KARINNE MARQUES DA SILVA

**Avaliação do efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em
culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***

São Paulo

2016

KARINNE MARQUES DA SILVA

**Avaliação do efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em
culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3268
FMVZ

Silva, Karinne Marques da
Avaliação do efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* / Karinne Marques da Silva. -- 2016.
73 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Homeopatia. 2. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. 3. *Antimonium crudum*. 4. Tratamento. 5. Profilaxia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação da sensibilidade da *Leishmania chagasi* *in vitro* ao tratamento homeopático", protocolado sob o nº 3107/2013, utilizando número indeterminado de cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Determination of sensibility of *Leishmania chagasi* *in vitro* ao tratamento homeopático", protocol number 3107/2013, utilizing indefinite number of dogs, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 17 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Karinne Marques

Título: Avaliação do efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho à minha mãe, Cleudenice Marques Batista e ao meu pai, Valdemir Alselmo da Silva, aos quais sempre dedicarei tudo o que faço por amor, para resto da minha vida. E aos animais, que dão razão e motivação ao meu trabalho e dedicação profissional e pessoal.

Agradeço primeiramente a Deus e Jesus pela oportunidade da vida e aos mentores espirituais pela ajuda em manter-me até agora.

A minha mãe Cleudenice M. Batista, ao meu pai, Valdemir A. da Silva, meu irmão Renato M. da Silva, aos meus avós maravilhosos, tios e primos pelo apoio e amor incondicional;

Ao meu querido professor Nilson Roberti Benites, pelos ensinamentos não só de homeopatia como de vida. Afirmo que ganhei não só um orientador que admiro pelo extremo profissionalismo humano, mas também um pai acadêmico e um grande amigo;

A essencial colaboração, ajuda e atenção do professor Mauro Javier Cortez Veliz e do doutorando Ismael Pretto Sauter e de toda sua equipe;

Aos colegas de departamento Priscilla Melville, Eveline Zuniga, Clarice Vaz, Andréa Costa e Marcos Gomes, Léia Maria, Fernanda Dornelas, Luís Ramiro, Carol Torres, Fernanda Gonsales, Lílian Abgail, Juan David e Julia Lima pela linda amizade que fizemos e atenção que me concederam em todos os momentos.

Ao professor Arlei Marcili pela ajuda.

Ao Laboratório de Leishmanioses do ICB, professora Silvia Uliana e a mestra Jordana Oliveira

Aos funcionários da secretaria, portaria e limpeza (em especial Danival L. Moreira, Carol Leal e Roseli Augusto).

À Farmacia Bento Mure, por ceder o medicamento utilizado e colaborar com o conhecimento sobre a escala de produção dos medicamentos homeopáticos.

À capoeira do CEPE USP, representada pelos amigos do grupo “Projete Liberdade Capoeira”, os quais fortaleceram de forma imensurável o período que me mantive na USP e que, sem a energia e o axé presentes em cada aula, cada encontro e cada abraço, tudo não teria sido como foi.

Aos grandes amigos e companheiros que fiz durante esse período de mestrado Guilherme Fabri, Letícia Santiago, Natalia de Quadros, Gabriela Bonifácio, Cristina Gonçalves, Kika, Vinicius, Mestre Gladson, Ashwana Fricker.

A todos os meus amigos de forma geral, em especial Ana Carolina Leão, Juliana Sette, Gabriela e Mariana Leão, agradeço de coração.

E ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

“A Ciência é para os que estão aprendendo e a Poesia, para os que já sabem”

Hermínio C. Miranda

RESUMO

SILVA, K. M. **Avaliação do efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***. [Evaluation of the effect of the homeopathic medicine *Antimonium crudum* in cultures of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*]. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Atualmente, a busca por opções de tratamento com medicações financeiramente mais acessíveis e menos agressivas ao organismo, aliada à uma visão mais humana de tratar o paciente, fez da homeopatia uma prática mais utilizada. Em se tratando de uma das sete endemias de maior impacto mundial, a Leishmaniose é uma doença negligenciada causada pelo parasita do gênero *Leishmania*, com estimativas alarmantes de novos casos e óbitos por ano, se tornando um grande problema de saúde pública. No Brasil, a Leishmaniose Visceral em áreas urbanas se destaca pelo fato de ser uma zoonose que possui como principal reservatório também o cão, que sempre esteve presente e em estreito contato com grande parte das famílias brasileiras. O mesmo, quando infectado pela doença, é submetido à eutanásia como norma do Ministério da Saúde, por apresentar riscos à população. Utilizando-se a Lei da Similitude, instruída por Hahnemann, chegou-se à medicação *Antimonium crudum* para possível tratamento e profilaxia da Leishmaniose Visceral Canina. Portanto, no presente trabalho, visou-se o estudo da ação da medicação homeopática *Antimonium crudum*, *in vitro*, diretamente em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, através do teste de MTT (brometo de 3-[4,5 – dimetiltiazol- 2- il) – 2,5 difenil- 2 H- tetrazólio), que visa mensurar a atividade metabólica e a observação da curva de crescimento do parasito na forma promastigota, bem como a ação na infecção das Leishmanias em macrófagos da linhagem J774, em sua forma amastigota. Os resultados obtidos para a forma promastigota mostram que o estímulo homeopático não teve influência direta sobre os parasitos, tanto no teste de MTT quanto na curva de crescimento, corroborando os estudos que sugerem que a homeopatia não age diretamente sobre o parasito e sim em conjunto com o sistema imune do hospedeiro. Já nos resultados dos ensaios infectivos, observa-se, em geral, maior porcentagem de macrófagos infectados, assim como maior taxa de fagocitose nos grupos tratados com *Antimonium crudum*,

o que sugere uma maior atividade dos mesmos levando à uma resposta imune secundária mais representativa e conseqüentemente, à destruição do antígeno. Quando se verificou o pré e o pós-tratamento de macrófagos, observou-se que as potências mais baixas, CH6 e CH12, parecem ter maior eficiência e quando a infecção já está instalada, a potência CH30 parece ter uma maior significância na profilaxia da infecção. Apesar disso, a resolução da doença dependerá da ação imunológica de cada hospedeiro, que irá controlar o crescimento e manutenção do parasito ou não.

Palavras-chave: Homeopatia. *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*. *Antimonium crudum*. Tratamento. Profilaxia.

ABSTRACT

SILVA, K. M. **Evaluation of the effect of the homeopathic medicine *Antimonium crudum* in cultures of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.** [Avaliação do efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*]. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Currently, the search for treatments with medicines that are financially affordable, less aggressive to the host, and more humane in treating the patient, homeopathy is the most practical course. When it comes to one of the seven largest worldwide impact endemics, Leishmaniasis is a neglected public health complex with alarming estimates of new cases and deaths per year. In Brazil, urban Visceral Leishmaniasis also stands out because the reproductive cycle of this zoonotic disease can include the dog, which has always been present and in close contact with most Brazilian families. Dogs, when infected by the disease are euthanized as a rule from the Ministry of Health to prevent risks to the population. Using the Law of Similars, developed by Hahnemann, the medication *Antimonium crudum* was identified as possible treatment and prophylaxis for Canine Visceral Leishmaniasis. Therefore, the present work was to study the direct action of the homeopathic medicine *Antimonium crudum* in vitro against the promastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, through the MTT test (3- [4.5 - dimetitiazol- 2-yl) - 2.5 diphenyl tetrazolium H 2), which aims to measure the metabolic activity; the promastigote growth curve; as well as the performance of promastigote infectivity in J774 macrophages. The results from both the MTT assay as well as the growth curve show that the homeopathic stimulus did not directly influence the promastigote form of the parasites, corroborating studies that suggest that homeopathy has no direct action on the parasite, but may function together with the host's immune system. Treatment with *Antimonium crudum* led to a higher percentage of infected macrophages in the infectivity assays and a higher rate of phagocytosis, which suggests increased activity leading to a stronger secondary immune response and as a result, antigen destruction. Assays in which macrophages were treated before or after infection suggest that lower concentrations (CH6 and CH12) seem most effective when the

cells are already infected, however a higher concentration (CH30) appears to have greater activity in preventing infection. Ultimately, the resolution of the disease depends on the immunological action of each host, which may control the growth and maintenance of parasite.

Keywords: Homeopathy. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. *Antimonium crudum*. Treatment. Prophylaxis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	HOMEOPATIA: CONCEITOS GERAIS	15
2.2	ORIGEM DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO.....	19
2.3	LEISHMANIOSES	21
2.3.1	Leishmaniose Visceral Canina	25
2.3.1.1	<i>Epidemiologia .....</i>	<i>25</i>
2.3.1.2	<i>Transmissão .....</i>	<i>26</i>
2.3.1.3	<i>Sistema imune.....</i>	<i>27</i>
2.3.1.4	<i>Sinais clínicos.....</i>	<i>29</i>
2.3.1.5	<i>Diagnóstico.....</i>	<i>30</i>
2.3.1.6	<i>Controle.....</i>	<i>31</i>
2.3.1.7	<i>Tratamento .....</i>	<i>32</i>
2.3.1.8	<i>Vacinas.....</i>	<i>33</i>
3	OBJETIVOS	36
3.1	GERAL	36
3.2	ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	MEDICAMENTO.....	37
4.2	CULTIVO CELULAR.....	37
4.2.1	Parasitos	37
4.2.2	Macrófagos	39
4.2.3	Avaliação da atividade de Antimonium Crudum no crescimento de L. (L.) infatum chagasi	39
4.2.4	Avaliação da citotoxicidade do Antimonium Crudum em L. amazonensis através do teste de MTT	39
4.2.5	Avaliação do tratamento homeopático com Antimonium crudum em macrófagos infectados com <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> (pós tratados)	40

4.2.6	Avaliação de macrófagos previamente tratados com Antimonium Crudum e infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> (pré-tratados)	41
4.2.7	Imunofluorescência	42
4.2.8	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	44
5.1	EFEITO DA MEDICAÇÃO A. CRUDUM EM CULTURA EM PROMASTIGOTAS	44
5.2	EFEITO DA MEDICAÇÃO ANTIMONIUM CRUDUM NO PRÉ E PÓS TRATAMENTO AO INFECTAR MACRÓFAGOS J774	52
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é um complexo de doenças causada pela infecção de protozoários do gênero *Leishmania* transmitida pela picada de flebotomíneos. A doença tem impacto mundial e no caso da Leishmaniose Visceral, leva a sinais clínicos severos e até a morte se não tratada (BRASIL, 2014). Na busca por novas formas de tratamento, a homeopatia pode se tornar uma opção ao uso dos medicamentos atualmente utilizados para combater a doença que possuem alta toxicidade ao organismo e um custo elevado (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997; BRASIL, 2012). A escolha do medicamento homeopático *Antimonium crudum* está baseada nos principais pilares que apoiam a homeopatia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HOMEOPATIA: CONCEITOS GERAIS

A concepção primária de homeopatia foi descrita por Hipócrates (460 – 370 a.C.), da qual partia-se da cura pelo semelhante para a obtenção da cura do paciente. Em 1790, o médico alemão Cristiano Frederico Samuel Hahnemann, personalidade marcada por aguçada inteligência e espírito científico muito crítico, traduziu o “Tratado de Matéria Médica” do médico escocês William Cullem e ficou impressionado com a afirmação sobre a cura da malária, a qual o impulsionou a testar e pesquisar intensamente sobre o assunto. Nesse material, Hahnemann encontrou dados que diziam que a *China officinalis* (quina) fortalecia o estômago devido às suas propriedades amargas e adstringentes e neste contexto, ele testou o medicamento em si próprio e percebeu que a *China* causava febre intermitente, fraqueza, sonolência, tremores e outros sintomas habitualmente associados à malária. Ao testar outras drogas em indivíduos, Hahnemann resgatou a Lei Hipocrática da Semelhança: *Similia similibus curantur*, em que a escolha do medicamento se baseia nos sintomas semelhantes aos que foram causados em uma pessoa saudável. Então, Hahnemann publica em 1796 o “Ensaio sobre um novo princípio para descobrir as propriedades curativas das substâncias medicinais” no Jornal de Medicina Prática, tornando-se o marco do início da homeopatia. Mais tarde, publica mais três obras de imensa importância para os homeopatas: “Organon da arte de curar”, “Matéria Médica Homeopática” e “Doenças crônicas” (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997; BENITES, 2006; WASSENHOVEN, 2010; ANVISA, 2011).

Com a Filosofia Cartesiana em meados do século XIX, a homeopatia passa por um período crítico, pois conceitos como energia vital, integração entre físico, mente e emoção são esquecidos. Esse período leva Isaac Newton e Francis Bacon a manifestarem a opinião de que a Ciência começava a tomar um rumo errado. (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997). Mais tarde o médico francês Benoit Mure chegou ao Brasil em 1840, introduzindo e disseminando a arte da homeopatia (SÉROR, 2005).

Em 1952, tornou-se obrigatória no ensino a Farmacotécnica Homeopática em todas as faculdades de farmácia do Brasil. Mais tarde, em 1966, publicaram-se diversas portarias, com instruções de instalação e funcionamento de farmácias homeopáticas e industrialização dos medicamentos (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997).

A partir de então, a prática tem se tornado mais difundida e no final da década de 70 foi criado pela OMS o Programa de Medicina Tradicional, que visa elaborar políticas comuns na medicina tradicional e complementar, incluindo a homeopatia, para seu uso de forma prudente (BRASIL, 2012).

Castro e Nogueira (1980), em uma campanha profilática contra meningite, conseguiram diminuir massivamente o número de casos da doença no município de Guaratinguetá (SP), com o uso do bioterápico *Meningococcinum* CH10. Essa campanha teve uma grande repercussão sendo também um grande marco para a história da homeopatia.

No ano de 1976, foi oficializada a Farmacopeia Homeopática Brasileira e em 1975 foi criada a Associação Médica Homeopática Brasileira (AMHB), que posteriormente impulsionou o reconhecimento da homeopatia como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina. Há apenas nove anos, o Ministério da Saúde publicou a portaria nº 971 que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2012; FILHO, 2015).

Nos dias atuais, a homeopatia está presente nas universidades e cursos de graduação médica e veterinária, tanto em disciplinas obrigatórias quanto em optativas.

A Medicina Veterinária vem ganhando amplo destaque em áreas clínicas, pesquisa e epidemiologia. Em 1993, foi criada a Associação Médico Veterinária Homeopática Brasileira (AMVHB), quem tem como objetivo contribuir para a difusão da área na pesquisa, ensino e extensão (MANHOSO, 2015).

O cenário da homeopatia compreende diversas pesquisas, resultando em trabalhos científicos que consolidam sua eficácia e mecanismo de ação (ANVISA, 2011). Wassenhoven (2010) salienta a necessidade da segurança dos medicamentos homeopáticos, pois ela influencia em sua qualidade, tanto na produção quanto na obtenção da matéria prima. Apesar de serem considerados benignos, tais medicamentos devem ser corretamente prescritos e estar dentro dos

padrões de boas práticas de qualidade, levando em consideração seu amplo uso para que não hajam falhas que prejudiquem a prática.

Mesmo possuindo aplicabilidade efetiva e reconhecida, é importante salientar os pilares que designam a homeopatia:

- A lei dos semelhantes, a qual a escolha do medicamento é dada a partir dos sintomas que foram causados em experimentação no homem são. Quanto mais compatibilidade qualitativa entre os sintomas e o medicamento e não necessariamente quantitativa, melhor será o resultado do tratamento (BENITES, 2006; WASSENHOVEN, 2010);
- A lei do vitalismo, levando em consideração a condição que rege o ser vivo, como sendo um fenômeno imaterial que caracteriza a vida, conceito já idealizado por Paracelso (1493-1591), que considerava o ser humano como um todo integrado e harmônico (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 1997). Vanderlei (2010) faz uma colocação interessante afirmando que os corpos físico e vital são compostos de substâncias divergentes que andam paralelamente, sendo esta situação mantida pela consciência;
- A experimentação no indivíduo sadio, salientando-se a importância do conhecimento do indivíduo como um todo nos determinados momentos de sua existência (BENITES, 2006; VANDERLEI, 2010).

Além disso, Hahnemann salientou a importância desta prática ser feita com uma única substância por vez e em indivíduo são, pois apenas dessa forma avaliam-se os “sintomas mórbidos, seguros e dignos de confiança”, cuja substância única, quando bem escolhida pelo médico, é suficiente para o restabelecimento da saúde (BENITES, 2006).

Segundo Clausen, Van Wijk e Albrecht (2010), alguns tipos de terapia que utilizam vários compostos ultradiluídos em uma única medicação, não se tratam de homeopatia e sim de homotoxicologia por não seguirem a lei dos semelhantes.

O processo de dinamização, que compreende a diluição e sucussão, visa à diminuição da toxicidade das substâncias obedecendo a uma progressão geométrica, que aumenta sua ação dinâmica e estimula a reação do organismo em direção à cura (BENITES, 2006). O processo de sucussão se dá pela colisão entre as matérias presentes no frasco do medicamento, agitando a solução, sendo

possível fazê-lo manualmente ou mecanicamente. Existe também a possibilidade de realizar a dinamização com bioterápicos, que são produtos não quimicamente definidos (secreções, excreções fisiológicas ou patológicas, certos produtos de origem microbiana e alérgenos) que servem de matéria prima para as preparações bioterápicas de uso homeopático (BENEZ, 1999).

De acordo com a farmacopeia homeopática, emprega-se, dentre outras, três escalas de diluição: a decimal (diluição preparada na proporção de uma parte da tintura mãe para nove partes de solução hidroalcóolica, identificando-a com a letra D ou DX), a centesimal (diluição de uma parte da tintura mãe para noventa e nove partes de solução hidroalcóolica. Identificam-se as potências com a letra C, de centesimal, seguida da letra H, de Hahnemann) e a escala cinquenta milesimal (diluição preparada na proporção de 1/50.000 e seus símbolos são Q ou LM). Essas dinamizações designam a potência do medicamento (ANVISA, 2011).

A homeopatia excede a atitude positivista, que tem como base a consciência moral, resultado da evolução sociobiológica que nós transmitimos. Ela também mantém o aspecto metafísico que deve ser alvo de estudos. Desta forma, é interessante a observação da relação entre as ciências metafísicas e positivistas paralelamente (WASSENHOVEN, 2010), fundamentando o conceito multidisciplinar como tendência para os dias atuais. O pensamento cartesiano dominante é desafiado pela homeopatia, que está baseada em paradigmas pouco ortodoxos com resultados extraordinários (TEIXEIRA, 2010).

Einstein desenvolveu a teoria da relatividade que além de outras inferências, a ideia de que a matéria e a energia são equivalentes ($E=mc^2$) (VANDERLEI, 2010) e nessa mesma linha revolucionária da física surgem hipóteses e experimentos a fim de provar a existência da energia. Lenger, Bajpai e Drexel (2008) extrapolaram um modelo que postula que o sistema vivo está associado a campos eletromagnéticos em estado quântico comprimido, refletindo o comportamento do sistema biológico em termos da remissão de luz ultra fraca após a excitação por fonte luminosa. O modelo proposto por eles compreende sistemas complexos não vivos. Ao realizarem seus experimentos com medicamentos homeopáticos em forma de glóbulos, observaram que os valores dos controles mostravam diferenças significativas em relação aos tratados. Essa diferença é incompreensível do ponto de vista clássico, podendo ser explicada pela física quântica.

Outras pesquisas tem demonstrado também o efeito das medicações homeopáticas que induzem o atraso do ciclo celular com subsequente apoptose de células cancerosas, levantando a emocionante possibilidade de uma janela de oportunidade para a terapêutica da doença (FRENKEL et al., 2010; SAHA et al., 2013).

2.2 ORIGEM DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO

A homeopatia contribui no tratamento específico das epidemias modernas, independente da dinâmica integrativa que envolve o binômio doente-doença de forma individualizada, desde que siga os pressupostos teórico-práticos da doutrina de Samuel Hahnemann para esse tipo de intervenção (TEIXEIRA, 2010).

Para a escolha do medicamento, é imprescindível obter um agregado de sintomas mórbidos. Desta forma, deve-se proceder à hierarquização dos sintomas com a finalidade de selecionar os sinais que mais individualizam a doença (BENITES, 2006; TEIXEIRA, 2010).

Em se tratando de uma doença epidêmica como a Leishmaniose, para a escolha do medicamento, levamos em consideração o gênio epidêmico. O termo gênio significa o que é peculiar, constituindo uma identidade e se distinguindo dos outros. Quando se utiliza a sintomatologia clínica peculiar de uma população de indivíduos acometidos por uma doença comum, a seleção do medicamento deve levar em consideração os sintomas que mais caracterizam a doença nessa epidemia. Essa escolha pode ser utilizada para tratar doenças epidêmicas ou usar como profilaxia para população sob risco (SÉROR, 2005).

Baseado nesse conceito, ao ocasionar em indivíduo sadio sintomas como perda de apetite, vômitos, dermatite ao redor dos olhos, pápulas vermelhas, emagrecimento, apatia, ceratoconjutivite, rachaduras nas narinas, canto da boca, erupções crostosas na pele, anorexia, comprometimento hepático, abdômen distendido, alterações na urina como aumento da frequência e muco, formação de granulomas, chegou-se ao medicamento *Antimonium crudum* (Sb2S23) para o tratamento e profilaxia do gênio epidêmico da Leishmaniose Visceral Canina (LVCan) (GIBSON, 1969; SÉROR, 2005).

Para contextualizar, o mineral Antimônio foi descrito pela primeira vez por Constantine (1087) com outras denominações como: stibium, barbason ou albastrum. Ao longo da história, observaram-se surtos de intoxicação por esse mineral. Porém, descobriu-se também que em menores doses possuía propriedades medicinais e foi prescrito pela primeira vez como medicamento por Paracelsus (THOMSON, 1925; GRISWOLD, 1950). Mais tarde, em 1604, um monge da Ordem dos St. Benedict, chamado, Basil Valentine, publica um trabalho intitulado "Triumph Wagen Antimonii" que significa "O carro triunfal do Antimônio", o qual descreve suas extraordinárias qualidades. A partir dessa publicação, surge-se a palavra Antimônio que deriva da expressão "destruidora dos monges" (THOMSON, 1925). Há controvérsias sobre a origem do nome, e outra definição vem do grego que significa "não estar sozinho" (WINTER, 2015).

O medicamento passou por várias formulações diferentes para o tratamento de algumas doenças, mas suas primeiras formas, como o Antimônio trivalente, possuíam um efeito tóxico intenso. Com o tempo, as novas formulações foram diminuindo a toxicidade, porém, até os dias atuais, produz grande impacto no organismo animal.

No contexto homeopático, em meados de 1960, utilizou-se o *Antimonium tartaricum* em grande proporção para tratamento da Leishmaniose, solução preparada a partir de tártaro emético, antimônio potássio tartárico, que pode se apresentar sob a forma de um pó branco ou incolor ou cristais (GEORGE, 1919; GIBSON, 1965). Entretanto, este medicamento é mais indicado ao tratamento de doenças em fases agudas. Ademais, ele não está incluso na lista dos medicamentos utilizados para tratar doenças crônicas descritas por Hahnemann. Viu-se então a necessidade de um medicamento mais profundo e semelhante para o quadro, como no caso do *Antimonium crudum* (*A. crudum*).

Santana (2014) demonstrou em seus experimentos *in vivo* que o tratamento em camundongos com *A. crudum* na potência 30 CH evidenciou uma reação inflamatória local mais suave em resposta à infecção por *Leishmania amazonensis*, com redução da migração de fagócitos e linfócitos.

Propõem-se no atual estudo a observação da ação do *A. crudum* em culturas celulares para corroborar com a utilização de um possível tratamento e profilaxia da LVCan.

2.3 LEISHMANIOSES

Embora considerada um complexo de doenças de extrema importância na atualidade, acarretando de 20.000 a 30.000 mortes por ano (WHO, 2015a), as Leishmanioses ainda são consideradas doenças negligenciadas no mundo (WHO, 2015b) e dados da vigilância passiva são insuficientes para estimativas reais do problema (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008). Apesar dos avanços, é evidente a necessidade de se estabelecer mecanismos de monitoração e registro de dados a fim de melhorar a qualidade do serviço de saúde oferecido para pacientes com Leishmaniose (PAHO, 2014). Ademais, ressalta-se a importância do diagnóstico precoce, tratamento e formas profiláticas adequadas para controle da doença (OPS, 2013).

Esse complexo está presente ao redor do mundo, compreendendo a bacia do Mediterrâneo, sudeste da Ásia, leste da África, Eurásia e Américas. Sua epidemiologia depende de características da espécie do parasito transmissor, região, aspectos ecológicos de transmissão, exposições atuais e anteriores da população ao parasito e também de hábitos e costumes destes indivíduos (WHO, 2015a).

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais pertencem à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (LAINSON; SHAW, 1987; BRASIL, 2006) e possuem duas formas em seu ciclo de vida: amastigota, que está presente no interior das células de hospedeiros vertebrados e seu flagelo é internalizado, e a forma promastigota, presente no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados, possuindo flagelo externalizado. (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987; READY, 2014).

Sua transmissão é realizada pela picada da fêmea de mosquitos dípteros hematófagos da família Psychodidae. No Velho Mundo (Ásia, Europa e África) é desempenhada pelo gênero *Phlebotomus* e no Novo Mundo (Américas) pelo gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecido como “mosquito-palha” ou “birigui” (DESJEUX, 1992; BOWMAN, 2010). No Brasil, o principal transmissor da Leishmaniose Visceral é o *Lutzomyia longipalpis*, entretanto, na região do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, o flebotomíneo *L. cruzi* tem sido agente da transmissão da doença (SALOMÓN et al., 2010).

Esses insetos possuem corpo piloso e delgado e se diferenciam dos demais dípteros, entre outras características, por desenvolverem seu estágio larval em matéria orgânica no solo, procurando locais úmidos e escuros para viverem. Alimentam-se de seiva para a manutenção da homeostase, porém, na maioria das espécies, as fêmeas anautogênicas (necessitam da nutrição sanguínea para maturação dos ovos) realizam repastos sanguíneos que usualmente ocorrem nos períodos crepusculares (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; BASTOS, 2012; READY, 2013).

Existem aproximadamente 20 espécies de *Leishmanias* que infectam mamíferos, e muitas delas causam a doença em humanos. Durante o ciclo da doença, após seriados repastos sanguíneos em outros animais contaminados, ocorre a inoculação do parasito nos mamíferos pela regurgitação de sangue que contém promastigotas da *Leishmania* (READY, 2014). Essa regurgitação se dá pela dificuldade de deglutição e consequente bloqueio da ingestão do sangue devido à grande quantidade de parasitos que se proliferam em seu hipostômio. O vetor, ainda afaimado, pratica a hematofagia diversas vezes, disseminando a doença (SACKS; KAMHAWI, 2001; TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

Figura 1 - Flebótomo do gênero *Lutzomya*

Fonte: (SILVA, K. M., 2015)

As formas infectivas do parasito (promastigotas metacíclicas) se desenvolvem no tubo digestivo do mosquito. Após o contato com a pele dos animais, as *Leishmanias* são inseridas por células do sistema fagocítico mononuclear, transformando-se em amastigotas e multiplicando-se por divisão binária simples nos fagolisossomos de macrófagos que são rompidos, disseminando a infecção via sistema linfático (TAYLOR; COOP; WALL, 2010; UENO; WILSON, 2012; READY, 2014).

As formas amastigotas são ingeridas pelo mosquito e são diferenciadas em promastigotas procíclicas no intestino médio do vetor, iniciando-se novamente a metaciclogênese (SACKS; KAMHAWI, 2001; BOWMAN, 2010; READY, 2014).

Ocasionalmente, os mosquitos não estão envolvidos na transmissão. Na Leishmaniose Visceral, existem alguns casos de transmissão direta, iniciada pela fase amastigota devido ao compartilhamento de agulhas, transfusão sanguínea, transmissão transplacentária ou ainda, transplante de órgãos infectados (CRUZ et al., 2002; MORILLAS-MARQUEZ et al., 2002). Além disso, alguns estudos sugerem

a participação de outros agentes na transmissão da doença, como por exemplo, pulgas, piolhos e carrapatos (MORAIS et al., 2013; PAZ et al., 2013; SALVATORE et al., 2014; CAMPOS; COSTA, 2014).

Cerca de 70 espécies de animais, incluindo o homem, já foram descritas como reservatório natural das leishmanioses, sendo portanto consideradas antroponozoonoses (WHO, 2015a).

Fatores socioeconômicos levam à alterações na interação entre o ser humano e o meio ambiente. A migração de pessoas do campo para áreas urbanas criam oportunidades de maior difusão de doenças (DESJEUX, 2001), ademais, a urbanização leva à redução do espaço ecológico e transformações severas, contribuindo diretamente para propagação, agravação e aumento da transmissão da Leishmaniose (MOTT et al., 1990; COSTA, 2005; ACEVEDO; ARRIVILLAGA, 2008).

Com base em sua forma clínica em humanos, a classificação da doença se dá da seguinte forma:

- Leishmaniose Cutânea (LC): Causada normalmente pela *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* ou *L. braziliensis*. A enfermidade é caracterizada por uma lesão persistente no local da picada, tornando-se gradualmente maior e mais avermelhada, podendo se tornar um processo intensamente ulcerante, comumente curado de forma espontânea. (ASHFORD, 2000; DAVID; CRAFT, 2009; READY, 2014).
- Leishmaniose Mucocutânea (LMC): Ocasionada principalmente pela *L. braziliensis*, procede da cura de um processo inicial de LC, em intervalo variável de tempo, onde se desenvolvem lesões no local da picada ou próximas à superfície mucóide, como plano nasal ou oral até a corrosão de grande parte da face e tem prognóstico reservado em relação a possibilidade de cura. (MARSDEN, 1986; ASHFORD, 2000; SACKS; KAMHAWI, 2001; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).
- Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD): É uma manifestação infecciosa mais comumente causada pela *L. mexicana* e *L. aethiopica*, caracterizada, em geral, pela ausência de resposta celular específica (anergia) associada à disseminação da infecção. As lesões podem ser disseminadas e, via de regra, não cicatrizam espontaneamente e não costumam responder bem ao

tratamento medicamentoso. São caracterizadas por máculas indolores e grosseiramente desfigurantes (ASHFORD, 2000; DAVID; CRAFT, 2009; READY, 2014).

- Leishmaniose Visceral (LV): Causada no Velho Mundo pela *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* e no Novo Mundo pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MELO, 2004). A LV, quando desenvolvida, leva a sintomas sistêmicos (febre intermitente, anemia, caquexia, linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia, diarreia persistente em humanos) até a morte (ASHFORD, 2000; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Nas Américas, a principal espécie responsável é chamada por muitos autores de *Leishmania chagasi* (MURRAY et al., 2005). Porém, existem contradições taxonômicas em relação à sua denominação e origens. Estudos recentes baseados em biologia celular e molecular sugerem a nomenclatura *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MARCILI et al., 2014).

2.3.1 Leishmaniose Visceral Canina

2.3.1.1 Epidemiologia

Distribuída mundialmente, a LV está presente em países da Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas, sendo que neste último continente, tem denominação de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar neotropical (BRASIL, 2014). Cerca de 90% dos casos de LV estão presentes em cinco países, dentre eles, Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (MODABBER, 2010).

A doença foi relatada em pelo menos doze países da América Latina, onde 90% dos casos ocorrem no Brasil (Figura 2), com maior número de casos na Região Nordeste. A transmissão da doença vem sendo descrita em diversos municípios de todas as regiões do país, menos na Região Sul, e tem apresentado mudanças importantes em seu padrão, sendo inicialmente predominante em ambientes rurais, periurbanas e atualmente em centros urbanos (BRASIL, 2014).

Figura 2 - Distribuição de casos autóctones de leishmaniose visceral americana por município, Brasil - 2012

Fonte: (SINAN, 2015)

Diferenças climáticas e ambientais, o processo migratório intenso (por pressões econômicas ou sociais), a crescente urbanização e consequente adaptação do inseto vetor a essas áreas acarretam a expansão das áreas endêmicas com consequente aparecimento de novos focos (BRASIL, 2014).

2.3.1.2 Transmissão

Dois tipos de LV se diferem em questões epidemiológicas: a leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), que é transmitida do animal para o vetor e deste para o homem, e a Leishmaniose visceral antroponótica (LVA), que é transmitida do homem

para o vetor e deste novamente para o homem. A LVZ envolve a transmissão de *L. infantum*, e a LVA, a transmissão de *L. donovani* (CHAPPUIS et al., 2007).

Por se tratar de uma doença zoonótica, os principais reservatórios no ambiente silvestre são as raposas (*Dusicyon vetulus*, *Lycalopex vetulus* e *Vulpes vulpes*), os marsupiais (*Didelphis albiventris*), o rato preto (*Rattus rattus*), guaxinins (*Nyctereutes procyonoides*), chacais (*Canis aureus*), lobos (*Canis lupus*), fenecos (*Fennecus zerda*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) (ASHFORD, 2000; MODABBER, 2010; TAYLOR; COOP; WALL, 2010). Este tipo de nicho ecológico é raramente visitado pelo homem e a doença ocorre com mais frequência na floresta amazônica ou no sertão do nordeste (COSTA, 2005).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) representa a principal fonte de infecção na área urbana, sendo que a ocorrência nesses animais tem sido mais prevalente do que no homem (ASHFORD, 2000; MELO, 2004; MODABBER, 2010).

2.3.1.3 Sistema imune

Todo ser vivo apresenta mecanismos de defesa contra a ação de diversos agentes presentes no meio ambiente. Nas doenças infecciosas, poucos casos ocorrem devido à ação do micro-organismo. Geralmente, a doença ocorre pela reação do hospedeiro à infecção ou porque o invasor altera o metabolismo do hospedeiro (TIZARD, 2008). Em consequência dessa ação, surgem os sintomas clínicos que representam a exteriorização desses mecanismos defensivos que são de natureza celular ou humoral (MAFFEI, 1978). Sabe-se que maioria dos cães infectados por LV permanecem assintomáticos ou se recuperam espontaneamente os quais os parasitos ficam restritos a pele e linfonodos de drenagem. Em apenas 10%, ocorre a forma clínica da doença (TIZARD, 2008). A presença de anticorpos anti – *Leishmania* em títulos elevados pode ser detectada mesmo após a cura da doença, sugerindo que o parasito esteja presente no hospedeiro mesmo após a cura clínica da leishmaniose (BADARÓ et al., 1985).

A defesa humoral é representada por anticorpos presentes no plasma sanguíneo, produzidos pelo sistema reticulo endotelial (MAFFEI, 1978), porém apesar dessa resposta ser intensa durante a infecção causada pela leishmaniose, os

anticorpos estão relacionados com a não cura da doença e não representam um papel importante na sua proteção (KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Em contrapartida, a resposta celular representa um papel importante na proteção desenvolvida pela moléstia (MAFFEI, 1978; KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

Durante essa resposta imune celular, o processo é dividido em proteção inata, que inclui os macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, e a resposta imune adaptativa, que inclui linfócitos T e B (KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

Os macrófagos desempenham um papel essencial no processo imune. Além de serem células responsáveis por processos como a homeostasia, regulação imunológica e resposta imune imediata, também produzem citocinas pró-inflamatórias para o local primário da infecção ao recrutarem uma grande quantidade de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Os neutrófilos representam uma das primeiras células que são recrutadas e acredita-se que participam na contenção do parasita no início da infecção. Todavia, existem controvérsias afirmando que podem ser veículo da introdução do parasita no sistema imune, de forma silenciosa, tendo um papel de resistência da infecção. (KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

Durante o ciclo de vida, as leishmanias albergam macrófagos teciduais, até serem fagocitadas. Caso consigam alcançar o interior deles, se transformam em amastigotas que se reproduzem por divisão binária simples. Essa reação leva a hipertrofia e hiperplasia do sistema macrofágico mononuclear e a partir de então, os parasitos se difundem e se multiplicam levando ao aumento dos órgãos como fígado e baço e alterações na medula óssea (ZAULI-NASCIMENTO, 2009).

Nos casos crônicos, quando existe a persistência da *Leishmania* nas células, ocorre a formação dos granulomas, que são uma expressão morfológica da reação hiperérgica (reação exacerbada do processo imune). Essa formação se dá a partir do recrutamento de células de Kupffer pelos sinusóides, representadas por uma maior população de fagócitos do fígado e pela presença de granulócitos, macrófagos, linfócitos e células Natural Killer (NK). As células de Kupffer, ao se fundirem, resultam na secreção de quimiocinas que levam ao recrutamento de leucócitos (MAFFEI, 1978; TIZARD, 2008; SILVA, 2010).

Para que a resposta imune seja efetiva, é essencial a formação dessas estruturas granulomatosas que ajudam a coordenar e fornecer fatores de defesa ao hospedeiro. No granuloma, é produzido um ambiente de mecanismos imunes leishmanicidas que inativam os parasitos. Na LV humana, a presença de granulomas

está relacionada com a capacidade de controlar e manter a infecção a um nível subclínico. Em modelos experimentais, eles aumentam massivamente o tamanho no primeiro mês de infecção, e no segundo mês, levam a resolução da infecção e se tornam estéreis. Após esse período, são submetidos a uma fase de involução. A cura estéril nunca é alcançada mas o fígado se torna resistente a reinfecção (SILVA, 2010; KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

O padrão da resposta imune e sinais clínicos dependem de muitas variáveis, dentre elas, o tipo de reação expressada pelo indivíduo, fatores genéticos (KEDZIERSKI et al., 2009), ambientais, nutricionais (MELO, 2004) e também, da espécie de *leishmania* (Santana, 2014).

2.3.1.4 Sinais clínicos

Diversos estudos indicam que grande parte dos cães com anticorpos anti-*Leishmania* são assintomáticos ou subclínicos, embora esses tipos de infecções sejam potencialmente transmissíveis aos flebotomíneos e consequentemente aos homens (BANETH et al., 2008).

A evolução da Leishmaniose Visceral Canina (LVCan) é resultado da interação entre vetor, parasito e hospedeiro. Quando apresentam sinais clínicos, a evolução é lenta e caracteriza-se por ser sistêmica e severa. Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada infectiva, ocasionando a infecção de vísceras e eventualmente disseminando-se através da derme. A alopecia causada pela infecção expõe grandes áreas da pele extensamente parasitados. A forma clássica abrange sintomas como lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em grande parte no espelho nasal e orelhas, pequenas úlceras localizadas nas orelhas, focinho, cauda, articulações e pelo opaco. Nas fases adiantadas, observa-se com grande frequência onicogribose, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, opacificação de córnea, apatia, diarreia, epixtase, edema de membros e vômitos, e na fase final da infecção evoluem para paresia de membros posteriores, nefrite e/ou glomerulonefrite, caquexia levando a inanição e morte do animal (BANETH et al., 2008).

2.3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção canina pode ser baseado em diferentes técnicas, porém, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade. Primeiramente, é imprescindível atenção aos padrões clínicos e epidemiológicos, lembrando-se de que apesar de muitas vezes os sinais clínicos serem silenciosos, os cães são fonte de infecção para os flebotomíneos e consequentemente têm um importante papel na transmissão da doença (MELO, 2004).

O diagnóstico laboratorial da LVCan pode ser obtido usando métodos diretos com a detecção de parasitos e/ou seu DNA, ou ainda, testes indiretos. A escolha do método é dependente de estudos epidemiológicos, confirmação da infecção, controle terapêutico, níveis de sensibilidade e especificidade, custo e facilidade para procedimento (MAIA; CAMPINO, 2008). Dentre eles, o teste parasitológico obtido de material biológico de biópsia (escarificação de pele) e também de punções (hepática, esplênica, de linfonodos ou de medula óssea), são padrão ouro para o diagnóstico da doença em termos de especificidade (PRAJAPATI; MEHROTRA, 2013). Apesar dessa vantagem, esses são métodos invasivos, levando risco para o animal e sua eficiência depende da carga parasitária, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (MELO, 2004). Também tem sido demonstrado que a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método com sensibilidade e especificidade razoável para a detecção de DNA de *Leishmania* em uma variedade de amostras de origem humana, canina e de raposas, quando comparados com métodos diagnósticos convencionais (PONTIN, 2003; MELO, 2004; MAIA; CAMPINO, 2008).

Em relação às provas sorológicas de precisão moderada para avaliação de soroprevalência para inquéritos em saúde pública que são recomendadas pelo Ministério da Saúde, os exames propostos são a imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) que expressam os níveis de anticorpos circulantes (BRASIL, 2014; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015). Todavia, apenas a presença de anticorpos anti-*Leishmania* não é concludente. Portanto, é aconselhável a realização de mais de um teste sorológico visando aumentar sensibilidade e especificidade para a obtenção de um diagnóstico mais preciso de

LCan e a continuidade do acompanhamento dos testes repetidos após 3 meses (MELO, 2004).

Na busca por métodos de diagnósticos não invasivos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, existem pesquisas a partir do uso da saliva ou da urina (PRAJAPATI; MEHROTRA, 2013).

2.3.1.6 Controle

Reavaliar estratégias de controle foi uma necessidade que se tornou evidente nos últimos anos. Visando a racionalização da atuação com base em evidências encontradas na literatura científica, foi proposto um Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) para áreas de risco, aglomerados urbanos ou rurais, tendo como critério a ocorrência de casos humanos, ressaltando-se que as medidas de controle devem estar sempre integradas. Esse programa visa diminuir as taxas de letalidade e o grau de morbidade através do diagnóstico, tratamento precoce de casos humanos e diminuição dos riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e vetores (BRASIL, 2014).

Um dos fatores de risco mais evidentes na transmissão é a exposição ao vetor. O controle está baseado em uso de mosquiteiros e telagem de portas e janelas (ASHFORD, 2000), além do uso de inseticidas no interior das casas e em abrigos de animais e limpeza do ambiente a fim de alterar as condições do meio que agrada o vetor (matéria orgânica). Há trabalhos que relatam que o uso da citronela, tanto em forma de óleo como a planta, pode ser uma opção repelente contra mosquito (BORASCHI; PERRI; NUNES, 2008). Outras opções são uso de coleiras impregnadas com deltametrina, que tem mostrado possuir ação repelente contra os insetos. Entretanto, essas medidas foram muitas vezes descontinuadas, ocorrendo reinfestações dos ambientes e conseqüentemente novos casos humanos e caninos (MELO, 2004; READY, 2013).

A eliminação dos cães infectados tem sido uma das principais intervenções implementadas no Brasil para controlar a LV. A detecção da infecção canina é baseada em testes sorológicos, cuja acurácia não tem sido avaliada de forma sistemática. Em termos de saúde pública, a intervenção tem sido de eficácia

duvidosa e uma revisão crítica leva a possibilidade de que isso pode ser, entre outras razões, devido à precisão insuficiente dos testes sorológicos. A ausência de padrões de referência confiáveis, a possibilidade de infecção através de outros animais além do cão, o longo período entre a realização dos testes e a eliminação, a migração de animais infectados, a incapacidade de distinguir cães positivos de vacinados e a baixa sensibilidade dos testes apresentam desafios para apoiar certas medidas drásticas de controle da LV (MELO, 2004; PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

Além disso, o diagnóstico precoce, o tratamento adequado para os casos humanos, o rastreamento imunológico e acompanhamento do paciente de forma conjunta são fundamentais para a diminuição da incidência da doença. Visto que essas medidas ocorrem de forma isolada, elas acarretam na não efetividade para a diminuição da incidência da doença proposta pelo PCLV (BRASIL, 2014). Sabe-se que em países no sul da Europa, onde a ocorrência da doença é esporádica, a posse de cães não parece estar associada com o maior risco de transmissão da doença para o ser humano (MIRÓ et al., 2008).

2.3.1.7 Tratamento

De acordo com a Portaria Interministerial MAPA/MS 1.426/2008 o tratamento não é permitido por não diminuir a importância do cão como reservatório do parasito (BRASIL, 2014).

Nos países onde é permitido o tratamento canino, observa-se que vários fármacos são capazes de melhorar os sintomas clínicos, contudo, nenhum deles elimina de forma fiável a infecção. Apesar dos esforços para melhorar formulações e propriedades farmacocinéticas, as principais medicações utilizadas para a terapia da doença permaneceram as mesmas. Novos medicamentos foram avaliados para a terapêutica de LVCan, mas foi sugerido que ela fosse realizada em combinação com os medicamentos essenciais ou como uma terapia de segunda linha para os cães que não respondem bem ao principal medicamento (MIRÓ et al., 2008).

A primeira linha de medicamentos é o Antimoniato de Meglumina que inibe seletivamente a glicólise da *Leishmania*. No entanto, é um medicamento de efeitos

indesejáveis comprometendo principalmente o sistema cardiovascular, limitando amplamente a dose do mesmo. Podem também prejudicar o sistema renal e osteoarticular, causar pancreatite, aumento discreto em transaminases, o que pode gerar alterações hepáticas e ainda, alteração do sistema hematopoiético (PONTIN, 2003). Utiliza-se também o Alopurinol que inibe a tradução de proteínas por interferência com a síntese de RNA. Ambos costumam ser usados em combinação (MIRÓ et al., 2008).

Também sendo medicamento de primeira escolha, tem-se a Anfotericina B, que atua através da ligação ao ergosterol na membrana celular do parasito, alterando sua permeabilidade, porém causa nefrotoxicidade e pode comprometer os pacientes que já possuem patologia renal. Entre as drogas de segunda escolha existem as seguintes: Aminosidine, Pentamidina, Metronidazol com enrofloxacin, Metronidazol com espiromicina, Miltefosina com Enrofloxacin (MIRÓ et al., 2008).

Em relação aos medicamentos propostos, nos países que tem permissão, observa-se que o potencial zoonótico de LVCa, a falta da eliminação parasitológica e a resistência do parasito preconizam o uso moderado das medicações, para que a terapia para Leishmaniose humana continue sua eficácia nos seres humanos (MIRÓ et al., 2008).

No âmbito da doença em humanos, a Leishmaniose é uma enfermidade relacionada à pobreza, má nutrição, más condições de moradia e falta de recursos básicos. Grande parte da população acometida não pode arcar com os custos dos atuais tratamentos que ultrapassam uma porcentagem substancial da renda da família e representa significância financeira (KEDZIERSKI et al., 2009).

2.3.1.8 Vacinas

O sucesso para o desenvolvimento de uma vacina depende da compreensão da interação do patógeno com o hospedeiro, seleção do coadjuvante e veículos corretos, além da capacidade de gerar imunidade duradoura (MIRÓ et al., 2008). Nos últimos anos, os esforços na busca de uma vacina têm-se tornado mais intensos pelo fato de ainda não existir uma vacina amplamente eficaz em nível de profilaxia em massa (KEDZIERSKI; EVANS, 2014) e, no caso do cão, pela

possibilidade de prevenção do risco da infecção para os seres humanos (MIRÓ et al., 2008). Para a geração de uma memória imunológica adequada é necessário uma vacinação eficaz (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

Apesar de diferentes espécies causarem diferentes manifestações clínicas, análises genômicas indicam um amplo grau de sequências homólogas entre espécies, sugerindo ser viável a produção de uma vacina eficaz contra diferentes Leishmanioses. No passado, na União Soviética, Oriente Médio e Israel, existiam vacinas que envolviam o parasito vivo. No entanto, elas foram abandonadas por causarem lesões que não cicatrizavam e geravam imunossupressão em alguns pacientes (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

Logo depois, surgiram no Brasil as vacinas feitas de promastigotas mortas, de forma isolada ou em combinação com coadjuvante, e mostraram reduzir a incidência de LC em 18-78%. Porém, infelizmente, os parasitos autoclavados apresentaram um menor período de efetividade e então continuaram as preocupações quanto à dificuldade na produção do produto para adequar as boas normas de fabricação (JÚNIOR, 2013).

Também surgiram vacinas de parasitos irradiados ou atenuados, que são adquiridos de células hospedeiras. Eles permitem uma resposta imune mais duradoura, entretanto, existe a possibilidade de reativação da virulência dos parasitos, tornando essa opção questionável (JÚNIOR, 2013). A eliminação específica de genes de virulência pode ser uma possibilidade mais viável (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

Vacinas produzidas com espécies de *Leishmania* não patogênicas podem estimular a proteção contra a forma virulenta. No entanto, o maior problema do uso de parasitos mortos ou parasitos atenuados são as preocupações relativas à viabilidade e segurança para o uso em larga escala no campo (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

Outra abordagem consiste de uma fração glicoproteica purificada (a fucose-manose-ligand), um antígeno presente na superfície do parasito. Este promove uma proteção e alta imunogenicidade para os cães. A partir dela, surgiu a vacina atualmente comercializada no país, com o nome de Leishmune (MIRÓ et al., 2008).

Também disponível no mercado, a Leish-Tec promove respostas imunocelulares e humorais através de antígeno recombinante associado ao adjuvante saponina. A vantagem desta é que os animais vacinados mantêm

sorologia negativa frente aos testes de rotina, podendo diferenciar animais vacinados de infectados. Porém, a eficácia da vacina em humanos ainda é preliminar (JÚNIOR, 2013).

Finalmente, surgiram vacinas de DNA que estão em desenvolvimento científico. Estas possuem muitas vantagens como baixo custo e eficiente resposta imune (MIRÓ et al., 2008).

Apesar de muitos anos de esforço para identificar antígenos do parasito e os avanços na tecnologia de vacinas, ainda não parece existir uma opção para um programa de eliminação em massa da doença (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito do *A.crudum* em suas diferentes potências CH6, CH12 e CH30 em infecção experimental de macrófagos J774 por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, *in vitro*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a influência da medicação *A. crudum* na curva de crescimento de parasitos de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*;
- Avaliar o potencial citotóxico do medicamento *A. crudum* em promastigotas, através do teste de MTT;
- Avaliação da infectividade após submeter o macrófago ao tratamento homeopático com *A. crudum* em culturas pré tratadas nas diferentes potências;
- Avaliar o potencial das medicações após infectividade, frente ao uso da medicação escolhida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e triplicatas técnicas. Os procedimentos que envolviam cultura celular foram realizados de forma asséptica, em fluxo laminar.

4.1 MEDICAMENTO

A partir do princípio da similitude, o medicamento escolhido foi o *A. crudum*, obtido a partir de Sulfeto de Antimônio (Sb_2S_3) nas potências 6CH, 12CH e 30CH, que obedecendo a escala centesimal hahnemanniana, representam as diluições 1.10^{-12} , 1.10^{-24} e 1.10^{-60} , respectivamente. A partir dessas diluições, ocorreu a impregnação em glóbulos de sacarose. O grupo placebo foi representado apenas pela diluição dos glóbulos sem adição do *A. crudum* e no grupo controle não houve adição dos glóbulos. A técnica utilizada obedece às normas da Farmacopeia Homeopática Brasileira (ANVISA, 2011). Esta medicação foi concedida pela Farmácia Homeopática Bento Mure LTDA ME, que está devidamente em situação ativa pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A apresentação de escolha da droga homeopática, no presente trabalho foi feita sobre a forma de glóbulos de sacarose (BENEZ, 1999), que foram diluídos em 15 mL de água miliq previamente destilada e autoclavada. Essa solução foi filtrada usando sistema Millipore 0,22 mm (Jet Biofil) para a obtenção do líquido mais estéril possível. A partir de então, foi realizada a administração nas culturas conforme será descrito a seguir.

4.2 CULTIVO CELULAR

4.2.1 Parasitos

Para testar a atividade do medicamento contra o crescimento de parasitos do gênero *Leishmania*, foram utilizadas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*)

infantum chagasi obtidos da Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT 153) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (VPS - FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Os parasitos foram isolados em meio bifásico através de punção de linfonodo poplíteo de um cão do município do São Domingos, no Maranhão. Os mesmos foram mantidos em meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI 1640; Vitrocell), acrescido de 10% de soro fetal bovino, mantidos a 27 °C, com repiques semanais. Foram feitas passagens por culturas de macrófagos para que o micro-organismo mantivesse a virulência. Dessa forma, realizou-se a curva de crescimento dos micro-organismos com ou sem o medicamento.

Para avaliar a atividade da droga em infecções de macrófagos por *Leishmania*, foi utilizada a cepa de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) cedida pelo Prof. Dr. Mauro Javier Cortez, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os parasitos foram cultivados em meio 199 (Sigma Aldrich) acrescido de HEPES (40 mM), adenina (0,1mM), biotina (0.1 %), hemina (0,1%), soro fetal bovino 20% inativado (SFB; Cultilab), penicilina/ estreptomicina (1%), L-glutamina (1%) e urina (2%), pH 7.2, mantidas a 25 ° C em estufa para demanda bioquímica de oxigênio (BOD). Foram feitas curvas de crescimento dos parasitos para identificar a sua fase estacionária (rica em formas metacíclicas infectivas) utilizadas nos ensaios. A partir de um inoculo inicial de 1×10^5 parasitos/mL, foram realizadas contagens diárias do número de parasitos ao longo de nove dias. As promastigotas foram fixadas em formalina 4% e a contagem feita em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, no aumento de 200X.

Para realização do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5 – dimetiltiazol- 2- il) – 2,5 difenil- 2 H- tetrazólio; Sigma - Aldrich), foi utilizada a cepa de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), cedida pela Prof^a. Dr^a Silvia Reni Bortolin Uliana, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, cultivada da mesma maneira que o parasito anteriormente citado, porém na ausência de urina.

4.2.2 Macrófagos

Os macrófagos utilizados nos ensaios pertenciam à linhagem J774, pertencentes ao VPS- FMVZ USP. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Vitrocell), pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

4.2.3 Avaliação da atividade de Antimonium Crudum no crescimento de *L. (L.) infatum chagasi*

Promastigotas da cepa CBT 153 foram mantidos em meio RPMI a 27°C, na presença ou não de *A. crudum* em suas diferentes potências (6CH, 12 CH, 30CH e placebo), com concentração final de 1% da solução. Os parasitos foram contados diariamente ao longo de 26 dias, através da microscopia óptica em câmara de Neubauer, sendo fixados com formalina 4% e os resultados expressos em parasitos por mL.

4.2.4 Avaliação da citotoxicidade do Antimonium Crudum em *L. amazonensis* através do teste de MTT

Para quantificação de promastigotas viáveis, após administração das diferentes potências do medicamento, foi realizado o teste de MTT modificado (microteste de MTT) descrito por Zauli (2009). Essa quantificação se dá através da mensuração da clivagem do MTT em formazan insolúvel. A clivagem ocorre apenas por mitocôndria de parasitos vivos (MOSMANN, 1983).

Foram adicionados 2×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por poço (em placas com 96 poços) em 150 µL de meio 199, incubados a 25 °C, com adição da preparação homeopática (1% da do volume total por poço), com as diferentes potências (6CH, 12CH e 30CH) em diferentes diluições seriadas (50,00%,

25,00%, 12,50%, 6,25%, 3,12% e 1,56 %). Para controle positivo foi utilizada Miltefosina 10 mM (Sigma) em concentrações que variam de 200 μ M e 3 μ M. Após 24 horas, foram adicionados 30 μ L de MTT (5 mg/mL - Sigma - Aldrich). A solução foi incubada por 2 horas a 25 °C e a reação foi interrompida, por lise celular, com a adição de 50 μ L de SDS (sulfato de dodecil sódico) 20 %. A absorbância foi medida a 595nm tendo como referência a 690nm em leitor de ELISA (Labsystems; Multiskan EX) e os valores subtraídos. Com esse valor, os resultados são convertidos e expressos como porcentagem de parasitos vivos em relação ao controle não tratado.

4.2.5 Avaliação do tratamento homeopático com *Antimonium crudum* em macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (pós tratados)

Optou-se por utilizar o sexto dia da cultura celular, onde o número de parasitos começa a ascender, conforme a Figura 3.

Figura 3 - Curva de crescimento de promastigotas do isolado MHOM/BR/1972/LD mantidos em estufa a 25 °C em meio 199 com 10% de SFB e 2% de urina masculina estéril

Macrófagos J774 foram mantidos em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. Em cada poço foram adicionados $2,5 \times 10^5$ células, em 500µL de RPMI suplementado com 10% de SFB, mantidos por 12 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ para aderência das células. Posteriormente, as células foram lavadas com meio RPMI para remoção de células não aderidas e mantidas em meio fresco, acrescido de 2% de SFB.

Após 16 horas, do procedimento descrito anteriormente, os macrófagos foram infectados por 2 horas com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) na proporção de 5 parasitos (fase estacionária) por macrófago, em meio RPMI, com ou sem SFB. Foram então realizadas 4 lavagens da cultura, para remoção de parasitos livres e adicionado RPMI sem SFB.

Decorridas mais 24 horas, as células foram tratadas com 1% da solução homeopática, nas diferentes potências e mantidas por 48, 72 e/ou 96 horas após o início da infecção, e então fixadas para imunofluorescência.

Os sobrenadantes das amostras foram armazenados a -20⁰ C para posterior quantificação de óxido nítrico.

4.2.6 Avaliação de macrófagos previamente tratados com Antimonium Crudum e infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (pré-tratados)

Macrófagos J774 foram mantidos em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. Em cada poço foram adicionados $2,5 \times 10^5$ células, em 500µL de RPMI suplementado com 10% de SFB, mantidos por 12 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

Posteriormente, as células foram lavadas com meio RPMI para remoção de células não aderidas e mantidas por mais 4 horas com 500µL do meio, acrescido de 2% de SFB e adicionados 1% da solução de *A. Crudum*, nas potências 6CH, 12CH, 30CH e placebo, anteriormente a infecção.

Após 16 horas, os macrófagos foram infectados como no experimento anterior e mantidos por 48, 72 e/ou 96 horas após a infecção. Então, as lamínulas foram fixadas para a realização da reação de imunofluorescência (Figura 4).

4.2.7 Imunofluorescência

As lamínulas contendo as células fixadas em 4% de paraformaldeído/PBS foram lavadas com PBS e tratadas com 50mM de cloreto de amônia (NH_4Cl) por 15 minutos. Após esse período, as células foram permeabilizadas e bloqueadas com uma solução de saponina (0,1%), albumina de soro bovino (BSA ;0.1 %), azida sódica (0,05%) e PBS. As células foram incubadas com solução de permeabilização e bloqueio na presença de anticorpos primários, anti-*Leishmania* e anti-LAMP1, para a delimitação do parasito e do vacúolo respectivamente, por 2 horas, seguido da incubação com os respectivos anticorpos secundários (Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 488 e Texas Red da Invitrogen, respectivamente) por 1 hora. Os materiais genéticos das células hospedeiras foram marcados com 10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (Sigma) por 1 hora. O número de parasitos intracelulares foi determinado microscopicamente, e expresso em número parasitos/100 macrófagos (A), parasitos/macrófagos infectados (B) e porcentagem de macrófagos infectados (C). As Imagens foram adquiridas em um microscópio de fluorescência DMI6000B/AF6000 (Leica) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX), com o auxílio do programa “Leica AF600” e “Image J”.

Figura 4 - Infecção de macrófagos J774 já plaqueados, com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* diluídos em meios de cultura, em placas de 24 poços com laminulas de 13 mm de diâmetro

Fonte: (SILVA, K. M., 2015)

4.2.8 Análise estatística

Optou-se pelo programa GraphPad Instad. Para comparar as curvas de crescimento das culturas submetidas ao tratamento e as leituras das absorbâncias do teste de MTT, utilizou-se o teste de correlação de Spearman. Para a comparação das medianas das curvas de crescimento dos grupos das diferentes linhagens utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Foram realizadas comparações de Dunn's Multiple e teste de Fisher para comparar os ensaios infectivos ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA MEDICAÇÃO A. CRUDUM EM CULTURA EM PROMASTIGOTAS

A priori, foram utilizados cultivos de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* obtidas da Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos (CBT 153) mantidos em meio RPMI. Desta cultura, realizou-se a comparação entre as curvas de crescimento dos micro-organismos, analisando a contagem de parasitos vivos por 26 dias consecutivos com ou sem a presença de 1% da solução de *A. crudum* em cada ensaio. O medicamento foi adicionado às culturas nas potências 6CH, 12 CH e 30 CH. Utilizando o teste de correlação de Spearman- no qual (r) é coeficiente de correlação não paramétrico, obteve-se as seguintes correlações: controle/placebo (r)= 0,9542 (Figura 5); controle/CH6 (r)= 0,9056 (Figura 6); controle/CH12 (r)= 0,9539 (Figura 7) ; controle/CH30 (r)= 0,8722 (Figura 8); placebo/CH6 (r)= 0,9199 (Figura 9); placebo/CH12(r)= 0,9605 (Figura 10); placebo/CH30(r)= 0,8302 (Figura 11); CH6/CH12(r)= 0,9126 (Figura 12); CH6/CH30 (r)= 0,7847 (Figura 13); CH12/CH30 (r)= 0,8403 (Figura 14). Estes resultados demonstram que as curvas de crescimento dos parasitos não apresentam diferença estatística entre os grupos controle, placebo, CH6, CH12 e CH30 com $P < 0,001$.

Figura 5 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo controle e placebo de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 6 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo controle e tratamento com CH6 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 7 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo controle e tratamento com CH12 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 8 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo controle e tratamento com CH30 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 9 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo placebo e tratamento com CH6 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 10 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo placebo e tratamento com CH12 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 11 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo placebo e tratamento com CH30 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas.

Figura 12 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo tratado com CH6 e CH12 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 13 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo tratado com CH6 e CH30 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Figura 14 - Comparação entre curvas de crescimento do grupo tratado com CH12 e CH30 de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) cultivadas em meio RPMI (vitrocell), mantidas em estufa a 28 °C com realização de contagens seriadas

Pela baixa taxa de crescimento de parasitos CBT e dificuldade de observação de infecção em macrófagos J774, optou-se por testar a cepa de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD). Para a comparação das medianas das curvas de crescimento dos grupos nas diferentes linhagens, utilizou-se o teste de Mann-Whitney (GraphPad- Instat). A mediana do número de parasitos

foi de $36,3 \times 10^6$ ($0,49 \times 10^6 - 74,1 \times 10^6$) e $0,55 \times 10^6$ ($0,1 \times 10^6 - 0,9 \times 10^6$), $P = 0,0012$, para as cepas MHOM/BR/1972/LD e CBT 153 respectivamente. Devido à mediana mais elevada da MHOM/BR/1972/LD, optou-se por utilizar essa cultura para os ensaios de infecção. Essa curva também permitiu identificar o período da fase estacionária em que o parasito é mais longilíneo e seu flagelo mais comprido, ideal para infecção celular. A Figura 15 permite visualizar o platô de estacionamento do crescimento celular no sexto dia de cultura, bem como a comparação entre ambas as curvas.

Figura 15 - Comparação entre curvas de crescimento da *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* (CBT 153) e cepas MHOM/BR/1972/LD

Os macrófagos utilizados nos ensaios que pertenciam à linhagem J774 são de fácil manipulação e de possível replicação, permitindo a não utilização da experimentação animal. Por não se obter resultados favoráveis na visualização de amastigotas com coloração de Giemsa ou panótico rápido, optou-se pela imunofluorescência, onde foi possível observar as amastigotas no interior do macrófago, mostrando ser uma linhagem eficiente para a representação de ensaios de infecção.

Para avaliação do efeito do *A. crudum* sobre a viabilidade de promastigotas, foi realizado um ensaio de redução do brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio mensura a atividade mitocondrial de células

viáveis, sendo sensível para estimar a atividade celular (MOSMANN, 1983). Embora o objetivo da homeopatia seja estimular o sistema imune do hospedeiro para que desta forma haja proteção contra o agente agressor, o teste de MTT se faz necessário para investigar a toxicidade da medicação utilizada em culturas de *Leishmania*.

Assumindo que o controle representa 100% de células viáveis ao comparar-se com as outras potências do medicamento, a miltefosina e o placebo, através do teste de Spearman ($P < 0,05$), obteve-se que a relação entre placebo e CH6 foi de $(r) = 0,9048$, placebo e CH12 $(r) = 0,9762$, placebo e CH30 $(r) = 0,7381$, CH6 e CH12 $(r) = 0,8571$, CH6 e CH30 $(r) = 0,5952$ e CH12 e CH30 $(r) = 0,7619$. Já a relação entre placebo e miltefosina foi de $(r) = -0,04762$, CH6 e miltefosina $(r) = 0,09524$, CH12 e miltefosina $(r) = 0,09524$ e CH30 e miltefosina $(r) = -0,2857$. Como a curva de crescimento das formas promastigotas entre Placebo, CH6, CH12 e CH30 apresentaram correlação elevada conforme dados anteriormente citados pela correlação de Spearman, o que significa que as curvas seguiram o mesmo padrão de crescimento. Por outro lado, quando se comparou a curva de crescimento do placebo, CH6, CH12 e CH30 com a miltefosina, verificou-se que a correlação foi muito baixa e portanto não seguiram o mesmo padrão. Desta forma, pode-se concluir que a medicação homeopática não apresentou efeito letal nas formas promastigotas (Figura 16).

Figura 16 – Comparação entre médias das densidades ópticas dos grupos placebo, CH6, CH12, CH30 e miltefosina no microteste de MTT em culturas de promastigotas de *Leishmania Amazonensis* *in vitro*

5.2 EFEITO DA MEDICAÇÃO ANTIMONIUM CRUDUM NO PRÉ E PÓS TRATAMENTO AO INFECTAR MACRÓFAGOS J774

Após avaliar o efeito do *A. crudum* sobre a viabilidade celular, objetivou-se investigar o papel do medicamento na infecção das leishmanias nos macrófagos antes e após a infecção.

O diamidino fenilindol (DAPI) é um marcador que se liga às regiões do DNA ricas em adenosina e timina presentes no núcleo (MORIKAWA; YANAGIDA, 1981). Desta maneira, pode-se realizar a contagem do número de macrófagos (Figura 17 A). As formas amastigotas foram contadas pela marcação do anticorpo Alexa Fluor

(Figura 17 B) e os ensaios representados por: parasitas/100 células, parasitas/ 100 células infectadas e porcentagem de macrófagos infectados. O vacúolo da célula foi delimitado pelo anticorpo secundário Texas-Red (Figura 17 C). Para facilitar a observação, faz-se um *merge* das imagens (Figura 17 D).

Figura 17 - Imagens de células incubadas com solução de permeabilização e bloqueio, obtidas de microscópio de fluorescência DMI6000B/AF6000 (Leica) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX). A) Os Núcleos de macrófagos J774 marcados com DAPI (Sigma). B) Essas células foram infectadas com *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* submetidas a anticorpos anti-*Leishmania* e Alexa Fluor 488 C) e posteriormente marcadas com anticorpo primário anti-LAMP1 e Texas Red (Invitrogen) para delimitação de seus vacúolos. D) Realizado *merge* das imagens através do programa “Leica AF600” e “Image J”

Fonte: (SILVA, K. M., 2015)

A critério de identificação, o “Experimento I” identifica os ensaios onde as medicações foram administradas após a infecção e mantidas por 72 horas; o

“Experimento II” representa experimentos onde as medicações foram administradas também após a infecção e mantidas por 72 horas, porém foi adicionando um novo ensaio para testar a potência CH12, por notar-se a importância de uma potência intermediária para avaliação. No “Experimento III72POS”, os ensaios foram realizados da mesma forma que os anteriormente citados; no “Experimento III48POS”, após a infecção dos macrófagos, foram realizados os tratamentos e mantidos por 48 horas.

Considerando CT (controle), PL (placebo) e CH6, CH12 e CH30 (potências), observou-se que em 86% das análises o CT é estatisticamente semelhante ao PL ($P < 0,0001$).

Como se pode observar na Tabela 1, no “Experimento I”, com CH30 obtiveram-se valores superiores em comparação a CT e PL, em relação a A (parasitos/100 células), B (parasitos/100 células infectadas) e C (percentual de células infectadas), mostrando um maior poder fagocítico dos macrófagos, além de um maior número de células infectadas. Já no “Experimento II”, a potência CH12 apresentou destaque e mostrou-se maior que o controle em relação a A e C, e maior que CH6 em B. No “Experimento III72POS”, a potência CH12 também teve valores superiores a CT e PL em A, B e C, mostrando parasitos conspícuos na contagem celular.

No “Experimento III48POS”, verifica-se que os tratamentos com CH6, 12 ou 30 apresentaram valores superiores que CT e PL (em A e C). Além disso, observou-se que o grupo tratado com CH6, além de ser superior a CT e PL (em A e C), também foi superior aos grupos PL, CH12 e CH30 em relação a B. Tal observação mostrou que em geral, as diferentes potências causaram um estímulo de maior relevância na fagocitose dos macrófagos.

Tabela 1 - Média dos valores representados dos ensaios de amastigotas intracelulares realizados *in vitro* para acesso ao efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em cultura de macrófagos infectados

		Controle	Placebo	CH6	CH12	CH30
parasitas/ 100 células (A)	Exp. I	38,8 ± 3,9	28,5 ± 4,0	50,2 ± 22,4	.	72,2 ± 3,1 *
	Exp. II	36,4 ± 2,1	47,7 ± 12,1	46,9 ± 2,8	54,2 ± 12,7 *	45,1 ± 14,6
	Exp. III72POS	58,5 ± 2,7	69,7 ± 8,2	89,5 ± 7,1	96,3 ± 8,7 *	75,9 ± 12,8 *
	Exp. III48POS	54,2 ± 12,1	53,0 ± 6,3	104,4 ± 17,4 *	95,9 ± 5,2 *	91,2 ± 16,7 *
parasitas/ 100 células infectadas (B)	Exp. I	181,8 ± 10,7	164,4 ± 39,8	173,9 ± 11,0	.	210,3 ± 2,6 *
	Exp. II	127,5 ± 2,5	134,4 ± 17,1	132,3 ± 10,5	137,5 ± 14,8	127,3 ± 40,7
	Exp. III72POS	129,2 ± 18,3	126,8 ± 10,9	172,2 ± 15,7 *	163,2 ± 9,5 *	136,1 ± 132,2
	Exp. III48POS	164,1 ± 21,6	133,0 ± 17,8 *	170,0 ± 18,9	151,6 ± 21,4	143,2 ± 9,6
% de células infectadas (C)	Exp. I	21,3 ± 0,9	18,2 ± 6,8	28,5 ± 11,1	.	34,3 ± 1,9 *
	Exp. II	28,6 ± 1,8	35,3 ± 6,7	38,2 ± 3,8 *	40,0 ± 11,0 *	35,9 ± 9,1
	Exp. III72POS	45,7 ± 4,6	54,8 ± 2,1	52,4 ± 7,6 *	58,9 ± 1,9 *	56,0 ± 9,7 *
	Exp. III48POS	33 ± 6,3	40,1 ± 4,2	61,3 ± 6,3 *	64,0 ± 8,4 *	63,4 ± 8,1 *

Notas: Exp. I – Ensaios onde as medicações foram administradas após a infecção e mantidas por 72 horas; Exp. II – Ensaios onde as medicações foram administradas após a infecção e mantidas por 72 horas, porém, foi adicionado um novo ensaio para testar a potência CH12; Exp. III72POS – Ensaios tratados após infecção, mantidos por 72 horas de incubação e testadas as 3 potências do medicamento; Exp. III48POS – Nesses ensaios, após a infecção dos macrófagos, foram realizados os diferentes tratamentos e em seguida mantidos por 48 horas.

*diferenças estatísticas em relação ao controle

Contagem celular: A - macrófagos/100 células, B - macrófagos/ 100 células infectadas e C - porcentagem de macrófagos infectados.

A fim de comparar as potências relativas à administração do medicamento para terapêutica ou para profilaxia, realizaram-se comparações entre os seguintes ensaios:

- “Experimento III 48 POS”- ensaios nos quais as medicações foram administradas após a infecção (como forma de tratamento) e mantidas por 48 horas;
- “Experimento III 48 PRE” - ensaios onde as medicações foram administradas anteriormente à infecção (de forma profilática) e mantidas por 48 horas;
- “Experimento. III 72 POS” - ensaios realizados com 72 horas de incubação, com tratamento realizado após infecção;
- “Experimento 72 PRE” - ensaios onde as medicações foram administradas anteriormente à infecção (de forma profilática) e mantidas por 72 horas.

A partir dessa identificação, pode-se observar na tabela 2 que em relação a A e B, CH6 e CH12 tiveram maior taxa de fagócitos em relação ao controle nos ensaios expostos ao *A. crudum* após a infecção do que os previamente tratados em 72 horas de incubação. Referente à potência CH30 nos experimentos com 72 horas, houve um aumento significativo de fagocitose em relação a A e C, evidenciando maior porcentagem de células infectadas nos ensaios tratados profilaticamente.

Tabela 2 – Porcentagem de variação da infectividade *in vitro* de macrófagos por amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em relação ao controle. O ensaio submetidos ao pré e pós-tratamento com *A. crudum*

		CH6	CH12	CH30
parasitas/ 100 células (A)	Exp. III 48 POS	92,6	76,9 *	68,3
	Exp. III 48 PRE	94,8	41,9 **	63,8
	Exp. III 72 POS	53*	64,6 *	29,8 **
	Exp. III 72 PRE	12,5**	24,8 **	97,1 *
parasitas/ 100 células infectadas (B)	Exp. III 48 POS	3,6	-0,1 *	-12,7
	Exp. III 48 PRE	6,7	-21,3**	-8,3
	Exp. III 72 POS	33,3*	26,3*	5,4
	Exp. III 72 PRE	-2,4**	10**	13,4
% de células infectadas (C)	Exp. III 48 POS	85,8	93,9	92,1
	Exp. III 48 PRE	84,6	76,1	77,6
	Exp. III 72 POS	14,7	28,9	22,5**
	Exp. III 72 PRE	14,9	11,6	70,5*

Notas: Os valores negativos indicam que os grupos tiveram uma menor taxa de fagocitose que o grupo controle; A - Número de leishmanias a cada 100 macrófagos; B - Número de leishmanias a cada 100 macrófagos infectados; C- Porcentagem de macrófagos infectados; “Exp. III 48 POS”- ensaios onde as medicações foram administradas após a infecção (como forma de tratamento) e mantidas por 48 horas; “Exp. III 48 PRE” - ensaio onde as medicações foram administradas anteriormente à infecção (de forma profilática) e mantidas por 48

horas; “Exp. III 72 POS” - ensaios realizados com 72 horas de incubação, com tratamento feito após infecção; “Exp. 72 PRE” - ensaios cuja infecção ocorreu antes do tratamento e incubou-se por 72 horas.

* valor significativamente maior que ** ($P < 0,001$)

6 DISCUSSÃO

Apesar de serem efetivas, as terapias convencionais para infecções causadas por vírus, protozoários e fungos, ocasionam efeitos adversos, podem gerar resistência e possuem um custo elevado, por isso, salienta-se a necessidade da busca de outros tratamentos e vacinas (GIL et al., 2008). Associado a isto, foi aprovada no Brasil a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) em consonância com as recomendações da OMS, contemplando serviços como a homeopatia, uma das práticas complementares mais utilizadas no mundo, o que representa um grande avanço para nosso país (BRASIL, 2012).

No que tange a homeopatia, o tratamento é fundamentado em medicações escolhidas a partir do princípio da similitude (*similia similibus curentur*), onde os homeopatas as selecionam de acordo com os sintomas de determinada doença (ANVISA, 2011). Foi realizada ampla revisão abordando o efeito de medicamentos homeopáticos num período de 1832 a 2009, na qual concluiu-se que a pesquisa básica em linhagens celulares infectadas *in vitro* é uma ferramenta valiosa e efetiva para esse desígnio (CLAUSEN; VAN WIJK; ALBRECHT, 2010). Além disso, um dos resultados mais bem avaliados nessa revisão foi o tratamento de LC, com redução significativa de 90% do diâmetro das lesões de cobaias infectadas (PONTIN et al., 2008; CLAUSEN; VAN WIJK; ALBRECHT, 2010).

Na presente pesquisa, ao compararem-se as curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CBT 153) sob efeito das diferentes potencias do medicamento testado e de placebo, não se observou diferença estatística, mostrando que o medicamento não evidenciou influência no crescimento dos parasitos. Apesar dos estudos de medicamentos alopáticos visarem pela busca de substâncias que ajam diretamente contra o protozoário para controle das infecções (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010), os ensaios realizados com homeopatia sugerem que os efeitos se dão mais precisamente no sistema imune e não diretamente no agente etiológico (PEREIRA et al., 2005; CARILLO JÚNIOR, 2008; SIQUEIRA et al., 2013).

Em relação ao período de infecção das células, Zakai e Bates (1998) mostraram que culturas de *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* e *L.*

mexicana apresentam maior quantidade de promastigotas metacíclicas infectantes na fase estacionária. Essa fase é alcançada normalmente entre o sexto e o oitavo dia da cultura. No presente ensaio, observou-se que a fase estacionária foi alcançada no sexto dia da cultura de promastigotas, portanto, utilizou-se essa data para infecção dos macrófagos J774.

Culturas de amastigotas de *Leishmania in vitro* são excelentes modelos de infecção, permitindo diversos tipos de estudos que mimetizam mecanismos infectivos do parasito (BATES et al., 1992) e estudos realizados com macrófagos são necessários, uma vez que esses constituem um dos principais componentes do sistema imune, representando uma das primeiras células a serem ativadas (FORMAN; TORRES, 2001). Eles participam de uma intensa mobilização, ativação e regulação do sistema imunológico e suas próprias propriedades são moduladas principalmente através da secreção de citocinas (HANADA; YOSHIMURA, 2002). Bello (2005), Borges (2012) e Corral-caridad (2012) utilizaram células J774 na infecção celular, obtendo êxito na visualização das formas amastigotas de *L. infantum*. Desta forma, considera-se que a utilização de células J774 foi eficiente para se realizar testes *in vitro* com promastigotas de *Leishmania*.

Os resultados do presente estudo mostraram que as diferentes potências em diluições seriadas não tiveram efeito tóxico sobre os protozoários, visto que a viabilidade celular se manteve semelhante ao grupo controle através do teste de MTT. Desta forma, não foi possível o cálculo de IC50 (dose letal para 50% da população de parasitos). Tal fato pode ser justificado pois a homeopatia, em geral, não tem esse efeito citotóxico como já mencionado anteriormente.

A utilização de outra espécie de promastigotas de *Leishmania* no teste de MTT se justifica, além de razões circunstanciais, pelas formas dos parasitos em fase de promastigota de todas as espécies serem morfologicamente similares (ASHFORD, 2000). Apesar disso, o teste de MTT é muito utilizado na rotina para teste de drogas alopáticas por ser economicamente viável e rápido (ZAULI-NASCIMENTO, 2009).

Apesar de algumas culturas associarem a homeopatia ao placebo, os resultados mostram que o grupo controle foi semelhante ao grupo placebo de forma extremamente significativa, deixando evidente que os glóbulos de açúcar sem impregnação da medicação homeopática *A. crudum* não possuíram efeito algum sobre a infecção das células, diferentemente do tratamento com as potências CH6,

CH12 e CH30. Estudos rigorosos evidenciam diferenças significativas entre homeopatia e placebo, o que reforça os ensinamentos de Hahnemann (VICKERS; ZOLLMAN, 1999; MATHIE, 2003).

Em relação aos ensaios infectivos, de forma geral, houve um aumento representativo do poder fagocítico das células tratadas com a medicação *A. crudum* diluída nas culturas e mantidas 72 horas infectando. Além disso, a potência CH12 apresentou um efeito fagocitário superior a outras potências. Já no tratamento realizado com 48 horas, observa-se que a potência CH6 teve um resultado mais relevante em relação ao número de parasitos por células infectadas.

A formação de granulomas na LV é descrita tanto em humanos quanto em cães infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (SANCHEZ et al., 2004; KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Estes se constituem basicamente por macrófagos, células epitelióides, linfócitos, e poucos neutrófilos e granulócitos. Em fase inicial, como na primeira semana, existe uma maior quantidade de macrófagos parasitados. Na segunda semana, formam-se células epitelióides (macrófagos em fusão) e nódulos maduros. Da quarta semana em diante, a tendência é o amadurecimento dos macrófagos com diminuição do parasitismo e deposição de colágeno (SILVA, 2010). Já se sabe que para uma resposta imune efetiva na LV, é essencial a formação dessas estruturas granulomatosas, as quais tem a função de coordenar e liberar células e fatores de defesa do hospedeiro para os tecidos infectados. Apesar de não ser possível alcançar uma cura estéril, o fígado se torna resistente à reinfecção mesmo albergando uma maior quantidade de parasitos (KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

Nos resultados apresentados, observou-se, em geral, maior porcentagem de macrófagos infectados, assim como maior taxa de fagocitose nos grupos tratados com *A. crudum*, o que sugere uma maior atividade dos mesmos. Em um organismo vivo, essa reação pode levar à formação do granuloma de forma mais intensa, o que promoverá uma resposta imune secundária mais representativa e como consequência a destruição ou fixação do antígeno.

Segundo Siqueira et al. (2013), este estímulo homeopático, também chamado de efeito primário do medicamento homeopático, é capaz de induzir uma resposta secundária no organismo estimulado, que leva a uma alteração nos seus parâmetros metabólicos ativando as células de defesa. Ademais, sabe-se que macrófagos não

ativados, no caso da LC, não entram em estado parasiticida e não eliminam a infecção (BRASIL, 2007).

Alguns trabalhos *in vitro* mostraram que medicações alopáticas ou homeopáticas diminuem a infectividade de *Leishmania* nos macrófagos, ou ainda, podem inibir a proliferação dos parasitos (PEREIRA et al., 2005; CORRAL-CARIDAD et al., 2012), defendendo a ideia de que esse efeito é uma forma do organismo driblar a infecção.

Contudo, outros autores tiveram resultados que se correlacionam com os apresentados. Por exemplo, na análise estatística de Borges (2012), as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG (sistemas vesiculares em que a substância é confinada em uma cavidade preenchida com óleo ou emulsão e rodeada por uma membrana polimérica), promoveram o aumento do número de macrófagos infectados com *L. infantum* e de amastigotas por macrófago infectado na presença de estímulo e de soro de BALB/c. Além disso, os experimentos de pré-tratamento das células J774 com as nanocápsulas mostraram que essas apresentaram a capacidade de promover alteração na sua resposta imune frente a um determinado estímulo.

Mais que isso, Silva (2010), observou em seu experimento de infecção com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em camundongos, que as fêmeas do grupo que não tiveram taxa de óbito após medicadas com soluções homeopáticas ultra-diluídas, tiveram um aumento significativo do número de amastigotas no baço em relação aos controles. Em outra pesquisa, os indivíduos que apresentaram cura espontânea das lesões cutâneas, mostraram resposta mais intensa do que os indivíduos com lesões clinicamente ativas, sugerindo que esta resposta poderia estar relacionada ao sistema imunológico do indivíduo no que se refere ao controle da patologia (CARVALHO et al., 1985).

Análises estatísticas demonstraram que uma maior taxa de endocitose em células tratadas com a medicação homeopática Canova, infectadas por *Saccharomyces cerevisiae* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* geraram espalhamento de macrófagos nesses grupos, sugerindo que esses parâmetros indicam ativação dos macrófagos por essa medicação (LOPES et al., 2006).

Apesar da efetividade dessa resposta granulomatosa, a resolução da doença auxiliada ou não pelo tratamento dependerá da ação imunológica para controlar o crescimento e manutenção do parasito (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Numa etapa inicial, uma maior taxa de fagocitose de parasitos pelo macrófago pode estimular liberação de fatores quimiotáticos. Tal estímulo leva a um recrutamento de mais macrófagos, alcançando-se uma resposta imune secundária mais eficiente (UENO; WILSON, 2012; KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Partindo desse pressuposto, com respaldo nos resultados de que as potências mais baixas, CH6 e CH12 parecem ter maior eficiência quando a infecção já está instalada e a potência CH30 parece ter uma maior significância na profilaxia da infecção, pode-se verificar a algumas hipóteses – os resultados são consoantes aos conceitos de Hahnemann, onde as potências mais baixas são utilizadas como tratamento de doenças agudas logo no princípio da infecção. Já as potências mais altas são indicadas como profilaxia das doenças epidêmicas (BENITES, 2006).

Segundo Teixeira (2010), mesmo utilizando uma abordagem integrativa no diagnóstico e tratamento de enfermidades, a homeopatia pode agir de forma preventiva em doenças agudas e crônicas. A função do medicamento é estimular a reação homeostática do organismo contra idiossincrasias (reação individual própria e típica de cada pessoa) que predispõe a doença. No caso das doenças epidêmicas, o medicamento de escolha deve apresentar semelhança com os conjuntos de sintomas dos pacientes acometidos pelos diferentes estágios ou fases de cada surto epidêmico. Segundo os conceitos de Hahnemann, o medicamento deve ser utilizado de forma isolada e nunca em forma de complexos homeopáticos. Além disso, a profilaxia e/ou terapêutica em larga escala devem ser acompanhadas através de estudos experimentais e observacionais delineados, para que os resultados possam ser avaliados segundo as premissas da epidemiologia clínica, evitando vieses e o acaso que contaminam resultados isolados.

Portanto, podem ser administradas antes (profilaticamente) ou após (tratamento) a infecção. Entretanto, ressalta-se a importância da resposta do organismo do animal sustentada pela energia vital no tratamento e profilaxia homeopáticos, no que se refere à capacidade de curar ou amenizar a sintomatologia clínica das doenças.

Obviamente, a ausência de todos os componentes do sistema imune em células isoladas interfere nas hipóteses de que a ação específica da homeopatia se baseia na interação de preparações homeopáticas e no sistema imune, contudo, essa transferibilidade dos resultados *in vitro* para os organismos intactos também ocorre com medicamentos alopáticos (CLAUSEN; VAN WIJK; ALBRECHT, 2010).

Esses dados sugerem também que as diferentes potências dos medicamentos homeopáticos possuem diferentes efeitos na cultura celular, assim como experimentos realizados por Ive (2012) com *Arsenicum album* administrado em cultura de leucócitos com diferentes potências. Também, experimentos de quantificação de citocinas utilizando culturas de macrófagos demonstraram que *Mercurius solubilis* induziram a produção de IFN γ em diluições mais baixas (6 e 12 CH), embora em altas potências (200 CH) o tratamento tenha estimulado a produção de IL-4.

A homeopatia relaciona a dinamização do princípio ativo da medicação na solução com a potência do medicamento, quando o processo envolve diluição e sucussão. A diluição altera comprimentos de onda, aumentando a penetração da mesma, através de um efeito de tunelamento. Por sua vez, a sucussão é um mecanismo para a manutenção da homogeneidade da solução, o que significa que a mecânica quântica é influente nesse processo. Experimentalmente, sabe-se que, caso esse processo seja negligenciado, o medicamento não apresenta sua funcionalidade habitual ou completa. A conversão do potencial de energia em energia cinética, com a sua consequente liberação de calor para o ambiente, reduz o nível de liberdade do sistema de solvente/soluto. Consequentemente, a mistura tende a compensar a perda de calor para o ambiente através de alterações estruturais internas (RONALD et al., 2006). Há um modelo mecânico quântico que propõe que a reprodutibilidade ocorre através de semelhanças de campo (funções de onda), muito semelhante ao que acontece entre medicamentos ultradiluídos e pacientes homeopatizados. Esse modelo também explica a razão pela qual algumas dinamizações de princípios ativos diferentes são mais eficazes do que outros. Um aspecto intrigante da funcionalidade da homeopatia é a ressonância (aumento da amplitude devido a excitações de energia) de regiões (RONALD et al., 2006).

Entretanto, pode o efeito da homeopatia se basear apenas em biologia molecular? Evidentemente não. O que se deve ter claro é que a homeopatia transcende esses aspectos para justificar sua existência e entra no contexto multidisciplinar, envolvendo, física quântica, filosofia, história, biologia molecular e experimental. Baseados nessas considerações, o medicamento não foi capaz de agir diretamente sobre os protozoários, em contrapartida, suscitou efeitos importantes nos macrófagos em questão, que podem estar relacionados a

mecanismos de defesa do organismo. Evidencia-se que os resultados a respeito do *A. crudum* para tratamento e profilaxia de LVCan tenham um futuro promissor.

Logo, ressalta-se a importância de uma análise da constituição geral do animal, sustentada pela energia vital. Além disso, é indispensável avaliar a predisposição e o metabolismo do organismo, no que se refere à capacidade de curar ou amenizar a sintomatologia clínica das doenças, bem como uma maior quantidade e qualidade de estudos para maior compreensão do efeito dos medicamentos homeopáticos em cultura celular.

7 CONCLUSÕES

Ao compararem-se as curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* para observar o comportamento quantitativo e realizar o teste de MTT sob o efeito das diferentes potências (CH6, CH12 e CH30), não houve diferença em relação ao grupo controle. A utilização de células J774 foi eficiente para a realização de testes *in vitro* com promastigotas de *Leishmania*. Nos resultados apresentados, também foi observado que em geral, houve uma maior porcentagem de macrófagos infectados, assim como uma maior taxa de fagocitose nos grupos tratados com *A. crudum*, o que sugere uma maior atividade dos mesmos frente à invasão do parasito numa perspectiva mais ampla. Estudos *in vivo* devem ser realizados para se observar como esses estímulos seriam alterados pelo organismo e levar a promoção de uma resposta imune secundária mais representativa como consequência de uma reação modificada (granuloma).

O *A. crudum* na potência CH30 tem resultados mais satisfatórios se administrada profilaticamente, e para terapêutica, a potência CH6 ou CH12 tem um efeito mais significativo por aumentar o poder fagocítico do macrófago em até 72 horas.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, M. D. L. Á.; ARRIVILLAGA, J. Eco-epidemiología de Bunyaviridae. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 48, n. 1, p. 3–16, 2008.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. **Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.
- ANVISA. **Farmacopeia homeopática brasileira**. 3. ed. Brasília - DF: ANVISA, 2011.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269–1281, 2000.
- BADARÓ, R.; CARVALHO, E. M.; LA, M. de; ORGE, G.; TEIXEIRA, R. S. Imunidade humoral e celular em indivíduos curados de leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 2, p. 77–83, 1985.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGOS, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–30, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514028>>. Acesso em: 15 dez. 2015.
- BASTOS, T. S. A. **Estudos introdutórios sobre flebotomíneos**. [s.l: s.n.].
- BATES, P. A.; ROBERTSON, C. D.; TETLEY, L.; COOMBS, G. H. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. **Parasitology**, v. 105, p. 193–202, 1992.
- BELLO, F. J.; MEJÍA, A. J.; DEL PILAR CORENA, M.; AYALA, M.; SARMIENTO, L.; ZUÑIGA, C.; PALAU, M. T. Experimental infection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 518–525, 2005.
- BENEZ, S. M. **Homeopatia 100 segredos aos que tratam**. São Paulo: Robe Editorial, 1999.
- BENITES, N. R. Homeopatia. In: SPINOSA, H. DE S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. [s.l: s.n.].p. 827–832.
- BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, 2008.
- BORASCHI, C. S. e S.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Leishmaniose Visceral: O que a população de Três Lagoas, MS, Brasil, sabe sobre esta enfermidade. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 478–485, 2008.
- BORGES, J. R. **Avaliação da atividade de nanocápsulas com diferentes**

características superficiais sobre a resposta imune de células j774 . a1 e sobre a infecção por leishmania infantum. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

BOWMAN, D. D. Protozoários. In: BOWMAN, D. D. (Ed.). **Georgis - Parasitologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 81– 106.

BRASIL. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. [s.l: s.n.]

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. [s.l: s.n.]

BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica/ministério da saúde**. [s.l: s.n.]

BRASIL. **Leishmaniose visceral**. [s.l: s.n.]

CAMPOS, J. H. F.; COSTA, F. A. L. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina Piauí, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 297–300, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84905180364&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

CARILLO JÚNIOR, R. **O milagre da imperfeição**. São Paulo: Cultrix, 2008.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARDEN, P. D.; COSTA, J. L. M.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 135, p. 4144– 4148, 1985.

CASTRO, D.; NOGUEIRA, G. W. G. Uso do nosódio Meningococcinum como preventivo contra a meningite meningocócica. **Homeopatia e Profilaxia**, 1980.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007.

CLAUSEN, J.; VAN WIJK, R.; ALBRECHT, H. Infection models in basic research on homeopathy. **Homeopathy**, v. 99, p. 263–270, 2010.

CORRAL-CARIDAD, M. J.; MORENO, I.; TORAÑO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; ALUNDA, J. M. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 475–482, 2012.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. Similia Similibus Curentur: notação histórica da medicina homeopática. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 347–351, 1997.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3–17, 2005.

CRUZ, I.; MORALES, M. a; NOGUER, I.; ALVAR, J. *Leishmania* in discarded

syringes from intravenous drug users HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. **The Lancet**, v. 359, p. 1124–1125, 2002.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491–502, 2009.

DESJEUX, P. Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. **Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales**, v. 45, p. 267–275, 1992.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

FILHO, A. R. **Homeopatia**. Disponível em: <<http://www.amhb.org.br/conteudo/206/157/institucional.html>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4-5, p. 189–216, 2001.

FRENKEL, M.; MISHRA, B. M.; SEN, S.; YANG, P.; PAWLUS, A.; VENCE, L.; LEBLANC, A.; COHEN, L.; BANERJO, P.; BANERJI; PRASANTA. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 37, n. 5, p. 1261–1269, 2010.

GEORGE, C. L. Intravenous injections of Antimonium. **The British Medical Journal**, p. 702–704, 1919.

GIBSON, D. M. Antimonium tartaricum, a study. **British Homoeopathic Journal**, v. 54, p. 270–273, 1965.

GIBSON, D. M. Antimonium crudum, a study. **British Homoeopathic Journal**, v. 58, p. 261–264, 1969.

GIL, E. D. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 223–230, 2008.

GRISWOLD, D. M. Food poisoning; a review of thirty-four outbreaks. **American journal of public health and the nation's health**, v. 40, n. 11, p. 1398–1401, 1950. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1528998&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 413–421, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610102000266>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

IVE, E. C.; COUCHMAN, I. M. S.; REDDY, L. Therapeutic Effect of Arsenicum album on Leukocytes. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 3, p. 3979–87, 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3317753&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

JÚNIOR, E. G. Vacinas Contra Leishmaniose : Uma Revisão. v. 2, p. 18–28, 2013.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, p. 1–19, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075460>>. Acesso em: 12 jul. 2014.

KEDZIERSKI, L.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; CURTIS, J. M.; ANDREWS, P. C.; JUNK, P. C.; KEDZIERSKA, K. Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 599–614, 2009. Disponível em: <ISI:000265682400007\nd:\1Refman12\PDF\Ref_ID-6427.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2014.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, 2014. Disponível em: <<http://www.readcube.com/articles/10.1038/cti.2014.4>>. Acesso em: 27 maio. 2015.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **The leishmaniasis in biology and medicine**, v. 1, p. 1–120, 1987.

LENGER, K.; BAJPAI, R. P.; DREXEL, M. Delayed luminescence of high homeopathic potencies on sugar globuli. **Homeopathy : the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 97, n. 3, p. 134–40, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657772>>. Acesso em: 20 jul. 2015.

LOPES, L.; GODOY, L. M. F.; DE OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R. J. G.; DE FREITAS BUCHI, D. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 37, n. 3, p. 277–87, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364649>>. Acesso em: 30 jul. 2013.

MAFFEI, W. E. **Os fundamentos da medicina**. 2. ed. São Paulo: artes medicas, 1978.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–287, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708003889>>. Acesso em: 27 maio. 2015.

MANHOSO, F. F. R. **Associação Médico Veterinária Homeopata Brasileira**.

MARCILI, A.; SPERANÇA, M. A.; DA COSTA, A. P.; MADEIRA, M. D. F.; SOARES, H. S.; SANCHES, C. D. O. C. C.; ACOSTA, I. D. C. L.; GIROTTO, A.; MINERVINO, A. H. H.; HORTA, M. C.; SHAW, J. J.; GENNARI, S. M. Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44–51, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.001>>. Acesso em: 22 maio. 2015.

MARSDEN, P. G. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Transactions**

of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene¹, v. 6, p. 859–876, 1986.

MATHIE, R. T. The research evidence base for homeopathy: A fresh assessment of the literature. **Homeopathy**, v. 92, p. 84–91, 2003.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, a R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744570>>. Acesso em: 22 maio. 2015.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, p. 339–349, 2004.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371–377, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492208001578>>. Acesso em: 22 maio. 2015.

MODABBER, F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. S58–S61, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.024>>. Acesso em: 22 maio. 2015.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. [s.l.: s.n.]p. 119.

MORAIS, R. C. S. De; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. D. C.; SILVA, Rô. P. E.; COSTA, P. L.; SILVA, K. G. Da; SILVA, F. J. Da; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M. De. Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 506–508, 2013.

MORIKAWA, K.; YANAGIDA, M. Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. **Journal of Biochemistry**, v. 89, n. 2, p. 693–696, 1981.

MORILLAS-MARQUEZ, F.; MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO-SANCHEZ, C.; PINEDA, J. a; MACIAS, J.; SANJUAN-GARCIA, J. *Leishmania infantum* (Protozoa, kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 71–74, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOTT, K. E.; DESJEUX, P.; MONCAYO, a; RANQUE, P.; DE RAADT, P. Parasitic diseases and urban development. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, n. 6, p. 691–698, 1990.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in

Leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–77, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673605676295/fulltext>>. Acesso em: 3 abr. 2015.

OPS. **Leishmaniasis en las américas. recomendaciones para el tratamiento**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2013.

PAHO. **Epidemiological report of the americas**. Whashington: PAHO, 2014.

PAZ, G. F.; REIS, I. A.; AVELAR, D. M.; FERREIRA, E. C. D. M.; WERNECK, G. L. Ectoparasites and anti-Leishmania antibodies: Association in an observational case-control study of dogs from a Brazilian endemic area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 1-2, p. 156–159, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.07.012>>. Acesso em: 24 jul. 2015.

PEIXOTO, H. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 3, p. 334–352, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/tmi.12429>>. Acesso em: 22 maio. 2015.

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

PONTIN, K. **Determinação da atividade biológica de bioterápico e extrato de própolis in vitro" e in vivo" na infecção experimental determinada por leishmania (viannia) brasiliensis**. 2003. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, Campinas, 2003.

PONTIN, K.; DA SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, F. F.; SILVA, M. L. A. E.; CUNHA, W. R.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K.; DE ALBUQUERQUE, S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v. 103, n. 3, p. 487–492, 2008.

PRAJAPATI, V. K.; MEHROTRA, S. Molecular Biomarkers & Diagnosis Advances in the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Journa Molecular Biomarkers Diagnosis**, v. 4, n. 2, p. 1– 2, 2013.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu Rev Entomol**, v. 58, p. 227–250, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317043>>. Acesso em: 22 maio. 2015.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 2014.

RONALD, W.; SILVA, G.; PINTO, S. C.; EDUARDO, J.; STORACE, D. O.; CARVALHO, C. T. **The ultra high dilutions and its virtual structures**. [s.l: s.n.].

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasit - vector and vector- host interactions in Leishmaniasis. **Annual Reviews Microbiology**, v. 55, p. 453–483, 2001.

SAHA, S.; HOSSAIN, D. M. S.; MUKHERJEE, S.; MOHANTY, S.; MAZUMDAR, M.; MUKHERJEE, S.; GHOSH, U. K.; NAYEK, C.; RAVEENDAR, C.; KHURANA, A.; CHAKRABARTY, R.; SA, G.; DAS, T. Calcarea carbonica induces apoptosis in cancer cells in p53-dependent manner via an immuno-modulatory circuit. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 230, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3856502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 abr. 2015.

SALOMÓN, O. D.; QUINTANA, M. G.; BEZZI, G.; MORÁN, M. L.; BETBEDER, E.; VALDÉZ, D. V. Lutzomyia migonei as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. **Acta Tropica**, v. 113, p. 84–87, 2010.

SALVATORE, D.; AURELI, S.; BALDELLI, R.; FRANCESCO, A. Di; TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R. Molecular evidence of Leishmania infantum in Ixodes ricinus ticks from dogs and cats , in Italy. **Veterinaria Italiana**, v. 4, n. 50, p. 307–312, 2014.

SANCHEZ, M. a; DIAZ, N. L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F. J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with Leishmania chagasi. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 70, n. 6, p. 618–24, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15211002>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

SANTANA, F. R. de; CRISTINA, E.; HURTADO, P.; BENITES, N. R.; LAURENTI, M. D. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Antimonium crudum 30cH. **Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 103, n. 4, p. 264–274, 2014.

SÉROR, R. **Homéopathe International**. Disponível em: <<http://www.homeoint.org/>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

SILVA, S. L. M. da. **Avaliação da infecção experimental com leishmania (leishmania) chagasi em hamsters (mesocricetus auratus) pelo tratamento com complexo de medicações ultra-diluídas fatores de auto-organização**. 2010. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

SIQUEIRA, C. M.; COSTA, B.; AMORIM, A. M.; GONÇALVES, M.; FÉO DA VEIGA, V.; CASTELO-BRANCO, M.; TAKYIA, C.; ZANCAN, P.; CÂMARA, F. P.; COUCEIRO, J. N.; HOLANDINO, C. H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines. **Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 102, n. 1, p. 31–40, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23290877>>.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia nas doenças epidêmicas: conceitos, evidências e propostas. **Revista de Homeopatia**, v. 73, n. 29, p. 36–56, 2010.

THOMSON, M. . Antimonyall cupps: Pacula Emetica or Calices Vomitorii. **Section of the history of Medicine**, v. 4, p. 123– 128, 1925.

TIZARD, I. R. Imunidade adquirida a parasitas. In: TIZARD, I. R. (Ed.). **Imunologia Veterinária**. 8. ed. Texas: Elsevier, 2008. p. 321–337.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

VANDERLEI, C. E. D. **A homeopatia numa perspectiva sistêmica - contribuições da saúde para o desenvolvimento local sustentável**. 2010. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências da Administração de Pernambuco, Pernambuco, 2010.

VICKERS, A.; C ZOLLMAN, C. ABC of Complementary Medicine: Homeopathy. **British Medical Journal**, v. 319, p. 1–4, 1999. Disponível em: <papers://133b2da2-5c27-45c9-8290-6952d86f249c/Paper/p2038>. Acesso em: 8 jan. 2015.

WASSENHOVEN, M. Van. **Painel científico da homeopatia**Homeopatia Baseada em Evidências. [s.l: s.n.].

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 1 jul. 2015a.

WHO. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/en/>. Acesso em: 1 jul. 2015b.

WINTER, M. **Antimony: the essentials**.

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. In vitro stimulation of metacyclogenesis in Leishmania braziliensis, L. donovani, L. major and L. mexicana. **Parasitology**, v. 116, p. 305–309, 1998.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C. **Determinação da sensibilidade de isolados de leishmania a antimoniato de meglumina, anfotericina b e tamoxifeno**. 2009. Dissertação (Mestrado) apresentada no Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo, 2009.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; PEREIRA, L. I. a; PELLI DE OLIVEIRA, M. a.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L.; ULIANA, S. R. B. In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 1, p. 68–76, 2010.