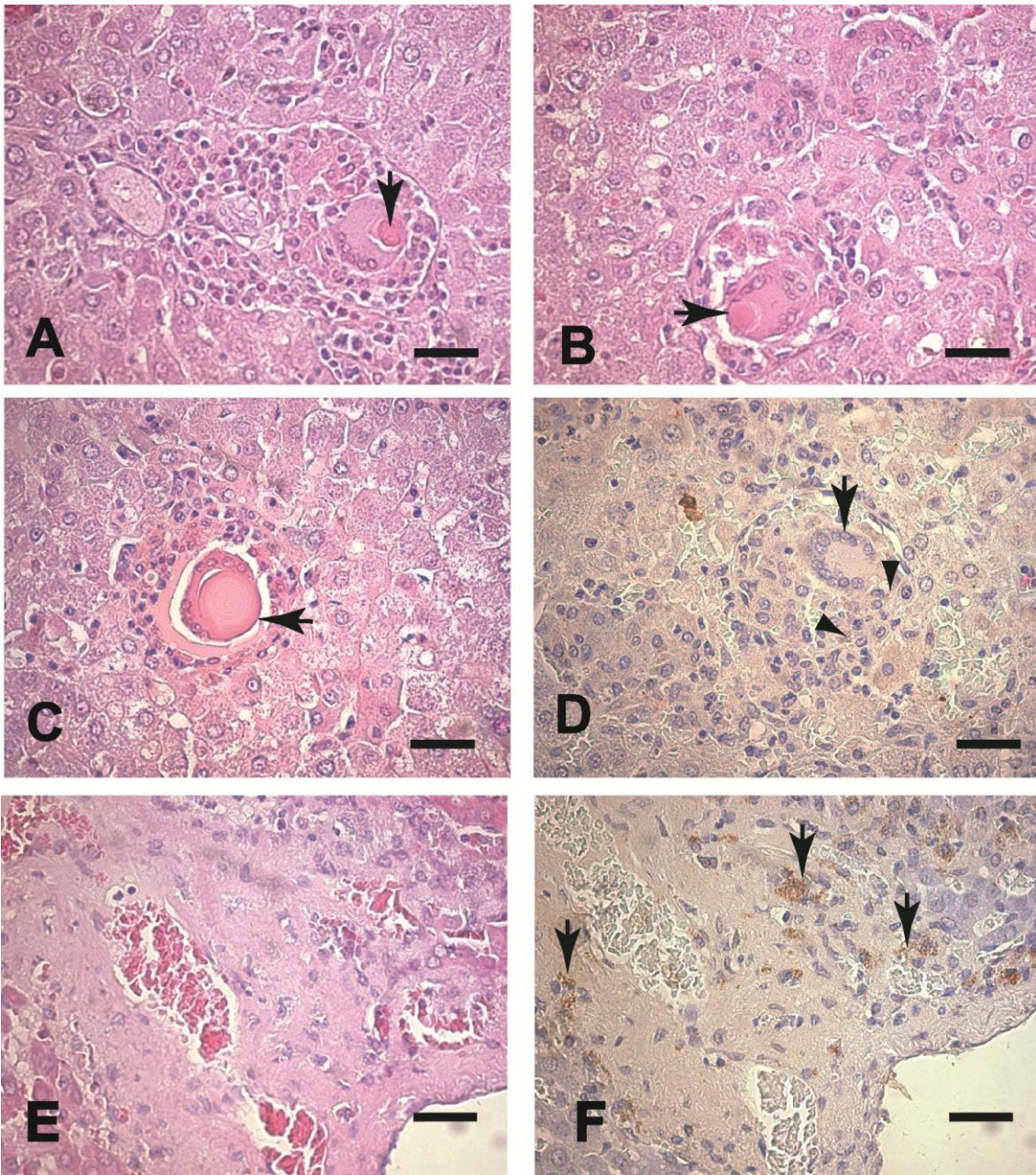


Figura 4 – imagens A, B, C, D, E, F, G e H

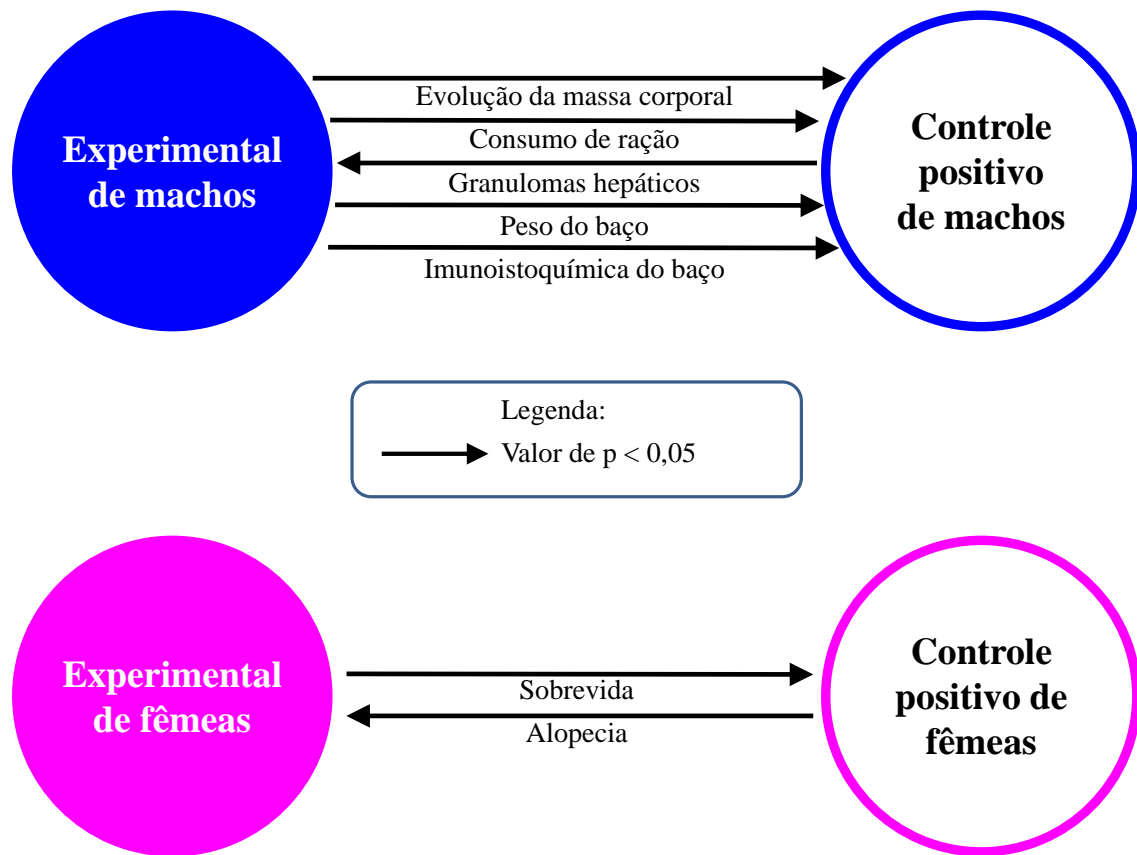
**Figura 4 – imagens A, B, C, D, E, F, G e H.** Cortes histológicos parafinados de fígado de hamsters (grupo controle) infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. (A) Microfotografia panorâmica mostrando espaço-porta com discreto infiltrado inflamatório. HE. Barra = 62 $\mu$ m; (B) Microfotografia mostrando espaço-porta com intenso infiltrado inflamatório HE. Barra = 32  $\mu$ m e em (C), em maior aumento, notar que o infiltrado forma um granuloma com presença de células epitelióides HE. Barra = 16  $\mu$ m (setas); (D) Observar a formação de um granuloma no lóbulo hepático (granuloma intralobular hepático) (seta) próximo ao espaço-porta; HE. Barra = 16  $\mu$ m; (E) Detalhe das células que compõe os granulomas intralobulares constituídos principalmente por macrófagos epitelióides (setas) e linfócitos (cabeça de setas) HE= 16  $\mu$ m; (F) Presença de formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas no granuloma intralobular a direita (cabeças de seta). Estreptoavidina peroxidase. HE. Barra = 16  $\mu$ m; (G) Infiltrado inflamatório de células mononucleares localizado no interior do lóbulo hepático. Notar o grande número de plasmócitos (cabeças de seta) seguido de pequenos linfócitos (pequenas setas) e macrófagos (grandes setas). Presença de um megacariócito (M) adjacente ao infiltrado inflamatório. HE. Barra = 16  $\mu$ m; (H) Ao centro da foto notar a presença de hepatócitos aumentados de volume e citoplasma de vacuolizado indicando esteatose. Barra = 16  $\mu$ m.



**Figura 5 – imagens A, B, C, D, E e F.**

**Figura 5 – imagens A, B, C, D, E e F.** Cortes histológicos parafinados de fígado de hamsters (grupo controle) infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. (A) Observar a formação de granuloma no espaço porta com presença de célula gigante contendo no seu citoplasma material hialino em destaque (seta). HE. Barra = 16  $\mu$ m. (B) e (C) Formação de granuloma intralobular hepático com presença de célula gigante contendo no seu interior material hialino em destaque (seta). HE. Barra = 16  $\mu$ m; (D) Presença de algumas formas amastigotas imunomarcadas de *Leishmania* no interior de macrófagos do granuloma (setas). Notar a célula gigante do tipo Langhans (seta). Estreptoavidina peroxidase. HE. Barra = 16  $\mu$ m.

#### 4.4 Sumário dos resultados



**Figura 6.** Diagrama dos resultados e sua relação de significância entre os grupos experimental e controle positivo para os respectivos sexos ao valor de  $p < 0,05$ . A origem da seta indica que o grupo apresenta maior valor para o parâmetro indicado do que o grupo representado na extremidade de destino.



# 5. *Discussão*

No presente trabalho, foi escolhido o hamster como modelo por apresentar um perfil de evolução progressiva e fatal da leishmaniose visceral de forma semelhante ao acometimento em humanos (ADLER; THEODOR, 1931; RIÇA-CAPELLA et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A espécie também é recomendada para estudos histopatológicos. Outros roedores, também são considerados modelos primários para testes da doença (GARD; DUBE, 2006), mas, a utilização do modelo murino para o estudo da *Leishmania chagasi* poderia causar um viés já que, apesar do parasito replicar-se precocemente, é seguido de controle imunológico e infecção subclínica (MELBY et al., 2001).

A distribuição de gaiolas alternada na prateleira para equilibrar efeito de altura das prateleiras por eventual concentração de gases tipo amônia. Como a administração foi diretamente via oral em gotas para os animais não houve a utilização de medicamento no bebedouro. Portanto, também não houve necessidade de procedimentos especiais como aquecimento em estufa a 60°C, autoclavar ou isolar recipientes para evitar contaminação cruzada na água dos bebedouros. Durante todo o período experimental cada grupo de animais por gaiola alternou exclusivamente entre a utilização de 2 (duas) caixas identificadas pois as lavagens de caixas eram manuais com água fria. Se a urina dos animais puder carrear informações medicamentosas de forma parcial ou integral, este procedimento preveniu esta forma de contaminação cruzada informacional entre os grupos.

O maior número de animais do grupo controle positivo para este tipo de estudo em relação ao grupo experimental foi adequado porque com o tratamento placebo ou nenhum tratamento são esperadas perdas decorrentes da infecção experimental que podem interferir na viabilidade das análises estatísticas ao final da evolução. Desta forma preservou-se o número final de animais sobreviventes para comparações dos diversos parâmetros, mas, este fato ameniza a diferença entre os grupos, pois não considera a gravidade dos animais que foram perdidos. Esse parece ser um problema

difícil de resolver sem aumentar o número de animais pois, a princípio é difícil prever a ocorrência do evento. Entretanto, a massa do animal pareceu reduzir-se levemente na semana que precedeu sua perda, mas, com uma frequência na avaliação do peso maior que uma vez por semana, ou seja, duas a três vezes por semana talvez seja possível prever a proximidade deste fato qualitativamente importante da sobrevivência e assim conseguir coletar as amostras dos animais para o delineamento que avalia a infecção experimental com análise única de parâmetros ao final do período experimental.

O modelo biomédico tem apresentado notório aumento progressivo de efeitos colaterais e mortalidade devido à toxicidade das drogas (MONTEIRO; IRIAT, 2007; RIBEIRO et al., 2008) sendo que a prescrição de medicamentos homeopáticos tem como um dos objetivos mais relevantes a redução dos efeitos tóxicos nos pacientes (WHO, 1999; EUROPEAN COMMITTEE FOR HOMEOPATHY, 2004). Foi eleita uma modalidade terapêutica com medicações homeopáticas para este estudo piloto como uma avaliação *solo*, isto é, sem associações com os medicamentos tradicionalmente conhecidos e utilizados em tratamentos desta doença. Entretanto, futuros trabalhos podem estudar associações aos protocolos médicos já utilizados (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; OLLIARO; GUERIN, 2005; SUNDAR; CHATTERJEE, 2006).

O protocolo terapêutico Fatores de Auto-organização utiliza medicações com denominação e farmacopeia que se aderem aos princípios para medicamentos homeopáticos. Sua utilização adequada é capaz de produzir os fenômenos observados como descrito nas Leis de Cura de Hering, a característica mais nobre apresentada nos pilares da homeopatia. Os medicamentos foram eleitos para a elaboração deste protocolo através do método artístico de repertorização. O uso do repertório e a Lei da Similitude demonstraram, *a posteriori*, confirmação da relação das medicações utilizadas que foram inspiradas na química antiga e os centros consensuais de consciência. Posteriormente se descobriu que a metodologia também funcionava para animais e para vegetais. Estes fatos caracterizam qualitativamente o método com afinidade extremamente suficiente para compor a miríade de terapêuticas contempladas com a denominação homeopatia.

O antimônio é um conhecido medicamento não-ultradiluído utilizado no tratamento para leishmaniose. As discussões individualizadas sobre o efeito de cada um dos

componentes do protocolo se afastam do contexto da utilização do conjunto destes medicamentos devido ao seu histórico de desenvolvimento. Entretanto, este fato pode ser assunto de futuros estudos com componentes individuais, entretanto, a tônica desta terapêutica é a utilização rigorosa dos 7 (sete) medicamentos na sequência de 25 (vinte e cinco) administrações. Posteriormente a esta pesquisa, cada sequência dos 25 (vinte e cinco) medicamentos foi apresentada para uso de forma complexada para um simples frasco. Esta facilidade simplifica sua utilização tanto em delineamentos experimentais quanto terapêuticos para os pesquisadores, prescritores e pacientes.

A alta carga parasitária, o elevado índice de LDU e as lesões histológicas são as análises clássicas da patologia e compatíveis com a descrição na literatura. As demonstrações diretas e indiretas da *Leishmania* demonstraram que a infecção foi estabelecida com sucesso nos animais (REQUENA et al., 2000). Ficou evidenciado que a polarização das diferenças estatísticas para o sexo dos animais de acordo com a literatura (TRAVI et al., 2002; ANURADHA; KATIYAR, 1990).

Surpreendentemente, o tratamento reduziu a mortalidade significativamente entre as fêmeas com sobrevida total e é bastante curioso que o mesmo não tenha acontecido com os machos. Mesmo que a literatura demonstre que fêmeas apresentem maior resistência com lesões menores em modelos cutâneos devido às influências hormonais que alteram o perfil das citocinas IL-4, IL-10 e TGF-beta. A doença progressiva no baço está associada aos altos níveis de IL-10 e TGF-beta (STANLEY; ENGWERDA, 2007), mas a total sobrevida de fêmeas é um fato notável para a concentração e patogenicidade do agente inoculado. Além disso, o grupo controle apresentou significativamente mais alopecia do que o grupo experimental, que é um dado característico para melhor evolução da doença no grupo medicado, o que não aconteceu no grupo controle positivo.

Tanto os machos quanto as fêmeas tratados ganharam mais peso que seu respectivo controle positivo com altíssima significância. O consumo de ração teve tendência para diferença entre machos (valor de  $p > 0,05$ , valor de  $p = 0,09$ ) e isso poderia justificar o ganho de peso para este sexo, mesmo que a ração fosse oferecida *ad libitum* a todos os animais. Entretanto, não explica porque o mesmo fenômeno de ganho de massa altamente significativo também aconteceu com as fêmeas que apresentaram consumo semelhante de ração (valor de  $p > 0,05$ , valor de  $p = 0,38$ ). O consumo de ração por

gaiola também não foi considerado diferente entre os respectivos grupos experimentais e controle. Por isso, o efeito sobre a massa corporal sugere que tenha ocorrido por efeito principal da ação da medicação nos animais do grupo experimental.

O hamster sírio macho utilizado neste estudo foi menor do que as fêmeas. A caracterização do modelo utilizado é realizada por desambiguação da literatura, que ora cita um ou outro como maior (GATERMANN et al., 2002). Todos os dados apresentaram-se aderentes a normalidade de acordo com o teste de Lilliefors. Os machos infectados não medicados com os Fatores de Auto-organização apresentaram menor massa corporal em relação às respectivas fêmeas infectadas, à ocasião da eutanásia entre 6 (seis) e 7 (sete) meses de idade, com alta significância ao teste de Mann-Whitney (valor de  $p < 0,001$ , valor de  $p = 0,0012$ ). O mesmo aconteceu quando se comparou todos os machos com todas as fêmeas de todos os tratamentos, com alta significância ao teste de Mann-Whitney (valor de  $p < 0,001$ , valor de  $p < 0,0001$ ). Para estas duas análises procederam-se teste não paramétrico porque a variância entre as amostras foram desiguais. Comparando-se os machos do grupo experimental com as fêmeas do grupo experimental ao teste t houve diferença altamente significativa com valor de  $p < 0,001$ , valor de  $p < 0,0001$ . Diferentemente das demais avaliações, houve ausência da variância para os grupos medicados de ambos gêneros.

A massa absoluta do baço nos machos foi maior significativamente, mas não a relativa, e isso pode ser explicado pela maior massa significativa deste sexo. O percentual do peso do baço para hamsters está entre 0,08% e 0,17% de seu peso vivo conforme o sexo e linhagem de laboratório ou selvagem (GATERMANN et al., 2002), entretanto, os animais infectados apresentaram valores de 3,5 (três e meio) até 7,5 (sete e meio) vezes o esperado proporcionalmente para este órgão pela avaliação do Índice esplênico, que pode ser devido a maior atividade neste órgão para todos os animais por estarem infectados. O fígado não apresentou diferença absoluta ou relativa em relação ao seu peso para nenhum sexo. Ao analisarmos a sobrevivência e ganho de peso podemos identificar que o efeito da medicação foi capaz de alterar o ganho de peso com pequeno efeito do consumo de ração, mas não foi capaz de alterar a sobrevivência entre machos, o que explicita novamente a diferença de sexo para este modelo de infecção experimental.

A formação de granulomas na Leishmaniose Visceral em órgãos como fígado e baço é descrita em humanos (BOGLIOLO, 1956; RAMOS et al., 1994) cães experimentalmente infectados com *Leishmania chagasi* (OLIVEIRA et al., 1993; TAFURI, 1996), cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania chagasi* no Brasil e *Leishmania chagasi* na Venezuela (SANCHEZ et al., 2004), camundongos e hamsters experimentalmente infectados (GUTIERREZ et al., 1983; Mc ELRATH et al., 1988; CERVIA et al., 1993; COBERT et al., 1992; RIÇA-CAPELA et al., 2003). No fígado os granulomas formam nódulos isolados, raramente confluentes, na luz dos sinusóides (intralobulares), ocluindo ou não parcialmente os mesmos, nos espaços porto-biliares e mais raramente na luz das veias centrolobulares. Constituem-se, predominantemente, por macrófagos, parasitados ou não, algumas células epitelióides, pequeno número de linfócitos e raros granulócitos neutrófilos. No baço, os granulomas são geralmente localizados na polpa vermelha ou sub-capsulares, sendo caracterizados apenas por acúmulos de macrófagos, parasitados ou não, associados aos linfócitos e alguns neutrófilos.

A dinâmica ou cinética da formação dos granulomas hepáticos na leishmaniose visceral experimental murina tem sido descrita por vários autores (GUTIERREZ et al., 1983; Mc ELRATH et al., 1988; CERVIA et al., 1993). Camundongos Balb/c infectados com *L. donovani* desenvolvem granulomas hepáticos nas primeiras quatro semanas da infecção. Em uma fase inicial, na primeira semana, os granulomas eram constituídos por alguns macrófagos parasitados, alguns granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) e células mononucleadas de permeio (monócitos e linfócitos). Na segunda semana, observou-se a fusão de macrófagos (células epitelióides) e aumento do influxo de células mononucleadas, levando a formação de nódulos. Da quarta semana em diante, os granulomas tornavam-se maduros, à medida que o parasitismo e o número de células diminuía e a deposição de colágeno aumentava. CERVIA et al., 1993, trabalhando com camundongos Balb/c infectados com *L. donovani* tratados com MAb antiCR3 (CD11b), demonstraram que o afluxo de células mononucleares que ocorre após a fusão dos macrófagos é dependente da presença de monócitos CD11b positivos. Além disso, a ação dos MAb antiCR3 não foi capaz de interromper a fusão das células de Kupffer e nem a organização do manto linfocitário. Nos hamsters, estudos relacionados a patogenia dos granulomas hepáticos também são descritos (CORBETT et al., 1992).

De acordo com diversos autores na literatura, os granulomas representam o sucesso da resposta imune T-dependente (SHEFFIELD, 1990; MURRAY; NATHAN, 1999; MURRAY, 2001). Na Leishmaniose visceral humana e canina, por exemplo, a presença de granulomas parece estar correlacionada com a cura espontânea ou manutenção da infecção em estados subclínicos (RAMOS et al., 1994; MURRAY, 2001; SANCHEZ et al., 2004). Todavia, o efeito antimicrobica da resposta granulomatosa parece ser impreciso dependendo da relação hospedeiro-parasito. Isso significa que a formação do granuloma não necessariamente garante a ação microbica caso a célula efetora (monócito-macrófago) seja refratária à ativação por linfócitos T, ou seja, intrinsecamente deficiente (MURRAY, 2001). Apesar de a resposta granulomatosa ser efetiva, controlada e coordenada, a resolução da doença irá depender de um balanço fino da resposta imunológica entre os fatores que irão controlar o crescimento da *leishmania* com indução da imunidade e os fatores que irão permitir que o parasito permaneça e produza a doença (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

A depleção linfocitária foi menor com leve significância para o grupo experimental de fêmeas em relação ao controle. É importante ressaltar que a lesão clássica da depleção linfocitária da bainha periarteolar da polpa branca do baço frequentemente encontrada em hamsters experimentalmente infectados com parasitos do gênero *Leishmania* (complexo *Leishmania*), em nenhum momento foi significativo neste estudo. Assim, baseado em todos esses fatos, é lícito especular sobre a possibilidade de modulação dos parâmetros pela medicação ultra-diluída utilizada (VAN WASSENHOVEN, 2005; BELLAVITE, 2005; BELLAVITE 2006a,b; BONAMIN, 2007). Esta modulação pode depender da dinamização do medicamento ultra-diluído que se apresenta em padrões oscilatórios nas curvas de potência-efeito (BONAMIN, 2007), com diferenças clínicas apreciáveis (MOREIRA et al., 2008; MONTEIRO DA SILVA; GOLOUBEFF, 2008; GOLOUBEFF; MONTEIRO DA SILVA, 2008).

Ao associarmos os dados de ausência de mortalidade em fêmeas medicadas com o leve aumento à imunoistoquímica de amastigotas no baço podemos cogitar uma repetição do fenômeno *cicle arrest* já descrito na literatura, entretanto, para modelos de câncer, tripanossomas e plasmódios com tratamentos por substâncias ultra diluídas (FRENKEL et al., 2009, SAHA et al., 2013, LOPES et al., 2006). A paralisação do desenvolvimento da doença teria sido o suficiente para demonstrar alterações importantes na clínica, em especial para a sobrevida, com leve aumento no órgão em

questão, resultado semelhante descrito na literatura ocorrido com plasmódios (LIRA-SALAZAR; MARINES-MONTIEL, 2006).

Como estudo inicial, identificamos alteração no curso da doença provocada pela medicação e esta influência se manifestou de forma diferenciada conforme o sexo dos hamsters. Ao considerar que a relação hospedeiro-parasito será influenciada pelo sexo através da ação de hormônios (ANURADHA; KATIYAR, 1990; TRAVI et al., 2002); a determinação para evolução da doença no baço ou a resolução com formação de granulomas no fígado, em última instância, será determinada por um ajuste fino na resposta do sistema imunológico (STANLEY; ENGWERDA, 2007); e que as medicações ultra diluídas são capazes de causar imunomodulação e *cicle arrest* (LIRA-SALAZAR et al., 2006; LOPES et al., 2006; FRENKEL et al., 2009; SAHA et al., 2013), observamos que a medicação alterou o curso da doença de forma significativa, em especial favorável para o sexo feminino.

Futuros estudos podem avaliar o risco de transmissão quando ocorre o fenômeno de *cicle arrest* com relação a esta doença. A avaliação da pele e do tecido nasal do hamster (BELEHU; TURK, 1976) ou pelo flebótomo é realizada através do xenodiagnóstico (VERÇOSA et al., 2008, VERÇOSA et al., 2012). Os efeitos em relação à ampla gama de escalas e potências, associada ou não a outros modelos e tratamentos – como a castração de cães machos, ou associações com medicações tradicionais para Leishmaniose, poderão determinar a melhor relação entre efeito e escala e/ou potência para tratar esta enfermidade negligenciada com potencial de se disseminar conforme é observada a expansão dos territórios com aumento de temperatura.

## 6. *Conclusões*

Os achados de parasitismo tecidual e as alterações histológicas observados nos hamsters são característicos da infecção por *Leishmania chagasi* descrita na literatura.

Os Fatores de Auto-organização preveniram a perda de massa (peso vivo) de forma extremamente significativa ocorrida para ambos os sexos.

A infecção experimental foi influenciada pelo sexo de hamsters com maior severidade para machos.

O tratamento determinou uma mudança clínica qualitativa para melhor no curso da infecção para fêmeas para os parâmetros de sobrevida e alopecia mas com aumento da parasitemia no baço.

O tratamento com a medicação ultra diluída apresentou diferença na resposta por sexo e este é um fato raramente relatado.

Os fenômenos observados sugerem que esta medicação apresente ação sobre o curso da infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* para futuros estudos aprofundados.



# Abstract

The Leishmaniasis is an old disease, neglected and relapsing which deserves a new solution. It spreads between the tropics and subtropics, appearing in the visceral, mucocutaneous and cutaneous forms, and occurring in humans and specially dogs. The host-parasite interaction is affected by the gender due to the hormonal influence on the immunity. The etiologic agent utilized in this study was the protozoa *Leishmania (Leishmania) chagasi*, also known by *Leishmania infantum*, strain MHON/BR/1972/BH400 originally from the canine visceral form, at the concentration of  $1 \times 10^6$  promastigotes. The hamster is a classic model, and was utilized in this study due of its susceptibility to the disease, presenting clinical, histological and parasitological symptoms with high lethality. The established human treatments present resistance, side effects, and are nephro and hepatotoxic, but if not treated, the disease is lethal. The FAO therapeutic (Factors of Self Organization) is a homeopathic modality conceived as an action-research and can treat many clinical pathologies in humans and animals. The ultra high dilutions that compose the series are: *Antimonium crudum* (antimony sulfide); *Kali carbonicum* (potassium carbonate); *Mercurius solubilis* (mercury nitrate); *Sulphur* (sulphur); *Natrum muriaticum* (sodium chloride); *Aurum metallicum* (gold); *Ammonium muriaticum* (ammonium chloride). The potencies 5 (five) and 3 (three), 12 (twelve) and 3 (three) of the fifty-millesimal scale, popularly known as LM, were used in this order and administered in 2 (two) penta series, performed on the 17<sup>th</sup> (seventeenth) and 20<sup>th</sup> (twentieth) days after the agent inoculation. The clinical signs evaluated were survival, body mass evolution, food consumption, alopecia, activity decrease, dehydration, cachexy and ascites. The signs of parasitic load in spleen and liver were analyzed by immunohistochemistry to *Leishmania* amastigotes, spleen and liver LDU index, splenic and hepatic index. The macroscopic and microscopic changes evaluated by semi-quantitative or qualitative analysis to spleen histopathology were: tissue parasitism, splenic granuloma, red pulp macrophage hyperplasia, and white pulp depletion; and to liver were: tissue parasitism, intralobular granuloma, portal inflammation, Kupffer cells hyperplasia, amyloidosis, hyperemia (congestion). The group comparison was made between experimental and positive control of the same gender and was considered significant to values of  $p < 0,05$ . The tests performed were Lilliefors test to normality, t test, Mann-Whitney, two-way variance analysis, Log-Rank test and Fisher's exact test. This study had prior approval of the Animal Experimentation Ethical Committee of UFMG (CONCEA) registration 210/2007. This model infection success was confirmed by the direct demonstration of the parasite in the smear. The animals were followed from the 3<sup>rd</sup> month of life until the 106<sup>th</sup> day of infection; the gender factor influenced the disease development and the treatment effect. Significantly (values of  $p < 0,05$ ), the survival and the alopecia reduction were lower, and the immunohistochemistry higher, in all medicated females; the body mass was increased in treated males and females; and there was a decrease in the granuloma formation in medicated males, all compared respectively to positive controls. The food consumption parameters, spleen immunohistochemistry for males, depletion, parasitism, Kupfer cells, and hepatic index, presented absence of significance of p value between 0,05 and 0,10. Considering that the host-parasite relationship will be influenced by the gender hormonal action, the determination of disease evolution in spleen or the liver granuloma development, in the last instance, will be determined by a fine adjust in the immune system response; the ultra high diluted medicines are capable of causing immunomodulation and cycle arrest; was observed that the medicine altered the disease course significantly, specially favorable to females. Future studies can identify the phenomenon of this mechanism; evaluate the risk of this parasite skin transmission, and also the effects in relation to a wide range of scales and potencies, associated or not to other treatments, to determine the better association between the scale-potency effects to this therapeutic tool.

## 7. Referências Bibliográficas

ADLER S., THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala-azar. II *Leishmania infantum*. **Proc. R. Soc.**, v108, p. 453-463, 1931.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas**. Belém:Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, p. 324, 2007.

AKOPYANTS N. S., KIMBLIN N., SECUNDINO N., PATRICK R., PETERS N., LAWYER P., DOBSON D. E., BEVERLEY S. M., DAVID L. SACKS D. L. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 265–268, 2009.

AMORIM, M. Relato de caso de Dengue Hemorrágica demonstrando a resolatividade da TerapêuticaFAO empregada em UTI pediátrica. Rio de Janeiro(Brasil): **Anais III Simpósio FAO**; 2008.

ANURADHA, R. P., KATIYART A. J. C. Sex-influenced population kinetics of *Leishmania donovani* in hamsters. **IJEB**. v. 28, p. 876-879, 1990.

ARRAES, S. M. A. A., VEIT, R. T., BERNAL, M. V. Z., BECKER, T. C. A., NANNI, M. R. Leishmaniose tegumentar americana em municípios da região noroeste do estado do Paraná: utilização de sensoriamento remoto para análise do tipo de vegetação e os locais de ocorrência da doença. **SBMT**, v. 41, n. 6, p. 642-647, 2008.

AWASTHI A., MATHUR R. M., SAHA B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, p. 238-258, 2004.

BELEHU, A., TURK, J. L. Establishment of cutaneous *Leishmania enriettii* infection in hamsters. **Infect. Immun.**, v. 13, n. 4, p. 1235-41, 1976.

BELLAVITE P., CONFORTI A., PIASERE V., ORTOLANI R. Immunology and homeopathy. 1. Historical background. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2, n. 4, p. 441–52, 2005.

BELLAVITE P., ORTOLANI R., CONFORTI A. (b) Immunology and Homeopathy. 3. Experimental Studies on Animal Models. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 3, n. 2, p. 171-186, 2006b.

BELLAVITE P., CONFORTI A., PONTAROLLO F., ORTOLANI R. (a) Immunology and homeopathy. 2. Cells of the immune system and inflammation. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 3, n. 1, p. 13-24, 2006a.

BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência a fibrose hepática leishmaniótica. **O Hospital**, v. 3, p. 101-164, 1956.

BONAMIN, L.V. Dados experimentais que fundamentam teorias interpretativas sobre ultra-diluições. Tributo a Madeleine Bastide. **Cult. homeopát.**, v. 21, p. 29-35, 2007.

BONAMIN B., SATO C., NETO R. Z., MORANTE G., CARDOSO T.N., SANTANA F.R., COELHO C.P., OSUGI L., POPI A. F., HURTADO E. C. P., MARIANO M. Immunomodulation of Homeopathic Thymulin 5cH in a BCG-Induced Granuloma Model. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2013, p. 15, 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA. POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES, Portaria nº 1180, de 19 de agosto de 1997, publicada em 04 de setembro de 1997. **DOU**, 2006

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA. **FHB 3**, 3ª Ed., 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**, 2013.

CERVIA, J. S.; ROSEN, H.; MURRAY, H. W. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. **Infect-Immun**, v. 61, p. 1330-1333, 1993.

CORBETT C. E. P., PINTO PAES R. A., LAURENT M. D. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **Inst. J. Pathol.**, v.73, p. 417-433, 1992.

EUROPEAN COMMITTEE FOR HOMEOPATHY. **Towards another model of health and disease - A new perspective on how to achieve good health for all across the EU**, 2004.

FRENKEL M., MISHRA B. M., SEN S., YANG P., PAWLUS A., VENCE L., LEBLANC A., COHEN L., BANERJI P., BANERJI PRA. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. **Int J Oncol**, v. 36, p. 395-403, 2010.

GALHARDI, W. M. P., BARROS, N. F. **The teaching of homeopathy and practices within Brazilian Public Health System (SUS)**. Botucatu, SP: Interface [online] v.12, n. 25, p. 247-266, 2008.

GARG, R., DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 439-54, 2006.

GATTERMANN R., FRITZSCHE P., WEINANDY R., NEUMANN K. Comparative studies of body mass, body measurements and organ weights of *Mesocricetus auratus* wild-derived and laboratory golden hamsters. **Lab Anim.**, v. 36, p. 445-454, 2002.

GOLOUBEFF B., MONTEIRO DA SILVA, S. L. Dermatopatias tratadas com Fatores de Auto-Organização São Paulo(Brasil): **XXIX Congresso Brasileiro de Homeopatia**; 2008.

GUERIN P. J., OLLIARO P., SUNDAR S., BOELAERT M., CROFT S. L., DESJEUX P., WASUNNA M. K., BRYCESON A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis.** v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GUTIERREZ, Y; MAKSEM, J. A. REINER, N. E. Pathological changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. **AJP**, v. 114, p. 222-230, 1983.

KHUDA-BUKHSH, A. R. Laboratory Research in Homeopathy: Pro **Integr Cancer Ther**, v. 5, n. 4, p. 320-332, 2006.

KUHN KG. Global warming and leishmaniasis in Italy. **TM&IH**, v. 7, n. 2, p. 1–2, 1999.

LIRA-SALAZAR G., MARINES-MONTIEL E., TORRES-MONZÓN J., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ F., SALAS-BENITO J. S. Effects of homeopathic medications *Eupatorium perfoliatum* and *Arsenicum album* on parasitemia of *Plasmodium berghei*-infected mice. **Homeopathy**, v. 95, n. 4, p. 223-8, 2006.

LOPES L., LYRIS M. F., GODOY C. C. O., GABARDO J., SCHADECK R., BUCHI D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron.**, v. 37, p. 277-287, 2006.

MARSELLA, R., GOPEGUI, R. Leishmaniasis: are emerging zoonoses. **ISD**, v. 31, p.801-814, 1998.

McELRATH, M. J.; MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 1927-1937, 1988.

MITSUHASHI, T. S. Terapêutica FAO em um caso de depressão e ataques de pânico. *In: Anais III Simpósio FAO*, Rio de Janeiro, 2008.

MONGE-MAILLO B., LÓPEZ-VÉLEZ R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. **Drugs**, Oct 30. [Epub ahead of print], 2013.

MONTEIRO DA SILVA, S. L., GOLOUBEFF, B., Resolução clínica de casos opostos: tratamento de osteomielite e anquilose vertebrais em cães com Fatores de Auto-Organização. Rio de Janeiro(Brasil): **IX Simpósio Nacional de Pesquisa em Homeopatia**; 2008.

MONTEIRO, D. A., IRIAT J. A. B., Homeopathy in the Unified National Health System in Brazil: users' representations of homeopathic treatment. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 8, p. 1903-1912, 2007.

MOREIRA H. M., AMORIM M., TREIGER J., et al. Reversão de intoxicação experimental por praguicidas organofosforados em ratos com medicamentos homeopáticos **Brazilian Homeopathic Journal**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2008.

MOREIRA H. M., AMORIM, M., MARUYAMA C., TRINCA, R., TORRES, C., ORNELLAS R., SANTOS C., ALVES JUNIOR, M., GUIGUER, E., LIRA, B. Survival of Mice with Ehrlich Ascitic Tumour Treated with Ultra-dilutions. **EJC**, v. 47, n. 1, p. S100 Proffered papers, 2011.

MELBY P. C., CHANDRASEKAR B., ZHAO W., COE J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol**, v. 166, p. 1912-20, 2001.

MORENO J., ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MURRAY, H. W. e NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J Exp Med**, v. 189, n. 4, p.741-6, 1999.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int J Exp Pathol**, v. 82, n. 5, p. 249-67, 2001.

MURRAY, H. W., BERMAN J. D., DAVIES C. R., SARAVIA N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p, 1561–77, 2005.

NASCIMENTO, E. L. T. et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2964-2967, 2008.

OLIVEIRA, G. G., SANTORO, F. et al. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p.243-8, 1993.

OLLIARO P. L., GUERIN P. J., GERSTL S. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 763-774, 2005.

PEREIRA W. K. V., LONARDONI M. V. C., GRESPAN R., CAPARROZ-ASSEF S. M., CUMAN R. K. N., BERSANI-AMADO C. A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **J INFECTION**, v. 51, n. 2, p. 157-164, 2005.

RAMOS, C. C., DUARTE, M. I. et al. Fatal visceral leishmaniasis associated with acquired immunodeficiency syndrome: report of a case with necropsy findings and immunohistochemical study. **Rev Soc Bras Med Trop São Paulo**, v. 27, n. 4, p.245-50, 1994.

REQUENA J. M., SOTO M., DORIA M. D., ALONSO C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Vet Immunol Immunop**, n. 76, p. 269-281, 2000.

RIBEIRO R. R., MOURA E. P., PIMENTEL V. M., SAMPAIO W. M., SILVA S. M., SCHETTINI D. A., ALVES C. F., MELO F. A., TAFURI W. L., DEMICHELI C.,

MELO M. N., FRÉZARD F., MICHALICK M. S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 7, p. 2564-72, 2008.

RIÇA-CAPELA M. J., CORTES S., LEANDRO C., PELETEIRO M. C., SANTOS-GOMES G., CAMPINO L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitol. res.** v. 89, n. 3, p. 163-169, 2003.

ROTUREAU, B. Are New World leishmaniases becoming anthroponoses? **Med Hypotheses** v. 67, p. 1235–1241, 2006.

SAHA S., HOSSAIN D. M. D. S., MUKHERJEE S., MOHANTY S., MAZUMDAR M., MUKHERJEE S., GHOSH U. K., NAYEK C., RAVEENDAR C., KHURANA A., CHAKRABARTY R., SA G., DAS T. *Calcareo carbonica* induces apoptosis in cancer cells in p53-dependent manner via an immuno-modulatory circuit **BMC CAM**, v. 13, p. 230, 2013.

SANCHEZ, M. A., DIAZ, N. L. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 6, p. 618-24, 2004.

SHEFFIELD, E. A. The granulomatous inflammatory response. **J Pathol**, v. 160, n. 1, p. 1-2, 1990.

SINGH S., SIVAKUMAR R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J Infect Chemother**, v. 10, p. 307–315, 2004.

SOLANO-GALLEGO L., KOUTINAS A., MIRO G. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.** 2009.

STAUBER, L. A. Host resistance to the Khartoum strain of *Leishmania donovani*. **Rice Inst. Pamphlets**, v. 45, p. 80-83, 1958.

STANLEY A. C., ENGWERDA C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Review. **Immunol Cell Biol**, v. 85, p. 138–147, 2007.

SUNDAR S., CHATTERJEE M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities **Indian J Med Res**, v. 123, p. 345-352, 2006.

TAFURI Wg. L., SANTOS R. L., ARANTES R. M. E., GONÇALVES R., MELO M. N., MICHALICK M. S. M., TAFURI W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J Immunol Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TAFURI, W. L., BARBOSA A. J., et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev Inst Med Trop**, v. 38, n. 2, p. 81-9, 1996.

TRAVI B. L., OSORIO Y., MELBY P. C., CHANDRASEKAR B., ARTEAGA L., SARAVIA N.G. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp.* **Infect Immun.**, v. 70, n. 5, p. 2288-96, 2002.

TRIPP, D. Action research: a methodological introduction. **Educ. Pesqui.** [serial online], v. 31, n. 3, p. 443-466, 2005.

VAN WASSENHOVEN Priorities and methods for developing the evidence of homeopathy – Recommendations of the ECH General Assembly and XVIII Symposium of GIRI. **Homeopathy**, v. 94, p. 107-124, 2005.

VERÇOSA B. L. A., LEMOS C. M., MENDONÇA I. L., SILVA S. M., DE CARVALHO S. M., GOTO H., COSTA F.A. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Vet Res.**, v. 6, n. 4, p.45, 2008.

VERÇOSA B. L. A., MELO M. N., PUERTO H. L., MENDONÇA I. L., VASCONCELOS A. C. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Vet Parasitol.** v. 189, n. 2-4, p. 162-70, 2012.

TAFURI, W. L., A. J. BARBOSA, *et al.* Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 2, Mar-Apr, p. 81-9, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis.** 2–4 February Geneva, Switzerland. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Integrating homeopathy in health systems. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 2, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Safety issues in the preparation of homeopathic medicines.** 51p., 2009.

# 8. *Anexos*

**Anexo I - Protocolo de imunização para coelhos**

**Anexo II - Certificado do comitê de ética para pesquisa**

**Anexo III - Figuras histológicas coloridas transformadas para preto-e-branco**

**Figura 3 - imagens A, B, C, D, E, F, G e H**

**Figura 4 - imagens A, B, C, D, E, F, G e H**

**Figura 5 - imagens A, B, C, D, E e F**



**Anexo I - Protocolo de imunização para coelhos**  
***Produção in house de anticorpo policlonal antileishmania***

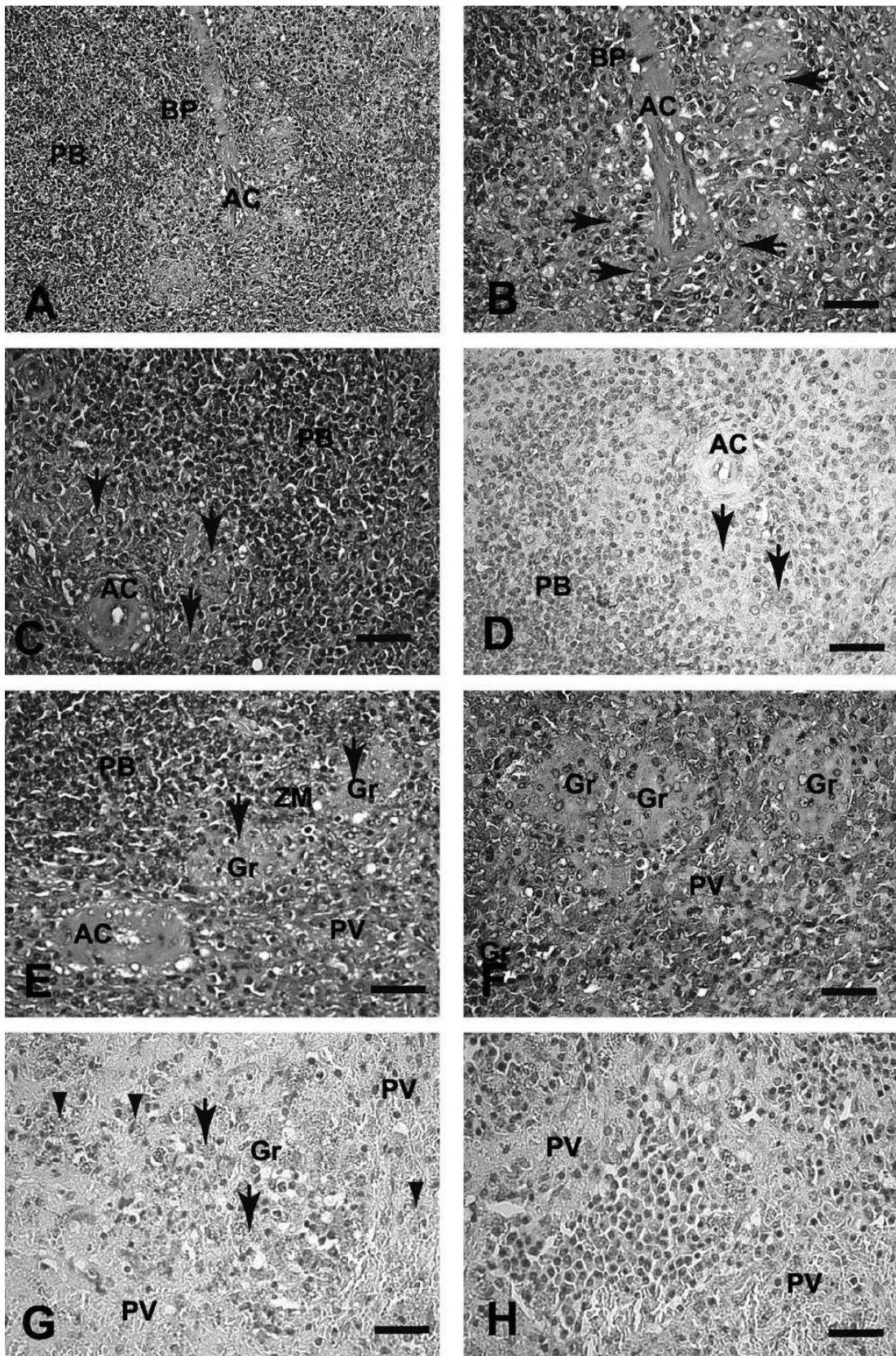
**Material:**

- 2 Seringas de 3 mL e de 50mL de plástico
- PBS 1X
- Adjuvante de Freud completo (com micoplasma) e incompleto (Sigma s5881)
- Algodão
- Tesoura

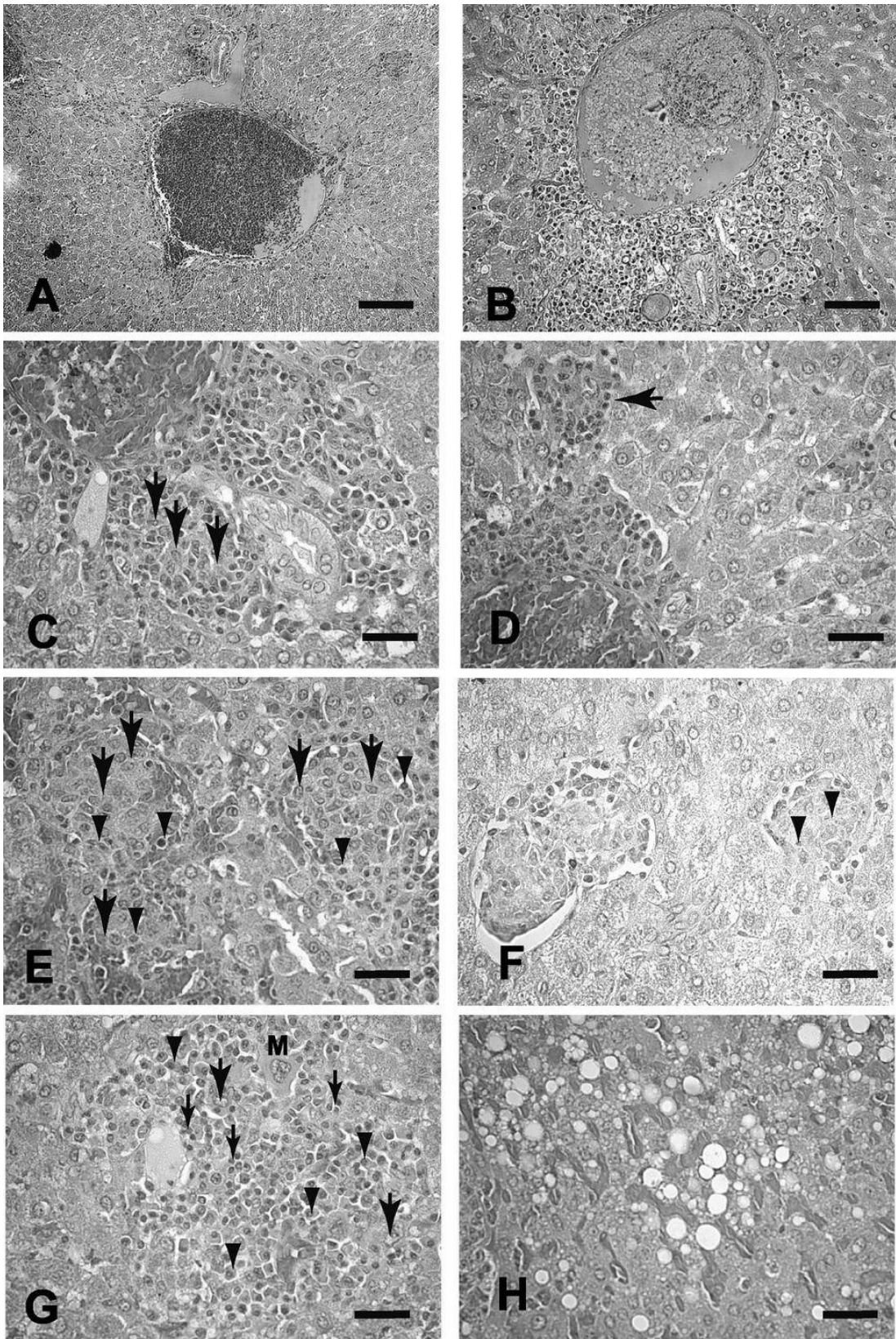
**Preparo do antígeno:**  $10^7$  formas de *Leishmania chagasi* em fase estacionária.

- 1) Em 500 µl de PBS 1X inativar as formas de leishmaia à 65°C, 45 min – Banho Maria.
- 2) Misturar - 500 µl do AG a 800\* µl do adjuvante de Freud completo. \*Ao preparar a emulsão ocorre perda, por isso, usar 800 µl ao invés de 500 µl exatos.
- 3) Pegar a mistura com uma das seringas, acoplar ao *tree way* e aspirar a mistura várias vezes até formar uma emulsão\* que quase não se consegue puxar com a seringa.  
\*Para saber se a emulsão está pronta pingar uma gota na água, se ela não se desmanche já está adequado para uso.
- 5) Antes da 1ª imunização retirar amostra de sangue do coelho (pré-imune) negativo mais ou menos 10 mL de sangue. Passar xilol na orelha do coelho para dilatar a veia e facilitar a punção da veia. Passar álcool para voltar ao normal.
- 6) 1ª Imunização – Dividir 500 µL em 2 aplicações de cada lado no músculo interno da coxa (intramuscular). Realizar tricotomia no local para melhor visualização e passar álcool.
- 7) 2ª Imunização – 15 dias após – Repetir o procedimento acima, entretanto com adjuvante incompleto.
- 8) 3ª Imunização – 15 após a 2ª, repetir o procedimento com adjuvante incompleto.
- 9) Retirar soro do coelho de 10 a 15 dias após a última imunização e avaliar titulação de anticorpo, se for satisfatória pode retirar sangue do coelho por até 3 semanas.
- 10) Posterior - promover uma nova imunização semelhante à última coletar mais soro.

Anexo III – Figuras em preto-e-branco  
Figura 3 - imagens A, B, C, D, E, F, G e H



Anexo III – Figuras em preto-e-branco  
Figura 4 – imagens A, B, C, D, E, F, G e H



Anexo III – Figuras em preto-e-branco

Figura 5 – imagens A, B, C, D, E e F

