



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA MONTEIRO SIQUEIRA

ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS POR UM NOVO BIOTERÁPICO DO
TIPO NOSÓDIO VIVO SOBRE AS LINHAGENS MDCK e J774.G8

Rio de Janeiro

2009

CAMILA MONTEIRO SIQUEIRA

ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS POR UM NOVO BIOTERÁPICO DO TIPO
NOSÓDIO VIVO SOBRE AS LINHAGENS MDCK e J774.G8

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Carla Holandino Quaresma

Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro

Rio de Janeiro

2009

S618a

Siqueira, Camila Monteiro

Alterações celulares induzidas por um novo bioterápico do tipo nosódio vivo sobre as linhagens MDCK e J774.G8/

Camila Monteiro Siqueira; orientadores: Carla Holandino Quaresma, José Nelson dos Santos Silva Couceiro. – Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.

xxii, 125 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Bioterápico - Nosódios. 2. Gripe humana.
3. Influenzinum RC. 4. Homeopatia

I. Título.

CDD 615.532

CAMILA MONTEIRO SIQUEIRA

ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS POR UM NOVO BIOTERÁPICO DO TIPO
NOSÓDIO VIVO SOBRE AS LINHAGENS MDCK e J774.G8

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientadores:

Prof.^a. Dr.^a. Carla Holandino Quaresma
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Leoni Villano Bonamin
Universidade Paulista - SP

Prof. Dr. Leandro Machado Rocha
Faculdade de Farmácia – UFF

Prof. Dra Sheila Garcia
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Prof. Dr. Davis Fernandes Ferreira
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Prof. Dra. Elisabete Pereira dos Santos
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Ao meu esposo Juny, pelo amor e compreensão.

Aos meus pais, Francisco e Vitória,

pela força e confiança.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre ao meu lado, me dando forças e saúde para realização deste trabalho.

A prof. Dra. **Carla Holandino**, orientadora deste trabalho, que sempre acreditou em mim e neste trabalho. Por ter sido uma mãe em todos os momentos. Obrigada pelo carinho, atenção e confiança.

Ao prof. Dr. **José Nelson**, orientador deste trabalho, por aceitar este desafio e, mesmo conhecendo pouco sobre homeopatia, ter se dedicado ao máximo. Por contribuir grandemente para realização deste trabalho. Sua dedicação, atenção e conhecimento fizeram a diferença.

Aos meus pais, **Francisco e Vitória**, pelo carinho e auxílio de sempre. Obrigada pela confiança em mim depositada e pelo incentivo para alcançar este sonho. Vocês são e sempre serão a base da minha formação pessoal e profissional.

Ao meu querido esposo, **Juny**, por ter entendido minhas ausências, meus estresses e por ter me dado forças para que eu nunca desistisse deste sonho. Pelas incansáveis horas no computador para que os gráficos e figuras ficassem perfeitos. Obrigada pelo seu amor! Esta conquista é nossa!

Aos meus irmãos, **Cézar Augusto e Raquel**, aos meus cunhados, **Solange e Welington**, e aos meus sobrinhos lindos, **Isabele, Pedro Manuel e Lídia**, por todo apoio, força e pelos momentos alegres de descontração. Amo muito vocês!

A **Josete e June** pelo carinho, apoio e torcida.

A **Beatriz Costa**, pela dedicação a este trabalho e pelo carinho que sempre teve comigo. Sua ajuda foi imprescindível para a realização deste sonho. Muito obrigada, **Bia!**

A **Gleyce Moreno**, pela sua paciência, presteza e ajuda incansável neste trabalho.

A **Ana Maria**, por ter sido incansável em me auxiliar e ajudar com os experimentos, pela amizade, pela torcida e pela força.

Ao **Venício**, por ter me ajudado com as microscopias e pelas belas imagens.

Ao Dr **Lyrio** e Dr **Haroldo**, por terem confiado neste trabalho e por terem aceito o desafio do ensaio clínico.

A **Luciana Brito**, pela ajuda nos programas de estatística e por sua alegria contagiante.

A **Vânia Bucco**, por ter me auxiliado na escrita deste trabalho.

*A todos do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas, **Marina, Taissa, Isabella, Fortune**, pelo carinho e amizade.*

*A **Marta**, pela amizade, torcida e ajuda com os experimentos.*

*A Profa. **Patrícia Zancan**, por ter sido incansável nas análises de atividade da PFK.*

*A Profa. **Morgana Castelo Branco**, pela sua dedicação e ajuda nos ensaios com macrófagos.*

*A Profa. **Christina Takyia**, por ajudar a decifrar as alterações celulares.*

A todos os laboratórios e técnicos pelo apoio e suporte nos tempos necessários.

*A todos os amigos que me apoiaram e incentivaram durante esse trabalho. Em especial a **Letícia Cortez, Kelen Soares, Viviane Rezende, Felipe Rangel, Danielle Rangel, Raquel Rennó, Daniela Deccache**, pelo carinho e torcida.*

*A banca de acompanhamento, profa. Dra. **Sheila Garcia** e Prof. Dr. **Mauro Sola-Penna**, pelas contribuições durante todo o período da pesquisa.*

A banca examinadora que gentilmente aceitou o convite de participar na defesa desta dissertação.

A todos funcionários e professores do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, pelo carinho e respeito.

“As mudanças que ocorrem em substâncias materiais, especialmente nas medicinais, através da trituração com pó não medicinal, ou quando dissolvida, através da agitação com um fluido não-medicinal, são tão incríveis, que aproximam-se de miraculosas, e é motivo de alegria que a descoberta destas mudanças pertença à Homeopatia.”

(Hahnemann, Doenças Crônicas)

RESUMO

SIQUEIRA, Camila Monteiro. **Alterações celulares induzidas por um novo bioterápico do tipo nosódio vivo sobre as linhagens MDCK e J774.G8**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O vírus influenza tem sido responsável por doenças respiratórias altamente contagiosas com elevadas taxas de mortalidade principalmente em idosos, o que vem estimulando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da gripe humana. Os bioterápicos são medicamentos preparados a partir de produtos biológicos, seguindo a farmacotécnica homeopática, indicados ao tratamento de doenças infecciosas de etiologia conhecida. A proposta deste estudo foi desenvolver, pela primeira vez, um bioterápico manipulado a partir do vírus influenza infeccioso (A/Aichi/2/68 H3N2) e avaliar a sua eficácia inicialmente *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*. A este bioterápico, na potência 30DH, foi dado o nome de Influenzinum RC e seu preparo seguiu a técnica do Dr. Roberto Costa, sendo avaliados, inicialmente, os aspectos ultraestruturais das partículas virais manipuladas na potência de 1DH, em dois solventes: água e tampão salina fosfatado (PBS). A análise por microscopia eletrônica de transmissão indicou ser possível o uso de qualquer um dos dois solventes para a manipulação deste bioterápico. Por isto, todos os experimentos foram feitos utilizando-se 10% de Influenzinum RC manipulado em água. Esta concentração de 10% não se mostrou citotóxica às células, conforme verificado pelo ensaio de vermelho neutro. As alterações celulares observadas na linhagem de células MDCK foram verificadas por microscopia óptica pela quantificação do número de mitoses, nucléolos e corpos lipídicos e, a análise destes dados, apontaram diferenças significativas quando as células tratadas pelo Influenzinum RC foram comparadas aos controles dos experimentos. Alteração na atividade mitocondrial das células MDCK tratadas por 10 dias e 30 dias, com Influenzinum RC, foi confirmada com ensaios de MTT. Ensaio de microscopia eletrônica indicaram que organelas e outras

estruturas das células MDCK não foram morfológicamente alteradas pelo Influenzinum RC. Em contrapartida, quando as células MDCK foram incubadas com o Influenzinum RC, alterações significativas na atividade da enzima fosfofrutocinase-1, foram detectadas. O potencial antiviral do Influenzinum RC frente à linhagem MDCK foi avaliado pelo efeito citopático (CPE) e pelo cálculo do TCID₅₀, que indicaram que o Influenzinum RC não foi capaz de proteger as células MDCK frente à infecção viral. Em contrapartida, a análise por microscopia óptica de fluorescência indicou, de maneira qualitativa, uma redução na fluorescência quando as células MDCK foram pré e pós-tratadas com Influenzinum RC e incubadas com anticorpo policlonal de coelho para influenza A. Avaliando a ação do bioterápico sobre as partículas virais, pôde-se perceber que o mesmo não age sobre as principais glicoproteínas, hemaglutinina e neuraminidase. A quantificação de citocinas imunoestimulatórias por macrófagos da linhagem J774.G8 indicou que a produção do Fator de Necrose Tumoral foi maior no sobrenadante dos macrófagos pré-tratados com este nosódio e após a infecção pelo influenza. Em última análise, o medicamento homeopático trata o doente e não a doença. Seguindo essa linha de pensamento, deveríamos esperar que o Influenzinum RC agisse sobre as células MDCK, induzindo alterações celulares e bioquímicas e não sobre o vírus influenza A, o que foi de fato verificado nos vários protocolos experimentais aplicados ao estudo do Influenzinum RC. Estes resultados fornecem fortes evidências de que o Influenzinum RC possa vir a ser uma promissora alternativa para a gripe.

Palavras-chave: bioterápico, nosódio, Influenzinum RC, influenza, homeopatia, gripe humana.

ABSTRACT

SIQUEIRA, Camila Monteiro. **Cellular changes induced by a new live biotherapeutic-type nosode in the MDCK and J774.G8 lines.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Influenza viruses have been responsible for highly contagious acute respiratory illnesses with high mortality, mainly in the elderly, which encourages the development of new drugs for the treatment of human flu. The biotherapeutics are medicines prepared from biological products, which are not chemically defined. They are compounded following the homeopathic procedures indicated for infectious diseases with known etiology. The purpose of the present study is to develop, for the first time, a biotherapeutic prepared from the infectious influenza A virus (A/Aichi/2/68 H3N2) and to verify its *in vitro* effectiveness. This biotherapeutic, prepared for this study in the homeopathic potency of 30 DH, was named Influenzinum RC. Its compounding followed the technique of Dr. Roberto Costa and evaluated, initially, the ultrastructural aspects of viral particles prepared in the potency of 1DH in two solvents: water and phosphate buffer saline (PBS). The analysis by transmission electron microscopy indicated that is possible to use both solvents to prepare this biotherapeutic. Therefore, all experiments were performed using 10% of Influenzinum RC prepared in water. The concentration of 10% was not cytotoxic to cells, as verified by neutral red assay. The cellular alterations observed in MDCK cells were verified by optical microscopy for the quantification of mitosis, nucleoli and lipid bodies, and the analysis of these data showed significant differences when the cells were treated with Influenzinum RC, compared to controls. Changes in mitochondrial activity of MDCK cells treated for 10 days and 30 days with Influenzinum RC were confirmed by MTT assays. The electron microscopy assays indicated that organelles and other structures of MDCK cells were not morphologically modified by Influenzinum RC. On the other hand, when MDCK cells were incubated with this biotherapeutic, significant

changes in the phosphofructokinase-1 enzyme activity were detected. The antiviral potential of Influenzinum RC on the MDCK cells was evaluated through the cytopathic effect and TCID50 assay, which indicated that this nosode was not able to protect these cells against viral infection. However, the analysis by fluorescence optical microscopy showed, qualitatively, a reduction in fluorescence when the MDCK cells were pre- and post-treated with Influenzinum RC and incubated with rabbit polyclonal antibody to influenza A. Evaluating the action of this biotherapeutic on viral particles, we could see that it does not act on the main viral glycoproteins, hemagglutinin and neuraminidase. The quantification of immunostimulatory cytokines by macrophages J774.G8 indicated that the tumor necrosis factor production was higher in the supernatant of the macrophages pre-treated with this nosode. Ultimately, the homeopathic medicine is intended to treat the patient, not the disease in itself. Following this line of thought, we should expect the Influenzinum RC to act on the MDCK cells, inducing cellular changes and biochemicals rather than the influenza A virus, which was in fact verified in several experimental protocols applied to the study of the Influenzinum RC. These results showed strong evidence that Influenzinum RC might be a promising option for the human flu.

Key-words: biotherapeutic, nosode, Influenzinum RC, influenza, homeopathy, human flu.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do vírus influenza A.	25
Figura 2. Ciclo de replicação do vírus influenza.	27
Figura 3. Subtipos do vírus Influenza A circulantes na população humana ao longo dos anos.	32
Figura 4. Inibição do ciclo de replicação viral pelos antivirais.	34
Figura 5. Microscopia eletrônica de células MDCK infectadas com vírus influenza A.	35
Figura 6. Esquema de produção de massa viral.	63
Figura 7. Esquema da manipulação do Influenzinum RC.	64
Figura 8. Esquema resumido da via glicolítica e pentoses-fosfato.	73
Figura 9. Microfotografia eletrônica da solução de Influenzinum RC na potência de 1DH.	81
Figura 10. Absorbância de diferentes amostras de Influenzinum RC e água 1 DH obtidas em espectrofotômetro UV-Vis.	82
Figura 11. Avaliação da citotoxicidade do Influenzinum RC.	83
Figura 12. Avaliação da atividade mitocondrial, por MTT, nas células tratadas por 10 dias.	84
Figura 13. Avaliação da atividade mitocondrial, por MTT, nas células tratadas por 30 dias.	85
Figura 14. Microscopias ópticas de células MDCK não tratadas.	86
Figura 15. Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 1 dia.	86
Figura 16. Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 5 dia.	86
Figura 17. Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 10 dia.	87
Figura 18. Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 30 dia.	87

Figura 19. Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com água a 10% por 10 dias.	87
Figura 20. Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com água 30DH a 10% por 10 dias.	88
Figura 21. Aspecto típico da mitose em células MDCK.	89
Figura 22. Representação gráfica da taxa de mitose das células MDCK tratadas com Influenzinum RC.	89
Figura 23. Representação gráfica da média de nucléolos por célula nas diferentes situações experimentais.	90
Figura 24. Coloração das células MDCK por <i>Oil Red</i> para quantificação dos corpos lipídicos	91
Figura 25. Quantificação dos corpos lipídicos em células MDCK nas diferentes situações experimentais.	92
Figura 26. Microscopia eletrônica de transmissão das células MDCK tratadas nas diferentes situações experimentais.	93
Figura 27. Atividade da enzima PFK das células MDCK submetidas a 5 dias de tratamento nas diferentes situações experimentais.	94
Figura 28. Atividade da enzima PFK das células MDCK submetidas a 10 dias de tratamento nas diferentes situações experimentais.	95
Figura 29. Atividade da enzima PFK das células MDCK submetidas a 30 dias de tratamento nas diferentes situações experimentais.	96
Figura 30. Microscopia de fluorescência das células MDCK incubadas com Influenzinum RC ou água 30 DH por 30 dias.	99
Figura 31. Produção de TNF- α pelos macrófagos J774.G8 nas diferentes situações experimentais em relação ao sobrenadante do controle de células.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de mortes existente em vários continentes na Pandemia de 1918.	31
Tabela 2. Cálculo do título viral [TCID ₅₀] pelo método de Reed & Muench.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
Ad	Água dinamizada
AMHB	Associação Medicina Homeopática Brasileira
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Soro Albumina Bovina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CC	Controle de Células
CEP	Conselho de Ética e Pesquisa
CFM	Conselho Federal de Medicina
CH	Centesimal de Hahnemann
CV	Controle de Vírus
DANA	ácido 2,3-deidro-2-deoxi- <i>N</i> -acetilneuramínico
DH	Decimal de Hering
DMEM	Dulbeco Modified Eagles's Médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FHB	Farmacopéia Homeopática Brasileira
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluoresceína Isotiocianato
Frutose 6-P	Frutose 6-fosfato
HA	Hemaglutinina

HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	N-(2-hydroxyethyl-piperazine-N')-(2-ethanesulfonic acid)
HU	Hospital Universitário
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IHB	Instituto Hahnemanniano do Brasil
INAMPS	Instituto Nacional de Assistência Médica da Previdência Social
Inf RC	Influenzinum RC
IRA	Infecções Respiratórias Agudas
KCl	Cloreto de Potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio monobásico
LM	Cinquenta Milesimal
MDCK	Mardin-Darby canine kidney
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MO	Microscopia Óptica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MUNANA	Umbeliferil
NA	Neuraminidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NEP	Proteína de exportação celular

NP	Formador de Nucleocapsídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PFK-1	Fosfofrutocinase-1
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Porcentagem de Inibição
RC	Roberto Costa
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA-m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SUS	Sistema Único de Saúde
TCID50	Dose Infectiva para 50% da cultura celular
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV-vis	Ultra-violeta e visível
VII	Índice de atividade antiviral

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Percentual
nm	Nanômetro(s)
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro(s)
g	Gramas(s)
cm	Centímetro(s)
mg	Miligrama(s)
ng	Nanograma
µl	Micro litro(s)
µm	Micrômetro (s)
mM	Milimolar (milimoles / litro)
M	Molar
α	Alfa
β	Beta
§	Parágrafo
Nº	Número
N	Normal
H	Hora (s)
mU	MiliUnidade (s)
% v/v	Percentual volume (ml) / volume (ml)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 VÍRUS INFLUENZA	25
2.2 GRIPE	27
2.2.1 Etapas e sintomas da gripe	28
2.2.2 Pandemias	30
2.2.3 Tratamentos Atuais	32
2.3 HOMEOPATIA	35
2.3.1 A terapêutica homeopática no mundo e no Brasil	35
2.3.2 Princípios básicos da homeopatia	38
2.3.3 Origem do medicamento homeopático	41
2.3.4 Escalas	42
2.4 ALGUNS RELATOS SOBRE A EFICÁCIA E A SEGURANÇA DA HOMEOPATIA	43
2.5 BIOTERÁPICOS / NOSÓDIOS	45
2.5.1 História	46
2.5.2 Classificação dos bioterápicos	49
2.5.2.1 Bioterápicos de estoque	49
2.5.2.2 Isoterápicos	50
2.5.3 Referências bibliográficas a bioterápicos	50
2.5.4 Bioterápicos Dr. Roberto Costa	52
2.5.5 Tratamento da gripe com bioterápicos	53
2.6 TRATAMENTOS HOMEOPÁTICOS PARA INFLUENZA	54

3 OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 MATERIAL	56
4.1.1 Equipamentos e Utensílios	56
4.1.2 Solventes, Reagentes e Meios de Cultura	57
4.2 MÉTODOS	59
4.2.1 Preparo do meio DMEM	59
4.2.2 Preparo da tripsina	59
4.2.3 Preparo do tampão salina fosfato	59
4.2.4 Preparo do azul de tripan	60
4.2.5 Preparo do MTT	60
4.2.6 Preparo da solução de vermelho neutro	60
4.2.6.1 Solução extratora de vermelho neutro	61
4.2.7 Preparo da solução Bouin	61
4.2.8 Preparação da solução <i>Oil Red O</i>	61
4.2.9 Preparo de soluções para dosagem de citocinas	62
4.2.9.1 Solução de lavagem	62
4.2.9.2 Solução diluente	62
4.2.9.3 Solução bloqueadora	62
4.2.10 Preparação e titulação da amostra viral	62
4.2.11 Preparação do bioterápico	64

4.2.12 Avaliação da integridade da partícula viral por microscopia eletrônica de transmissão	65
4.2.13 Negativação da infecciosidade do Influenzinum RC	65
4.2.13.1 Inoculação do Influenzinum RC em ovos embrionados	65
4.2.13.2 Detecção de proteínas e material genético viral por espectrofotometria	66
4.2.14 Tratamento das células MDCK com o Influenzinum RC	66
4.2.15 Avaliação da ação do Influenzinum RC sobre a linhagem MDCK	67
4.2.15.1 Avaliação da citotoxicidade do Influenzinum RC	68
4.2.15.2 Avaliação da atividade mitocondrial celular por MTT	69
4.2.15.3 Avaliação morfológica da linhagem MDCK	70
4.2.15.3.1 Pelo método de Giemsa	70
4.2.15.3.2 Pelo método <i>Oil Red</i>	71
4.2.15.3.3 Pela microscopia eletrônica de transmissão	72
4.2.15.4 Avaliação da atividade da enzima Fosfofrutocinase-1 [PFK-1] nas células MDCK	72
4.2.15.5 Avaliação da infecciosidade viral	74
4.2.15.5.1 Pelo ensaio do vermelho neutro	74
4.2.15.5.2 Pelo método de Reed & Muench	74
4.2.15.5.3 Pela metodologia de imunofluorescência indireta	74
4.2.16 Efeito do Influenzinum RC sobre os vírus e suas atividades biológicas	75
4.2.16.1 Por reação de inibição de hemaglutinação	75
4.2.16.2 Por avaliação da atividade sialidásica viral	76
4.2.17 Efeito do Influenzinum RC sobre os ovos embrionados	77
4.2.18 Tratamento dos macrófagos J774.G8 com o Influenzinum RC	77
4.2.18.1 Dosagem de Fator de Necrose Tumoral [TNF- α]	78

5 RESULTADOS	80
5.1 PREPARAÇÃO E TITULAÇÃO DA AMOSTRA VIRAL	80
5.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA PARTÍCULA VIRAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	80
5.3 NEGATIVAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DO INFLUENZINUM RC	81
5.3.1 Inoculação do Influenzinum RC em ovos embrionados	81
5.3.2 Pela detecção de proteínas e material genético viral por espectrofotometria	82
5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DO INFLUENZINUM RC NA LINHAGEM MDCK	83
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL CELULAR POR ENSAIOS DE MTT	84
5.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDCK PELO MÉTODO DE GIEMSA	85
5.6.1 Quantificação do número de mitoses na linhagem MDCK	88
5.6.2 Quantificação do número de nucléolos na linhagem MDCK	90
5.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDCK PELO MÉTODO <i>OIL RED</i>	91
5.8 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDCK POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	92
5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOFRUTOCINASE-1 NAS CÉLULAS MDCK	93
5.10 AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE VIRAL	96
5.10.1 Pelo ensaio de vermelho neutro	96
5.10.2 Pelo método de Reed Muench	97
5.10.3 Pela metodologia de imunofluorescência indireta	98
5.11 EFEITO DO INFLUENZINUM RC SOBRE OS VÍRUS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	99
5.11.1 Por reação de inibição de hemaglutinação	99
5.11.2 Por avaliação da atividade sialidásica viral	100

5.12 EFEITO DO INFLUENZINUM RC SOBRE OS OVOS EMBRIONADOS	100
5.13 TRATAMENTO DOS MACRÓFAGOS J774.G8 COM INFLUENZINUM RC	101
5.13.1 Dosagem de Fator de Necrose Tumoral [TNF- α]	101
6 DISCUSSÃO	103
7 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

O vírus influenza tem sido responsável por doenças respiratórias altamente contagiosas, afetando humanos desde os tempos antigos com altas taxas de mortalidade em idosos (COUCEIRO *et al.*, 2005).

Algumas classes de fármacos têm sido usadas para o tratamento da gripe humana como os inibidores de neuraminidase e os bloqueadores de proteína M2. Estes fármacos são eficazes, porém, causam diversos efeitos adversos sendo comum o surgimento de amostras virais resistentes, em pouco tempo (MONTTO *et al.*, 2006).

O contínuo impacto causado pelo vírus influenza, tanto em indivíduos de risco, idosos e portadores de patologias crônicas, quanto na população em geral, vem motivando o desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção e controle da gripe, dentre as quais, a homeopatia (FORLEO-NETO *et al.*, 2003).

Neste trabalho, foi desenvolvido um novo medicamento homeopático, do tipo bioterápico, usando como modelo e ponto de partida o vírus influenza ativo, ou seja, infeccioso. Para tanto, as partículas virais foram diluídas em água, veículo no qual as mesmas se mostraram inalteradas, e dinamizadas mecanicamente até a potência 30 DH, de acordo com a Farmacopéia Homeopática Brasileira (BRASIL, 1997). O potencial antiviral deste bioterápico foi testado através da utilização de células de rim canino MDCK [Mardin-Darby canine kidney], as quais são classicamente descritas na literatura, como modelo para avaliação da eficácia de fármacos para vírus influenza (COUCEIRO *et al.*, 2005; SERKEDJIEVA *et al.*, 1998; SIDWELL *et al.*, 2000).

Em adição, análises morfológicas também foram feitas para observação de alterações na linhagem MDCK induzidas pelo medicamento, tanto por microscopia óptica

quanto por microscopia eletrônica de transmissão. Macrófagos da linhagem J774.G8 também foram incubados com o bioterápico e a liberação do fator de necrose tumoral foi avaliada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VÍRUS INFLUENZA

Os vírus influenza, classificados na família *Orthomyxoviridae*, são partículas envelopadas de RNA de fita simples segmentada que se subdividem nos gêneros A, B, C, Thogoto e Isa, sendo que apenas os vírus dos gêneros A e B têm relevância clínica em humanos. Os vírus influenza A [Figura 1] apresentam maior variabilidade e, portanto, são divididos em subtipos de acordo com os tipos de suas glicoproteínas de superfície, denominadas hemaglutinina [HA] e neuraminidase [NA], no total de 16 e 9 subtipos, respectivamente. As infecções pelos vírus influenza A dos subtipos H1N1, H2N2 e H3N2 e pelos vírus do gênero B normalmente causam um espectro similar de quadros clínicos (FORLEO-NETO *et al.*, 2003; KNIPE, 2007).

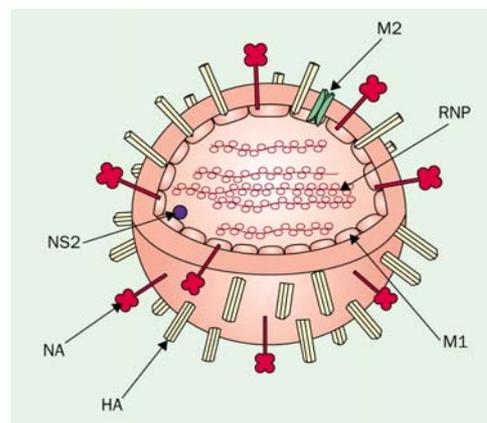


Figura 1. Representação esquemática do vírus influenza A: Segmentos de ribonucleoproteína [RNP] são rodeados pela camada de proteína M1 e pela bicamada lipídica resultante do brotamento da célula hospedeira. Proteína NS2 ou NEP [proteína de exportação nuclear] está associada à M1. Três proteínas virais são incorporadas na camada lipídica: proteínas hemaglutinina [HA], neuraminidase [NA] e M2. Segmentos RNP contém RNA viral envolvido por nucleoproteína e associado com o complexo polimerase.

No modelo de infecção pelo vírus Influenza A, a partícula viral adsorve-se às células, através da ligação entre a glicoproteína hemaglutinina [HA] e resíduos de ácido siálico, presentes na superfície das células, iniciando a infecção. Após a adsorção, ocorre a

endocitose, com posterior fusão, pH dependente, entre o envelope viral e a membrana do endossomo. Esta fusão ocorre com o influxo de H^+ pela ação da proteína M2, presente no envelope da partícula viral. Uma vez no interior da célula, o ácido nucléico viral é dirigido ao núcleo da célula pelo citoesqueleto, onde penetra pelo poro nuclear, pela ação de importinas α e β . No núcleo, ocorrem os processos de transcrição e de replicação do genoma viral, comandados por complexos de polimerase que agem na formação do RNAm e do RNAviral. A montagem final da partícula também acontece no núcleo, onde se forma o complexo composto de RNA, complexo polimerase, NP [formador do nucleocapsídeo viral] e M1 [responsável pelo brotamento]. Após a síntese das proteínas específicas do vírus e glicosilação de algumas delas, em organelas do citoplasma, o complexo RNA-polimerase-NP-M1, já montado no núcleo, é encaminhado ao citoplasma celular pela proteína de exportação nuclear [NEP], interage com estruturas de superfície celular, sendo a partícula viral liberada por brotamento através da membrana citoplasmática [Figura 2] (COUCEIRO & ALBUQUERQUE, 2008; KNIPE, 2007).

A glicoproteína de superfície neuraminidase também é muito importante no processo de replicação viral, pois ela é a responsável por clivar os receptores de ácido siálico reconhecidos pela hemaglutinina, para que o vírus seja liberado da célula hospedeira de origem e consiga disseminar a infecção para as células vizinhas, não permitindo auto-agregação entre partículas virais. A mucina, presente na secreção do trato respiratório, também contém resíduos de ácido siálico, o que dificulta a disseminação da infecção através do carreamento pela secreção. Desta forma, a neuraminidase vai clivando esses receptores e a partícula viral consegue penetrar através da secreção (GUBAREVA *et al.*, 2000; ENGLUND, 2002).

Os vírus influenza C, raramente infecciosos a humanos, diferem dos vírus A e B, entre outras coisas, pela ausência do gene codificador da neuraminidase (PROBER *et al.*, 2002).

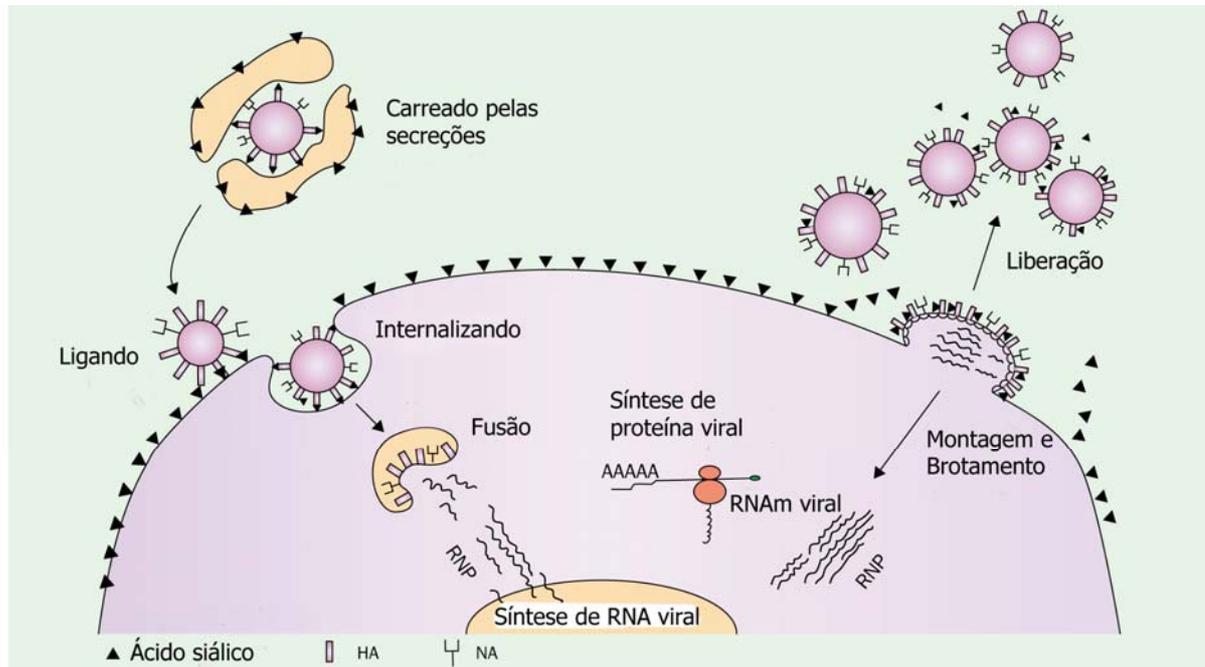


Figura 2. Ciclo de replicação do vírus influenza. A ligação do vírus se dá através da ligação de HA aos receptores contendo resíduos de ácido siálico e ocorre a penetração na célula hospedeira; transcrição do RNA viral e tradução das proteínas virais; replicação do RNA viral e montagem do vírus, brotamento e, subsequente, liberação do vírus pela célula hospedeira (Adaptado de GUBAREVA, 2000).

2.2 GRIPE

A gripe é uma doença infecciosa aguda de origem viral que acomete o trato respiratório e, a cada epidemia, de três a cinco milhões de pessoas são atingidas com complicações severas e, de 250.000 a 500.000 pessoas morrem a cada ano no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde [OMS], devido a infecção pelo vírus. O agente etiológico é o *Orthomyxovirus* ou vírus da gripe. É um vírus que apresenta altas taxas de mutação, que resulta frequentemente na inserção de novas variantes virais na comunidade, para as quais a população não apresenta naturalmente imunidade (FORLEO-NETO *et al.*, 2003; KNIPE *et al.*, 2007).

A transmissão viral se dá facilmente de pessoa para pessoa, por meio de gotículas e pequenas partículas produzidas, quando as pessoas infectadas tosse ou espirram. O vírus

tende a espalhar-se rapidamente em epidemias sazonais (<http://www.who.int/topics/influenza/en/>, acessado em 04/02/2009).

A infecção geralmente dura uma semana e pode causar febre, mialgia, dor de cabeça, mal-estar, tosse, dor de garganta e rinite. A maioria das pessoas se recupera sem tratamento, mas em crianças, idosos e em pacientes que necessitam de cuidados especiais [diabéticos, câncer, problemas respiratórios, cardíacos], a gripe pode ser considerada um risco, uma vez que, a infecção pode causar complicações severas, como a pneumonia, muitas vezes levando à morte. De acordo com a OMS, de 5 a 15% da população é afetada com infecções no trato respiratório superior (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>, acessado em 04/02/2009), nas epidemias de influenza, a cada ano.

2.2.1 Etapas e sintomas da gripe

O período de incubação consiste no tempo entre a infecção inicial e o aparecimento dos primeiros sintomas. A incubação do vírus influenza se dá, geralmente, por dois dias. Entretanto, pode ser de um dia a quatro dias.

No estágio ativo, muitos sintomas começam a aparecer. Dependendo da suscetibilidade e resistência individuais, um ou mais sintomas podem predominar. O período de recuperação pode levar de 7 a 10 dias.

Como sintomas gerais, citam-se:

- Febre;
- Dores musculares;
- Tosse seca;
- Dor de garganta;
- Dor de cabeça;

- Perda de apetite;
- Dor no peito;
- Congestão nasal.

As complicações podem levar a sérias conseqüências e até a morte. É importante o repouso, tratamento para que a recuperação seja rápida e sem complicações, especialmente nos pacientes de risco, como as crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos. As complicações sérias também podem ser tratadas. São complicações da gripe:

- A. **Pneumonia:** é considerada a mais comum e a mais séria complicação de influenza. Existem, pelo menos, dois tipos diferentes de pneumonia associados à influenza, a pneumonia viral primária e a pneumonia bacteriana secundária. A primeira é considerada a mais severa e perigosa complicação, especialmente, quando associada ao vírus influenza A, e pode evoluir e causar morte, em menos de 48 horas. A pneumonia bacteriana secundária se desenvolve nos dois pulmões, pela incapacidade de eliminar ou controlar as bactérias do trato respiratório. As bactérias *Staphylococcus*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Hemophilus influenzae*, podem estar relacionadas a este tipo de pneumonia;
- B. **Síndrome de Reye:** caracterizada por encefalopatia aguda e acumulação anormal de gordura no fígado e em outros órgãos. Esta síndrome está associada com o uso de ácido acetil salicílico e seus derivados, durante o tratamento das infecções virais, como aquelas causadas por vírus influenza, sendo a taxa de mortalidade bastante alta (<http://www.reyessyndrome.org/>, acessado em 22/01/2009);
- C. **Síndrome de Guillain-Barré:** é uma doença rara, onde os nervos periféricos se deterioram. O que torna esta síndrome uma emergência médica é que se pode ter uma fraqueza nos músculos do tórax responsáveis pela respiração. A síndrome de Guillain-

Barré pode ocorrer três semanas após uma doença viral, como a gripe (<http://www.ninds.nih.gov/disorders/gbs/gbs.htm>, acessado em 22/01/2009);

- D. Miosite: inflamação aguda dos músculos, geralmente desenvolvida de um a cinco dias após os sintomas respiratórios. Esta condição é completamente diferente da mialgia, pois está associada aos primeiros sintomas de gripe. Os músculos afetados, geralmente dos membros, ficam extremamente doloridos, especialmente quando o paciente caminha;
- E. Encefalite letárgica: inflamação aguda do cérebro devido à invasão viral, freqüentemente chamada por “doença do sono”. Causa sonolência extrema, confusão mental e letargia;
- F. Laringite viral aguda: um número significativo de crianças com gripe desenvolve este tipo de complicação e, com freqüência, necessitam da hospitalização e até mesmo traqueotomia emergencial para a manutenção da respiração adequada;
- G. Miocardite: inflamação do coração que pode causar sopro cardíaco ou sua falha (PERKO, 2005).

2.2.2 Pandemias

Três pandemias de gripe ocorreram no último século. Em 1918, a “gripe espanhola”, altamente contagiosa, levou ao maior impacto global causado por infecção pelo vírus influenza. Essa pandemia, que teve como agente etiológico o vírus influenza A H1N1, foi a que acarretou o maior número de mortes, estimado em cerca de 40 milhões de pessoas em menos de um ano [Tabela 1].

Tabela 1: Número de mortes existente em vários continentes na Pandemia de 1918.

Continente	Número de mortes
África	1,9 – 2,3 milhões
Ásia	19 a 33 milhões
Europa	2,3 milhões
America Latina	766.000 a 966.000
America do Norte	603.000
Pacífico	85.000
Total	24,7 – 39,3 milhões

Em 1957, uma nova variante de vírus influenza surgiu, causando uma pandemia, chamada de gripe asiática, que teve como agente etiológico o subtipo H2N2 de vírus influenza A, a qual levou a 70.000 mortes, somente nos Estados Unidos. Onze anos mais tarde, em 1968, outra mudança de glicoproteína de superfície [subtipo H3N2 de vírus influenza A] levou a uma nova pandemia, que conduziu a morte de mais de 30.000 pessoas nos Estados Unidos. A conservação da neuraminidase [N2] no vírus H3N2 pode ter garantido alguma proteção à população, que já havia tido contato com o subtipo H2N2, e isso pode explicar sua menor morbidade e mortalidade quando comparada à pandemia de 1957 [Figura 3] (PALESE, 2004).

Palese já sugeria em 2004, que pelas suas características, a próxima pandemia podia estar relacionada à gripe aviária, relacionada ao vírus influenza A H5N1 (PALESE, 2004). O vírus aviário H5N1 já causou mortes em humanos em 1997 e mais recentemente, entre os anos de 2004 e 2008 sendo que a cepa em circulação não é capaz de ser transmitida entre humanos.

Dados recentes da OMS mostram que a gripe aviária já levou 6 indivíduos à morte até o início do mês de março de 2009, 4 desses na China e 2 no Vietnã (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_02_030/en/index.html, acessado em 20/03/2009).

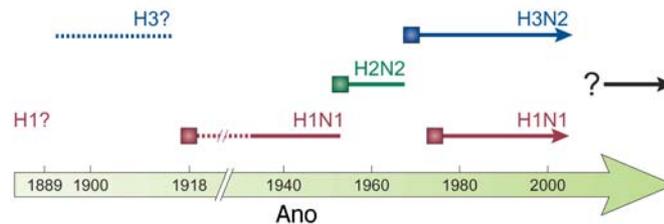


Figura 3: Subtipos do vírus Influenza A circulantes na população humana ao longo dos anos. Amostras virais com três diferentes subtipos de hemaglutinina (H1, H2 e H3) e dois subtipos de neuraminidase (N1 e N2) foram identificadas em humanos. As pandemias com as cepas H1N1, H2N2 e H3N2 foram introduzidas em 1918, 1957 e 1968, respectivamente. Linhas pontilhadas indicam ausência de vírus isolado (Adaptado de PALESE, 2004).

2.2.3 Tratamentos Atuais

Nas últimas décadas, a imunização anual com vacinas inativadas contra influenza tem sido a principal medida para a profilaxia da gripe e redução da morbidade e mortalidade relacionada à doença. No Brasil, a recomendação oficial para a vacinação contra vírus influenza tem sido direcionada aos idosos (FORLEO-NETO *et al.*, 2003).

No Brasil, dois tipos de vacinas inativadas contra a gripe são utilizadas em imunização: as vacinas do tipo *split*, fragmentadas pela exposição a detergentes e purificadas de forma a conter os antígenos de superfície do vírus e algumas nucleoproteínas virais, e as vacinas sub-unitárias, as quais contêm apenas as proteínas de superfície, hemaglutinina e neuraminidase. Ambas as vacinas induzem resposta sorológica semelhante. Quando existe coincidência entre as variantes do vírus influenza em circulação e as contidas na vacina, a imunização previne a infecção em até 90% dos indivíduos (FORLEO-NETO *et al.*, 2003).

Embora a vacinação seja a ferramenta de primeira escolha para a prevenção da gripe, os antivirais específicos são medicamentos de grande relevância na prevenção e controle da mesma. Atualmente, estão disponíveis na Europa e Estados Unidos da América quatro medicamentos antivirais específicos para influenza: os fármacos clássicos amantadina e rimantadina e os antivirais de segunda geração oseltamivir e zanamivir, sendo que estes dois últimos também foram licenciados pelas autoridades sanitárias brasileiras e encontram-se disponíveis no mercado desde 2000 (FORLEO-NETO *et al.*, 2003).

A atividade antiviral da amantadina e da rimantadina é limitada ao vírus influenza A. O alvo desses antivirais é a proteína M2 o que leva a inibição da replicação viral, por impedir a fusão da partícula viral com o endossomo e por não permitir o influxo de H⁺ [Figura 4]. Estes antivirais apresentam algumas importantes limitações, como o espectro de ação restrito, o rápido desenvolvimento de resistência viral e o fato de provocarem reações adversas no sistema nervoso central e trato gastrintestinal, aspectos que têm restringido sua utilização na prática clínica (FORLEO-NETO *et al.*, 2003; ENGLUND, 2002; PROBER, 2002; HAYDEN, 2006; PALESE, 2004).

Oseltamivir e zanamivir são inibidores reversíveis competitivos de neuraminidase. Por serem análogos do ácido siálico, previnem a penetração do vírus à superfície da célula e, também, sua liberação após a replicação viral [Figura 4]. Diferente dos bloqueadores M2, são eficazes contra vírus influenza A e B (PROBER *et al.*, 2002; PALESE, 2004; GUBAREVA *et al.*, 2000; ENGLUND, 2002). Inibidores de neuraminidase bloqueiam a liberação do vírus pela célula infectada, porque os receptores de ácido siálico não são removidos pela neuraminidase, o que conduz ao agregamento dos vírus entre si e na membrana citoplasmática da célula infectada, não permitindo a disseminação da infecção [Figura 5]. O surgimento de resistência a estes medicamentos tem sido observado pelo mundo (MONTTO *et al.*, 2006).

Os antivirais de segunda geração representam novas opções para o tratamento e/ou profilaxia da gripe (FORLEO-NETO *et al.*, 2003). Entretanto, são medicamentos caros e, atualmente, não estão disponíveis em muitos países (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> acessado em 12/10/2006).

Medicamentos que interferem na síntese de RNA, específicos contra regiões do gene do vírus influenza, apresentaram eficácia em camundongos, por interferirem na replicação do vírus (PALESE, 2004). Novos alvos para terapia da gripe estão sendo desenvolvidos com o intuito de contornar o surgimento constante de resistência aos antivirais (BEIGEL & BRAY, 2008; HAYDEN, 2009).

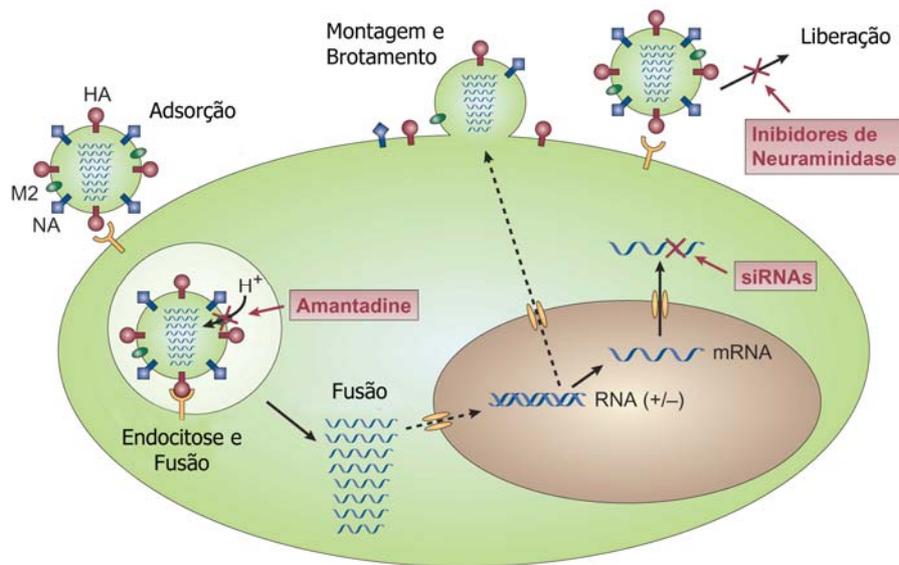


Figura 4: Inibição do ciclo de replicação viral pelos antivirais. Após ligação aos receptores de ácido siálico, o vírus é internalizado por endocitose. A diminuição do pH permite a fusão do endossoma com a partícula viral e esse processo se dá através do influxo de H^+ pela proteína M2, processo bloqueado pela amantadina. Inibidores da síntese de RNA podem afetar a estabilidade do RNAm, prevenindo a translação da proteína viral. Inibidores de neuraminidase bloqueiam a liberação do vírus pela célula infectada (Adaptado de PALESE, 2004).

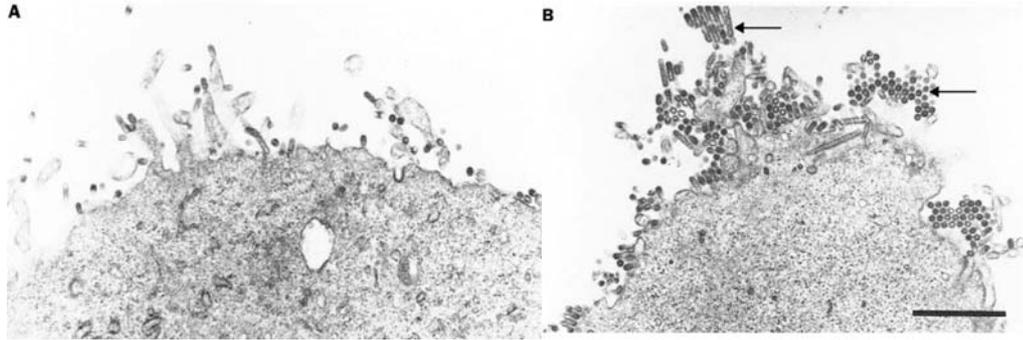


Figura 5: Microscopia eletrônica de células MDCK infectadas com vírus influenza A. [A] Brotamento e liberação do vírus após a replicação viral na ausência de inibidores de neuraminidase; [B] Agregação lateral e formação de grande massa de vírus na presença dos inibidores de neuraminidase.

2.3 HOMEOPATIA

2.3.1 A terapêutica homeopática no mundo e no Brasil

A homeopatia é uma especialidade médica e farmacêutica que consiste em ministrar, ao doente, doses mínimas do medicamento para evitar a intoxicação e estimular a reação orgânica. É baseada no princípio vitalista e no princípio dos semelhantes enunciado por Hipócrates no século IV a.C., e foi desenvolvida pelo médico alemão Cristiano Frederico Samuel Hahnemann, no final do século XVIII, após estudos baseados na observação clínica e em experimentações realizadas na época. Atualmente, a homeopatia está implantada em vários países da Europa, das Américas e da Ásia.

O estudo do princípio da similitude realizado por Hahnemann foi iniciado em 1790 após tradução da *Matéria Médica* de Willian Cullen. Neste material, Cullen relatava as ações farmacológicas da *China officinalis* [quina] assim como seus efeitos tóxicos. Dentre os efeitos tóxicos, chamou a atenção de Hahnemann algumas semelhanças de sintomas entre a doença malária e o medicamento indicado para o seu tratamento, a quina. Então, fez experiências ingerindo por vários dias certa quantidade de quina e observou uma série de sintomas típicos da malária, como: o esfriamento da ponta dos dedos dos pés e das mãos; fraqueza e

sonolência; taquicardia; pulsação rápida; ansiedade; rubor na face; sensação de entorpecimento. Este quadro sintomático tinha a aparência global da doença também conhecida, na época, por “febre intermitente”. Ao suspender o uso desta droga, Hahnemann restabeleceu a sua saúde (FONTES, 2005a; PUSTIGLIONE, 2001). O resultado desta experimentação chamou a atenção de Hahnemann para o princípio hipocrático da semelhança, ou seja, o uso da droga reconhecidamente eficaz para o tratamento da malária, era capaz de produzir sintomas semelhantes à doença em um indivíduo sadio (FONTES, 2005a).

Hahnemann, entre os anos de 1790 e 1796, fez experimentações com numerosas substâncias em pessoas sadias. Ele buscou na prática clínica quadros mórbidos semelhantes e os tratou “homeopaticamente”. Em 1796, fez ao mundo o primeiro anúncio da Homeopatia com a publicação do artigo “Ensaio sobre um novo princípio para descobrir as propriedades curativas das substâncias medicinais”, no *Jornal de Medicina Prática*, sendo este o ano oficial de criação da terapêutica homeopática. Hahnemann continuou seus estudos e testou um grande número de substâncias de origem animal, mineral e vegetal e publicou vários artigos e três livros de grande importância para a homeopatia: o “*Organon da arte racional de cura*”, um tratado que reúne de forma organizada a filosofia e a farmacotécnica homeopática; a “*Matéria Médica Homeopática*” e o “*Tratado de Doenças Crônicas*” (FONTES, 2005a; PUSTIGLIONE, 2001).

No Brasil, a homeopatia foi introduzida no ano de 1840 por Benoit Mure, conhecido no Brasil por Bento Mure, médico francês curado de uma tuberculose pela homeopatia. Após este episódio de cura, o mesmo quis difundir a homeopatia pelo mundo e fez, com grande sucesso, a divulgação desta medicina pelo Brasil (www.amhb.org.br, acessado em 02/03/09).

O medicamento homeopático teve sua existência reconhecida pelas autoridades e sua preparação regulamentada na Farmacopéia Francesa desde 1965, graças aos esforços do

sindicato das farmácias e laboratórios homeopáticos. Neste mesmo ano, leis específicas para farmácias homeopáticas começaram a surgir (TÉTAU, 2001).

No final da década de 70, a OMS criou um Programa de Medicina Tradicional, com o objetivo de formular políticas em medicina tradicional e complementar [homeopatia, acupuntura e fitoterapia] e, desde então, esta organização expressa seu compromisso de incentivar os Estados a programarem políticas públicas para o uso racional e integrado da homeopatia nos sistemas nacionais de atenção à saúde, bem como desenvolverem estudos científicos para melhor compreensão desta terapêutica (BRASIL, 2005; <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ResumoExecutivoMedNatPratComp11402052.pdf>. acesso em 02/03/09).

Em 1976, no Brasil, ocorre a aprovação, através do Decreto nº 78.841, da primeira edição da Farmacopéia Homeopática Brasileira [FHB], a qual foi publicada em 1977. Vinte anos mais tarde, foi publicada a segunda edição [BRASIL, 1997]. Mais recentemente, no ano de 2003, foi publicada a segunda parte desta mesma edição, na qual foram incluídas monografias de substâncias utilizadas em homeopatia. Tanto a 1ª parte [1997] quanto a 2ª parte [2003] encontram-se em vigor até os dias atuais (BRASIL, 1976; <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15457&word=>>, acessado em 02/03/09).

Somente em 1980, a homeopatia foi reconhecida como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina, através da Resolução CFM 1000/80, porém, uma Associação Médica Homeopática Brasileira [AMHB] já havia sido criada no ano anterior (FONTES, 2005a).

Em 1985 foi celebrado um convênio entre o INAMPS, FIOCRUZ, UERJ e o Instituto Hahnemanniano do Brasil [IHB], para fornecimento de medicamentos à rede assistencial do INAMPS, que representou o início da institucionalização da terapêutica homeopática nos

serviços da rede pública de saúde. Depois deste ano, outros convênios foram firmados para a incorporação da homeopatia nos serviços de saúde (SALLES, 2006).

O Conselho Federal de Farmácia reconheceu a homeopatia como uma especialidade no ano de 1992 e, a partir deste ano, passou a regulamentar o funcionamento das farmácias homeopáticas com a presença obrigatória do farmacêutico, que comprove ter feito especialização em homeopatia ou ter cursado a disciplina durante a graduação acrescida de estágio obrigatório (<http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucoes/319.pdf>, acessado em 02/03/09).

Recentemente, em maio de 2006, o Ministério da Saúde publicou a portaria nº 971 que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares [homeopatia, acupuntura e fitoterapia] no Sistema Único de Saúde [SUS]. Esta política aponta para uma série de diretrizes, dentre as quais, a necessidade do desenvolvimento de estudos clínicos e de pesquisa básica envolvendo a homeopatia, os quais precisam ser incentivados no âmbito federal, estadual e municipal (BRASIL, 2006; [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22773&word=Politica Nacional de Medicina Natural e Praticas complementares](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22773&word=Politica+Nacional+de+Medicina+Natural+e+Praticas+complementares), acessado em 02/03/09).

2.3.2 Princípios básicos da homeopatia

Esta ciência tem por fundamento quatro princípios: o “Princípio da Semelhança”; a “Experimentação no homem são”; “Doses mínimas” e “Medicamento Único”. A palavra Homeopatia é oriunda do grego *ómoios*, “semelhante” e *páthos*, “doente” e designa o método terapêutico baseado na lei hipocrática de cura: “*similia similibus curantur*”, ou seja, o semelhante será curado pelo semelhante. Trata-se de um sistema científico e filosófico bem determinado, com uma metodologia de pesquisa própria, que se apóia em dados da

experimentação clínica e de medicamentos homeopáticos no homem sadio, para sua posterior aplicação no homem doente. Estes experimentos podem ser reproduzidos de acordo com os modernos protocolos de pesquisa homeopáticos. Os medicamentos homeopáticos são manipulados através de uma técnica de dinamização [diluição e sucussão ou trituração] que permite diminuir os efeitos tóxicos da substância original e aumentar o poder curativo das mais diversas substâncias (FONTES, 2005a).

a) O Princípio da Semelhança:

É também chamado de princípio da similitude e vem sendo usado na medicina desde tempos remotos. Hahnemann teve como precursores vários médicos, em especial, Hipócrates e Paracelso, que, por meio de suas obras, difundiram este princípio que tem como premissa a cura de um sintoma ou uma doença por uma substância que cause sintomas semelhantes à doença em um homem sadio (FONTES, 2005a).

No parágrafo [§] 24 do Organon, Hahnemann fala sobre a “Lei da Semelhança”:
“Através da totalidade sintomática da doença, busca-se uma substância medicinal [cuja patogenesia seja conhecida pela experimentação em indivíduos sãos] que tenha poder e tendência de produzir o estado mórbido artificial mais semelhante ao caso patológico em questão”. E, no §25, ele diz: “o medicamento cuja ação sobre o homem sadio produziu o maior número de sintomas “semelhantes” àqueles observados na doença que se pretende curar, quando aplicado em dose de atenuação e potência apropriadas, tem também o poder de destruir rápida, radical e de modo permanente a totalidade dos sintomas do quadro mórbido, isto é, toda a doença, convertendo-a em saúde” (PUSTIGLIONE, 2001).

b) Experimentação no homem são:

A experimentação no homem são ou sadio, também chamada de experimentação patogénica, homeopática ou pura, é o procedimento de testar substâncias medicinais em indivíduos sadios para elucidar os sintomas que irão refletir sua ação (FONTES, 2005a). O conjunto destes sintomas, catalogados em Matérias Médicas, é chamado de patogenesia. Hahnemann relata no Organon, §111, o efeito patogénico das substâncias salientando que as substâncias medicinais produzem no corpo humano sadio modificações patológicas segundo “leis definidas e imutáveis da natureza”. Em virtude destas, são capazes de produzir “sintomas mórbidos seguros e dignos de confiança”, cada um de acordo com suas próprias individualidades (PUSTIGLIONE, 2001).

No §107, Hahnemann justifica porque não experimentar substâncias em indivíduos doentes: “Pouco ou nada se verá da ação verdadeira dos medicamentos se, com a finalidade de averiguar isto, eles forem administrados, ainda que isoladamente, a pessoas doentes. As alterações da saúde, devidas ao medicamento, estarão mescladas com os sintomas da doença, dos quais dificilmente podem ser distinguidos” (PUSTIGLIONE, 2001).

c) Doses Mínimas:

Hahnemann se preocupava com a intensidade das reações iniciais que uma droga provocava ao ser ingerida. Esta, dependendo da natureza do paciente, poderia ser muito violenta. No início, Hahnemann empregava doses elevadas de medicamentos, como por exemplo, na forma de tinturas. Assim, antes que o organismo doente começasse a reagir, ocorria uma agravação inicial dos sintomas, pelo somatório dos sintomas naturais provocados pela doença, com os sintomas artificiais causados pelas doses tóxicas das substâncias. Com a finalidade de diminuir os efeitos negativos da agravação dos sintomas, ele realizou uma série de experiências. Além de diluir os medicamentos, passou a imprimir agitações violentas

denominadas de succussões. Hahnemann notou que, além da diminuição da agravação dos sintomas e dos efeitos tóxicos das altas doses, ocorria um aumento da reação orgânica, conforme citado nos parágrafos 68, 128 e 137 do Organon. A partir desse experimento, passou a utilizar diluições infinitesimais potencializadas por fortes agitações, previamente padronizadas por ele próprio. Esse processo farmacotécnico típico da homeopatia e denominado de dinamização seria capaz de promover uma cura mais rápida, suave e duradoura, requisitos fundamentais para uma terapêutica eficaz. A diluição do insumo ativo, sempre intercalada pelas succussões, obedece a uma progressão geométrica, promovendo uma diminuição de sua concentração química e um aumento de sua ação dinâmica, que estimula a reação do organismo em direção à cura (FONTES, 2005a; PUSTIGLIONE, 2001).

d) Medicamento Único:

Durante a experimentação patogenética, testa-se apenas um medicamento por vez, obtendo, por meio desse procedimento, as características terapêuticas da substância testada. Por isso, Hahnemann administrava os medicamentos isoladamente, um por vez, para impedir as interações entre as diferentes substâncias. O medicamento único constitui um dos fundamentos mais importantes da homeopatia sob o ponto de vista médico-científico e o mais difícil de ser realizado na prática, pois exige do clínico conhecimento bastante profundo da matéria médica homeopática (FONTES, 2005a). A substância única, quando bem escolhida pelo médico, é suficiente para o restabelecimento da saúde (PUSTIGLIONE, 2001).

2.3.3 Origem do medicamento homeopático

Os medicamentos homeopáticos provêm dos reinos vegetal, mineral e animal, dos produtos de origem química, farmacêutica e biológica. Os fungos [reino fungi], as bactérias

[reino monera] e os protozoários [reino protista] também representam importantes fontes de matérias-primas empregadas na preparação dos medicamentos homeopáticos. O reino vegetal é o que fornece o maior número de drogas para a preparação de medicamentos homeopáticos. A planta pode ser usada inteira, suas partes, seus produtos extrativos ou de transformação [sarcódios], bem como seus produtos patológicos [nosódios]. Depois do reino vegetal, o reino mineral é o que fornece maior número de drogas experimentadas, sendo alguns medicamentos minerais bastante utilizados na clínica diária, como: *Sulfur*, *Phosphorus* e *Causticum*. Da mesma forma que os vegetais, o animal pode ser utilizado inteiro, suas partes, seus produtos extrativos ou de transformação [sarcódios] ou ainda, os seus produtos patológicos [nosódios] (FONTES, 2005a).

2.3.4 Escalas

Para as preparações das formas farmacêuticas derivadas, a farmacotécnica homeopática emprega três escalas, de acordo com a proporção entre os insumos ativos e inerte: a decimal, a centesimal e a cinqüenta milésimal. Na escala decimal, a diluição é preparada na proporção de 1/10, ou seja, uma parte do insumo ativo é diluída em nove partes de insumo inerte, perfazendo um total de dez partes. Essa escala foi criada pelo médico homeopata Constantine Hering e os símbolos empregados para designar tal escala são: X [dez em algarismo romano], D ou DH [Decimal de Hering]. Na escala centesimal, a diluição é preparada na proporção 1/100, ou seja, uma parte do insumo ativo é diluído em 99 partes de insumo inerte, perfazendo um total de cem partes (BRASIL, 1997). Essa escala foi criada por Hahnemann e seus símbolos são C, ^a, nenhuma indicação ou CH [Centesimal Hahnemanniana]. Na escala cinqüenta milésimal a diluição é preparada na proporção de 1/50.000 e seus símbolos são Q ou LM (FONTES, 2005a).

Em homeopatia, a partir da potência 24DH e 12CH, não é possível detectar átomos ou moléculas da substância original, uma vez que, nestas escalas, o número de Avogrado [$6,02 \times 10^{23}$ átomos] é ultrapassado. Para a homeopatia, quanto mais diluído, mais eficaz é o medicamento, uma vez que a diluição seguida de sucussão, ou seja, a dinamização é a responsável pelo aumento da força medicamentosa da substância (CÉSAR, 2003).

2.4 ALGUNS RELATOS SOBRE A EFICÁCIA E A SEGURANÇA DA HOMEOPATIA

A homeopatia vem surgindo como uma alternativa segura e barata para algumas patologias. Muitas pesquisas clínicas e básicas têm sido feitas para comprovar os efeitos dos medicamentos homeopáticos, assim como, para elucidar os possíveis mecanismos de ação desta terapêutica de 213 anos.

Bordet e colaboradores (2008) avaliaram tratamentos homeopáticos para os fogachos e seus efeitos na qualidade de vida das mulheres em menopausa. Este estudo foi feito em oito países, com 99 médicos e incluiu 438 mulheres de idade superior a 55 anos. Considerando os medicamentos que foram prescritos, 98% das prescrições foram com medicamentos homeopáticos. Os medicamentos *Lachesis mutus*, *Belladonna*, *Sépia officinalis*, *Sulphur* e *Sanguinária canadensis* foram os mais prescritos. Este estudo revelou uma significativa redução na frequência dos fogachos durante o dia e à noite e uma redução, também, no desconforto que eles causavam. Noventa e nove por cento das mulheres que relataram o desaparecimento ou diminuição desses sintomas, apresentaram melhora após 15 dias de iniciado o tratamento homeopático, mostrando eficácia dos medicamentos homeopáticos utilizados (BORDET, *et al.*, 2008).

Pedalino e colaboradores avaliaram o efeito de *Atropa belladonna* e *Echinacea angustifolia* e verificaram que estes medicamentos podem modular efeitos do processo inflamatório (PEDALINO, 2004).

Macedo e colaboradores verificaram a utilização de *Arnica montana* 6CH como anti-inflamatório em animais usando modelos de inflamação aguda e crônica. Na inflamação aguda, o grupo tratado com *Arnica montana* 6CH teve uma inibição de 30% na inflamação quando comparado ao controle. No modelo de inflamação crônica, o grupo pré-tratado por 3 dias, com o mesmo medicamento, também teve uma redução na inflamação, 6h após o estímulo inflamatório. O grupo concluiu que a Arnica é eficaz nos processos inflamatórios e que o pré-tratamento é necessário para uma maior eficácia (MACEDO, *et al.*, 2004).

Bonamin verificou que animais tratados com *Arnica montana* 6CH apresentaram uma redução significativa no edema induzido por carragenina e um aumento na razão vasos/edema quando comparados aos controles [dexametasona, solução hidroalcoólica, tintura-mãe de arnica]. A absorção linfática também ficou aumentada nos animais tratados por este medicamento homeopático quando comparado ao controle (BONAMIN, 2008).

Os efeitos antiinflamatórios de *Rhus toxicodendron*, em diferentes potências [6CH, 12CH, 30CH e 200CH], sobre processos inflamatórios que envolvem a histamina, as prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios, foram comprovados em animais, sendo a potência 6CH a mais eficaz (DOS SANTOS, 2007).

Aitchison e colaboradores verificaram que o tratamento homeopático tem resultados diferentes quando comparado ao uso de placebo. Eles avaliaram 50 pacientes com rinite alérgica e verificaram que os pacientes tratados com homeopatia tiveram uma melhora no fluxo de ar nasal, quando comparados ao grupo placebo, e, uma redução dos sintomas foi percebida por 28% dos pacientes tratados com homeopatia. Entretanto, a agravação inicial dos

sintomas de rinite foi verificada, em maior proporção, neste mesmo grupo (AITCHISON, 2000).

Mojaver e colaboradores avaliaram os efeitos de *Ignatia amara* 30CH em pacientes com líquen planus oral. Os pacientes avaliados possuíam lesões orais consistentes clínica e histologicamente com líquen planus erosivo. Após avaliar 30 pacientes nesta situação, puderam concluir que este medicamento é eficaz neste caso clínico. As lesões diminuíram e os pacientes puderam voltar a comer o que antes não conseguiam em função das dores e da sensação de queimação, quando comparados ao grupo controle tratados com placebo. Houve uma melhora na qualidade de vida dos pacientes, pois os mesmos voltaram a se alimentar e a fazer higiene bucal sem qualquer desconforto (MOJAVER, 2009).

2.5 BIOTERÁPICOS / NOSÓDIOS

Os bioterápicos são, segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira, preparações medicamentosas, de uso homeopático, obtidas a partir de produtos biológicos, quimicamente indefinidos: secreções, excreções, tecidos e órgãos, patológicos ou não, produtos de origem microbiana e alérgenos (BRASIL, 1997). Com outras palavras, o Manual de Normas Técnicas descreve os bioterápicos como sendo produtos não quimicamente definidos que servem de matéria-prima para preparações bioterápicas de uso homeopático (MANUAL DE NORMAS TÉCNICAS, 2003).

Os bioterápicos têm um conceito amplo, que engloba nosódios, auto-isoterápicos e isoterápicos. Existe uma tendência de chamarmos os nosódios de bioterápicos que são medicamentos, preparados segundo a farmacotécnica homeopática, e que têm como ponto de partida material patológico animal ou vegetal. Os bioterápicos, da classe dos isoterápicos,

visam combater as doenças com os produtos elaborados pela própria doença ou com materiais provenientes do organismo doente (FONTES, 2005a).

2.5.1 História

O termo nosódio se refere ao medicamento feito a partir de tecido ou secreções patológicas. Tecnicamente, um nosódio é feito a partir do material patológico de vegetais, animais ou humanos. Como exemplo, têm-se *Secale cornutum* e *Ustilago maidis* que são nosódios vegetais [preparados a partir do fungo que infesta centeio e milho, respectivamente]. *Tuberculinum bovinum* é um nosódio animal [preparado a partir do escarro de uma vaca com tuberculose bovina]. *Psorinum* é um produto de doença humana, preparado a partir do conteúdo da vesícula da sarna. A secreção patogênica, fluido de erupções ou tecido patológico é triturado com lactose e, depois, succussionado pelo método preconizado. Geralmente, é usado na trigésima potência ou potência superior, na qual não existe a possibilidade de se ter a presença do agente patológico (SCHEPPER, 2001).

Antes de Koch e Pasteur desenvolverem a ciência da bacteriologia, alguns homeopatas já tinham a visão de que manifestações de doenças como erupções da pele e secreções poderiam conter toxinas que poderiam ser potencializadas e usadas como medicamentos. Hahnemann foi o primeiro a usar estas fontes como medicamento, fazendo uma pequena experimentação do *Psorinum* (SCHEPPER, 2001). Este medicamento é feito a partir da diluição de uma serosidade de vesícula de sarna e foi o primeiro nosódio a ter uma patogenesia de acordo com as técnicas preconizadas por Hahnemann (LYRIO, 2002).

Em 1834, o médico homeopata Constantine Hering, criou, após as suas experiências, o termo nosódio, originado do grego *nósos* que significa doença (FONTES, 2005a). Foi Hering que realmente promoveu o uso dos nosódios e fez experimentações, tendo sido o responsável

por adicionar muitas categorias de medicamentos, incluindo os autosódios que são manipulados a partir de substâncias retiradas do corpo do próprio paciente.

Wilhelm Lux, um veterinário homeopata, desenvolveu um ramo da homeopatia que ele chamou de Isopatia, originado do grego *isos* que significa igual e *páthos* que significa doença [tratamento das doenças com produtos dinamizados oriundos da mesma doença], declarando que se baseava na lei “Igual cura o Igual”. Entretanto, os medicamentos isopáticos têm uma aplicação muito mais específica do que os outros homeopáticos desde que cada um seja usado para uma doença específica, ao invés de ter uma vasta indicação para aspectos mentais, emocionais e fisiológicos (FONTES, 2005a; SCHEPPER, 2001).

Este veterinário, Johann Wilhelm Lux, em 1831, atendendo ao pedido de um criador de gados, prescreveu o muco nasal de um animal doente, diluído na potência 30CH, para uma epidemia e obteve resultados surpreendentes (FONTES, 2005a) Esta doença é uma das mais antigas e é causada por um bacilo do gênero *Burkholderia*. Seus sintomas são caracterizados por hipertermia, respiração ruidosa, inapetência, emagrecimento progressivo, congestão nasal e descarga mucopurulenta, erosões, úlceras e cicatrizes na mucosa nasal (MOTA *et al.*, 2000).

Johann Ernst Stapf, que defendeu os trabalhos de Hering e Lux, preconizou o uso de bioterápicos preparados a partir do próprio doente, o que foi denominado, naquela época, de auto-isopatia (FONTES, 2005a). O racional desta indicação segue a premissa de que a secreção patológica encerra em si os microorganismos ou talvez os antígenos, que originaram uma doença específica e, estes, quando diluídos e dinamizados de acordo com a farmacotécnica homeopática, se tornam potentes medicamentos específicos para aquele paciente ou patologia.

Em 1910, surgiu a primeira matéria médica, escrita por Allen, denominada “Matéria Médica dos Nosódios”, considerada a mais importante sobre o tema na época (LYRIO, 2002).

No início do século XX, sem conhecimento da homeopatia, o patologista e bacteriologista inglês, Edward Bach, começou a associar a presença de bactérias encontradas no tubo intestinal com doenças crônicas. Ao ler o *Organon*, Bach se impressionou com a similaridade existente entre a sua terapia de vacinas e o tratamento homeopático. As primeiras experiências avaliando a potencialização das vacinas para administração na forma de bioterápicos foram feitas entre 1920 e 1921. Em 1925, após nove anos de experiência, Bach reportou uma série de casos tratados com as suas vacinas: 95% dos indivíduos responderam bem e 80% dos casos apresentaram excelentes resultados (ALMEIDA, 1997).

Em 1954, a comissão permanente da Farmacopéia Francesa adotou o termo bioterápico suprimindo o termo nosódio na França (LYRIO, 2002).

Em 1960, Julian, um médico homeopata francês, tornou-se um grande difusor da nosodioterapia e escreveu a “Matéria Médica de Nosódios” onde relatou a patogenesia de *Streptococcinum*, *Staphylococcinum* e mais de 45 bioterápicos microbianos (ALMEIDA, 1997).

Dentre os bioterápicos mais bem estudados está o *Secale cornutum*, bioterápico vegetal, oriundo do centeio espigado que é parasitado por micélios de *Claviceps purpúrea*, que tem como principais alcalóides presentes nos esporos representam a ergotina e a ergotoxina. Desta forma, é muito utilizado, como isoterápico, em indivíduos saturados pelo abuso de derivados ergotínicos; sua indicação também pode ser baseada na Lei dos Semelhantes, uma vez que este bioterápico foi submetido à experimentação e possui patogenesia (KOSSAK-ROMANACH, 2003).

Alguns homeopatas consideram os nosódios como isopatia desde que administrados para a cura de uma mesma doença. Mas os nosódios também são prescritos para uma vasta gama de indicações diferentes das doenças a partir das quais são derivados (SCHEPPER, 2001).

Os nosódios não são vacinas, como muitos pensam, mas podem ser utilizados para profilaxia de muitas moléstias (LYRIO, 2002). O termo nosódio foi substituído pelo termo genérico bioterápico, mais abrangente e descrito em 1965 pelas Farmacopéias Francesa e Brasileira (BRASIL, 1997).

2.5.2 Classificação dos bioterápicos

O Manual de Normas Técnicas (2003) classifica os bioterápicos em:

2.5.2.1 Bioterápicos de estoque:

São obtidos a partir de secreções, excreções patológicas ou não, produtos de origem microbiana, soros e vacinas.

a) Bioterápicos “Codex”: obtidos a partir de soros, vacinas, toxinas ou anatoxinas, inscritos na Farmacopéia Francesa e preparados por laboratórios especializados. Como exemplo, tem-se o medicamento Influenzinum, obtido a partir da vacina antigripal do Instituto Pasteur;

b) Bioterápicos simples: obtidos através de “vacinas estoques”, constituídas por culturas microbianas puras, lisadas e atenuadas em condições determinadas;

c) Bioterápicos complexos: são definidos pelo seu modo de obtenção [secreções ou excreções patológicas] ou seu modo de preparação. Por exemplo, o *luensinum* que se trata do lisado de serosidades treponêmicas de cancro sifilítico, preparados sem adição de anti-sépticos;

d) Bioterápicos ingleses: são, também, conhecidos por nosódios intestinais de Bach-Paterson;

e) Bioterápicos preparados a partir de microorganismos vivos [Bioterápicos Dr Roberto Costa]: são preparados com microorganismos vivos, na escala decimal, usando como diluente o cloreto de sódio a 0,9%.

2.5.2.2 Isoterápicos

São bioterápicos preparados a partir de substâncias exógenas ou endógenas.

- a) Auto-isoterápico: são preparados a partir de excreções ou secreções obtidas do próprio paciente [sangue, urina, escamas, fezes] e só a ele destinado.
- b) Heteroisoterápico: são os alérgenos, polens, poeiras, pêlos, solventes, medicamentos alopáticos, alimentos, que, de alguma forma, sensibilizam o paciente.

2.5.3 Referências bibliográficas a bioterápicos

Castro e colaboradores (1975) pesquisaram o uso do nosódio meningococcinum como preventivo contra a meningite meningocócica e concluíram que o meningococcinum 10CH foi capaz de aumentar, significativamente, a resistência à meningite meningocócica nos indivíduos tratados. Este medicamento foi dado a 18.640 crianças, enquanto que 6.340 crianças não o receberam. Somente quatro casos de meningite foram registrados no grupo de crianças tratadas enquanto que 34 casos de meningite foram registrados no grupo que não recebeu o tratamento. Esses autores sugerem ainda a repetição deste experimento com potências maiores, como a 30CH (CASTRO *et al.*, 1975; SCHEPPER, 2001).

Ribeiro e colaboradores estudaram o comportamento de tripomastigotas sangüíneas do *Trypanosoma cruzi*, inoculados endovenosamente em camundongos normais e tratados com bioterápicos e, concluíram que, quando os animais são tratados com o mesmo bioterápico

na potência de 30DH, as formas delgadas, inoculadas por via venosa, são precocemente destruídas, enquanto que as largas são mais resistentes e permanecem na corrente circulatória por determinado tempo, sendo depois destruídas (RIBEIRO *et al.*, 1983).

Coelho e colaboradores relataram em 1991, diminuição progressiva da frequência e da intensidade dos sintomas de brucelose crônica com o uso do bioterápico manipulado a partir de *Brucella melitensis* (ALMEIDA, 1997).

Danninger e colaboradores pesquisaram um bioterápico manipulado a partir da toxina estafilocócica em 12CH e observaram sua ação em pacientes saudáveis e em pacientes HIV positivos. Ao final do estudo concluíram que este medicamento muda o perfil imunológico de ambos os pacientes, diminuindo o CIC [*Circulating Immune Complexes*] e aumentando as células CD4 e a razão CD4/CD8 (DANNINGER *et al.*, 2000).

Queiroz utilizou *Trypanosoma cruzi* o qual contém as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y [MHOM/BR/1950/Y] para manipulação de um bioterápico na potência 30DH e verificou sua eficácia *in vivo* em experimentos com camundongos. Este trabalho evidenciou uma taxa de sobrevivência de 50% nos animais previamente tratados com o bioterápico, com os mesmos apresentando altos níveis de anticorpos da classe IgG e ausência de parasitas na corrente circulatória, demonstrando que o bioterápico foi capaz de modular a resposta humoral (QUEIROZ, 2005).

Berchieri e colaboradores utilizaram bioterápicos a partir da bactéria *Salmonella enteritidis*, a qual é responsável por infecções em aves e está também associada à salmonelose humana, na potência de 200CH, e verificaram que a terapia reduziu a excreção de *Salmonella enteritidis* pelas aves o que levou a uma menor contaminação dos ovos (BERCHIERI *et al.*, 2006).

Almeida e colaboradores estudaram o efeito do bioterápico *T. cruzi* 12 DH e *Phosphorus* 12 DH em camundongos infectados pelo mesmo agente. O bioterápico, neste

estudo, foi preparado de acordo com a farmacotécnica utilizada pelo Dr Roberto Costa partindo do sangue do camundongo infectado pelo *Trypanosoma cruzi*. Os pesquisadores observaram que o bioterápico modulou o sistema imune principalmente durante a fase aguda da infecção e o *Phosphorus* diminuiu a patogenicidade do protozoário (ALMEIDA, 2008).

2.5.4 Bioterápicos Dr. Roberto Costa

Os bioterápicos Roberto Costa foram criados pelo médico brasileiro Dr. Roberto Andrade da Costa. Esta preparação tem como ponto de partida o microorganismo vivo, na sua forma infectiva, diluído em solução fisiológica. Os estudos clínicos do Dr. Roberto Costa mostraram que esta forma de preparação era capaz de estimular o organismo de um indivíduo doente e provocar uma reação oriunda da memória imunológica, que este mesmo agente causal induz no sistema imune do organismo (COSTA, 1984, 2002). A farmacotécnica homeopática desse bioterápico se diferencia das demais pela utilização da diluição e dinamização, a partir do agente causal na sua forma íntegra e viva, nunca lisado ou inativado (LYRIO, 2002).

O bioterápico vivo não é infeccioso da 12DH em diante e é altamente eficaz na 30DH, fazendo, com segurança, o tratamento e a profilaxia das infecções intra e extracelulares que lhe são correspondentes (COSTA, 1988). Segundo Dr. Roberto Costa, o nosódio vivo dinamizado suscita a formação de anticorpos imunizantes agindo como uma espécie de vacina (LYRIO, 2002).

O Dr. Roberto Costa preparava seus medicamentos usando como diluente o cloreto de sódio, a 0,9%, tendo como ponto de partida suspensões bacterianas. Quando se tratava de uma preparação com vírus, Dr. Roberto Costa orientava que a manipulação fosse feita em água destilada. Nesta dissertação, foi utilizada a técnica do Dr Roberto Costa, tendo como ponto de

partida o vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) [amostra variante X-31], o qual foi diluído em água destilada estéril.

2.5.5 Tratamento da gripe com bioterápicos

Atualmente, na medicina homeopática existe o medicamento *Influenzinum* (GUTMAN, 1989; PEKER *et al.*, 1999). Este bioterápico foi desenvolvido a partir da vacina antigripal do Instituto Pasteur (MANUAL DE NORMAS TÉCNICAS, 2003; FONTES, 2005a) e teve sua eficácia comprovada por observação clínica (PEKER *et al.*, 1999).

Segundo Perko (2005), o Influenzinum 30DH pode ser prescrito um mês antes do período de gripe, segundo a posologia: uma dose uma vez por semana, durante quatro semanas; na quinta semana, o paciente suspende a medicação e retoma o uso a partir da sexta semana. Ao final deste esquema de tratamento, Perko recomenda a administração de uma dose mensal de Influenzinum 30DH, enquanto perdurar o período de gripe. Se este esquema terapêutico falhar, o autor recomenda o uso de Influenzinum 30 CH (PERKO, 2005).

Outro bioterápico muito usado na clínica médica para tratamento de infecções por influenza é o Oscilococcinum que foi desenvolvido por Dr. Joseph Roy, na França em 1919. É um medicamento feito a partir do auto lisado filtrado de fígado e coração de pato (*Anas barbárie*) e foi introduzido nos Estados Unidos, em 1984. Um estudo duplo cego, placebo controlado feito na Alemanha mostrou que este medicamento ajuda a diminuir significativamente os sintomas da gripe, incluindo febre, tosse, dor de garganta, coriza, dor de cabeça, dores musculares e fadiga. Em pacientes que fizeram uso de *Oscilococcinum* foi notada uma melhora dos sintomas, após 48 horas. Contudo, como a maioria dos medicamentos usados na gripe e resfriados, este medicamento parece funcionar melhor logo após o aparecimento dos primeiros sintomas (PERKO, 2005).

2.6 TRATAMENTOS HOMEOPÁTICOS PARA INFLUENZA

Schepper (2001) descreve em seu livro que Dr. T.A. McCann, de Ohio, na 77ª Convenção Nacional do Instituto de Homeopatia de Washington, em 1921, reportou que, 24.000 casos de influenza foram tratados alopaticamente e tiveram uma taxa de mortalidade de 28,2%, enquanto que em 26.000 casos, tratados com homeopatia, a taxa de mortalidade foi de 1,05%. Estes e outros resultados clínicos têm sido relatados mostrando o sucesso da homeopatia no tratamento da gripe, sem casos de morte e sem evolução para pneumonia ou com baixos índices de mortalidade e pneumonia.

Os sintomas da gripe são muito importantes para que o médico faça a escolha correta de um medicamento homeopático que seja o mais indicado para o tratamento de influenza. Abaixo, tem-se relacionado os medicamentos homeopáticos mais prescritos no caso de gripe, a saber (SCHEPPER, 2001):

- *Arsenicum album*;
- *Baptisia tinctoria*;
- *Bryonia alba*;
- *Eupatorium perfolatum*;
- *Gelsemium sempervirens*;
- *Influenzinum (bioterápico)*;
- *Phosphorus*;
- *Rhus tóxicodendron*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e verificar a eficácia *in vitro* de um novo medicamento antiviral homeopático, do tipo nosódio vivo, para vírus influenza preparado de acordo com a farmacotécnica homeopática.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma técnica de manipulação do bioterápico que conserve o vírus infeccioso, seguindo a técnica do Dr. Roberto Costa para preparo de nosódios vivos;
- Avaliar a citotoxicidade do bioterápico em células MDCK;
- Avaliar a atividade antiviral do novo bioterápico *in vitro* através de diferentes modelos experimentais;
- Quantificar a liberação de citocina do tipo Fator de Necrose Tumoral [TNF- α] sobre a linhagem de macrófagos J774.G8, estimulada com o novo bioterápico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos e Utensílios

Balança analítica – METTLER TOLEDO – AG 204;

Braço mecânico - AUTIC;

Capela de Fluxo Laminar – VECO – ULFS 12;

Estufa de cultura – FANEM – 002CB;

Estufas de esterilização – Modelo 315SE - FANEM;

Espectrofotômetro de placa - Model 3550, Bio-Rad Laboratories;

Espectrofotômetro - SHIMADZU UV 2401 PC;

Fluorímetro modelo SpectraMax M5/M5 - Molecular Devices Corporation

Frascos para a manipulação do medicamento;

Garrafas para cultura de células;

Micropipetas;

Microscópio eletrônico de transmissão - MORGANY/ FEI;

Microscópio invertido - OLYMPUS;

Microscópio óptico de Fluorescência - AXIOPLAN II/Zeiss;

Pipetas;

Placas de 96 poços;

Repipetador automático - AUTIC;

Ultracentrífuga Beckman - Modelo Optima LE-80K.

4.1.2 Solventes, Reagentes e Meios de Cultura

Acetona - MERCK;

Albumina bovina [BSA] - SIGMA-ALDRICH®;

Antibióticos [Estreptomicina/Penicilina/Gentamicina] – GIBCO;

Anticorpo de captura α -m TNF [AF-410-NA] – R&D Systems;

Anticorpo de detecção α -m TNF [BAF-410] – R&D Systems;

Anticorpo recombinante r-m TNF [410 MT] – R&D Systems;

Anticorpo de captura α -m IFN [MAB 785] – R&D Systems;

Anticorpo de detecção α -m IFN [BAF-485] – R&D Systems;

Anticorpo recombinante r-m IFN [485 MI/CF] – R&D Systems;

Azida sódica - SIGMA-ALDRICH®;

Azul de tripan – VETEC;

Bicarbonato de sódio [NaHCO₃] – GIBCO;

Bouin;

Cloreto de sódio – USB;

Dimetilsulfóxido [DMSO] – SIGMA-ALDRICH®;

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético – SIGMA-ALDRICH®;

Giemsa - MERCK;

Glutamina – GIBCO;

HEPES – Ácido N-2 [4- Hidroxietil piperazina] N- 2 etano sulfônico – SIGMA®;

Hidróxido de sódio [NaOH] – GIBCO;

Meio Dulbeco' s Modificado [DMEM] – GIBCO;

4-methylumbeliferyl N-acetyl- α -D-neuraminic acid sodium salt hidrate

[4-MUNANA] - SIGMA-ALDRICH®;

MTT: [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] – SIGMA®;

N-acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid [antiviral para influenza] [DANA] –
FLUKA;

Ovos embrionados de galinha de 9 dias de incubação;

Sacarose;

Soro Fetal Bovino [SFB] – GIBCO;

Tampão Salina Fosfatado [PBS];

Tripsina;

Tris (hidroximetil) aminometano - [Tris base] – MERCK;

Tween 20 – MERCK;

Vermelho Neutro;

Vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) [amostra variante X-31];

Xilol – MERCK.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo do meio DMEM

Para o preparo de 900 ml de meio de cultura DMEM foram pesados 3,0 g de HEPES, 0,2 g de NaHCO₃, 0,3 g de glutamina e dissolvidos em 900 ml de água purificada. O pH do meio, quando necessário, foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 N. A solução final foi filtrada em membrana esterilizante [0,22 µm], em capela de fluxo laminar. As soluções foram distribuídas em recipientes de vidro fechados e mantidos em geladeira a 8°C até o uso, quando a temperatura foi ajustada para 37°C. Um frasco contendo o meio recém preparado foi mantido em estufa a 37 °C, por no mínimo 48 h, para teste de esterilidade.

4.2.2 Preparo da tripsina

A solução aquosa de tripsina foi preparada contendo: 8,0 g de NaCl, 0,4 g de KCL, 0,1 g de dextrose, 0,58 g de NaHCO₃, 0,5 g de tripsina, 0,2 g de EDTA e 0,45 ml de vermelho fenol a 1 %, os quais foram dissolvidos em quantidade suficiente de água purificada para preparar 1.000 ml de solução. Em seguida, a solução foi filtrada, distribuída em recipientes de vidro fechado e mantida em congelador a – 20 °C [solução estoque] e em geladeira a 8 °C [solução para uso].

4.2.3 Preparo do tampão salina fosfato

O tampão salina fosfato [PBS] foi preparado a partir da solubilização de: 0,2 g de fosfato de potássio monobásico, 8,0 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio e 1,44

g de fosfato de sódio bibásico desidratado solubilizados em quantidade suficiente de água purificada para preparar 1.000 ml de solução. O pH da solução foi ajustado, quando necessário, para 7,4 com NaOH 1 N. A solução foi distribuída em recipientes de vidros fechados e autoclavados durante 20 min a 120 °C. Após o resfriamento, os frascos foram mantidos em geladeira.

4.2.4 Preparo do azul de tripan

Foi preparada inicialmente uma solução estoque do corante a 0,4 % da seguinte maneira: 400 mg do corante azul de tripan foi adicionado a 90 ml de água purificada contendo 810 mg de NaCl e 60 mg de K_2HPO_4 , em seguida o volume da solução foi ajustado para 100 ml com água purificada. A solução foi aquecida até solubilização completa e o pH ajustado para 7,2 com auxílio da solução de NaOH 1 N. Essa solução estoque foi diluída à concentração de 0,2 %, com água purificada e mantida em geladeira.

4.2.5 Preparo do MTT

A solução de Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio foi obtida pela diluição de 50 mg de MTT em 10 ml de PBS (5 mg/ml). A solução foi armazenada ao abrigo da luz e em geladeira.

4.2.6 Preparo da solução de vermelho neutro

A solução de vermelho neutro foi obtida pela solubilização de 0,1 g de vermelho neutro em quantidade suficiente de água destilada para 100 ml de solução. Foram retirados

0,5 ml desta solução e diluídos em 9,5 ml de meio DMEM para serem adicionados à cultura de células.

4.2.6.1 Solução extratora de vermelho neutro

A solução extratora foi constituída pela mistura de 500 ml de metanol e 10 ml de ácido acético em quantidade suficiente de água destilada para 1.000 ml de solução.

4.2.7 Preparo da solução Bouin

No preparo da solução Bouin foram preparadas três soluções distintas, a saber: Solução I [solução de ácido pícrico saturado]; Solução II [mistura de 75 % da solução I com 25 % de formalina]; Solução III [mistura de 1 parte de ácido acético glacial em 20 partes da solução II]. Esta solução III foi a utilizada para realizar a coloração por Giemsa.

4.2.8 Preparação da solução *Oil Red O*

A solução de *Oil red O* 0,7 % foi obtida dissolvendo-se o *oil red O* em quantidade suficiente de propilenoglicol para volume de 100 ml, agitando-se lenta e constantemente e sob aquecimento de 100°C, por alguns minutos. Após dissolução, a solução foi filtrada com auxílio de algodão por duas vezes. Esta solução, se estocada a 60°C, é estável por até 1 ano.

4.2.9 Preparo de soluções para dosagem de citocinas

4.2.9.1 Solução de lavagem

A solução de lavagem foi feita com a adição de 50 µl de tween 20 em 100 ml de PBS.

4.2.9.2 Solução diluente

Para o preparo desta solução foram utilizados 50 µl de tween 20, 0,1 g de soro albumina bovina [BSA], 100 ml de TRIS-salina [0,2422 g de Tris-base, 0,8766 g de NaCl e 100 ml de água destilada].

4.2.9.3 Solução bloqueadora

Para o preparo desta solução foram utilizados 50 ml de PBS, 0,025 g de azida sódica, 2,5 g de sacarose e 0,5 g de BSA. A solução foi mantida sob agitação até completa solubilização dos constituintes.

4.2.10 Preparação e titulação da amostra viral

A amostra de vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) foi preparada em ovos embrionados de galinha de 9 dias de incubação, por inoculação de 0,2 ml em cavidade alantóica. Os ovos foram incubados por 48 horas, à 33-34°C, e os líquidos alantóicos foram coletados, obtendo-se, assim, a massa viral a ser manipulada [Figura 6]. Esta massa viral foi concentrada por ultracentrifugação a 80.000 x g durante 1 hora e o *pellet* obtido foi submetido

a processo de purificação, por ultracentrifugação a 100.000 x g, durante 2 horas, em gradiente de sacarose de 20 a 60% (BARROS *et al.*, 2003).

A avaliação da amostra viral purificada, assim como das amostras virais em diferentes fases dos experimentos, foi feita por reação de hemaglutinação, utilizando-se diluições da amostra viral ao dobro [a partir de 1:2] frente a uma suspensão de hemácias humanas a 1%, em PBS com 0,2% de BSA. A leitura foi realizada após 60 minutos de incubação, a 4°C, (COUCEIRO *et al.*, 1994) e o título da amostra viral, expresso em unidades hemaglutinantes por 25 µL [UHA/25 µl], foi equivalente a maior diluição capaz de causar 100% de hemaglutinação.

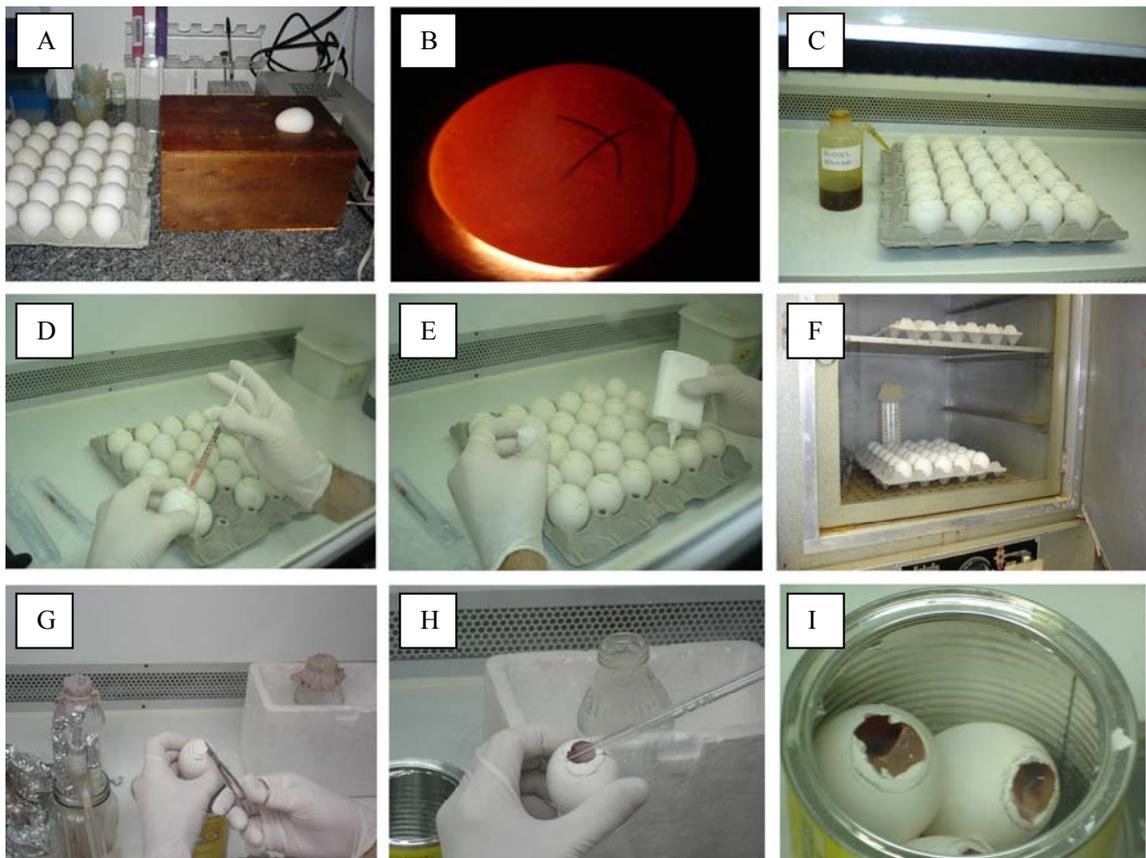


Figura 6: Esquema de produção de massa viral. [A] localização do embrião por ovoscopia; [B] marcação da cavidade alantóica por ovoscopia; [C] colocação do material em fluxo laminar; [D] inoculação de vírus; [E] fechamento dos orifícios nos ovos; [F] incubação em estufa; [G] abertura/ corte dos ovos; [H] recolhimento do líquido alantóico para obtenção da massa viral a ser manipulada; [I] inutilização do material não aproveitado.

4.2.11 Preparação do bioterápico

A preparação do bioterápico seguiu a técnica do Dr Roberto Costa para o preparo de nosódios vivos. Para tanto, a amostra purificada de vírus influenza H3N2 infeccioso, com título de 10.240 UHA/25 μ L, foi submetida ao processo de diluições sucessivas e succussões para preparação do bioterápico. Para isto, 0,1 ml da amostra viral foi adicionado a 0,9 ml de água destilada estéril. O mesmo procedimento foi feito tendo o PBS como veículo. Ambas as soluções foram preparadas em volume total de 1 ml.

Em seguida, estas preparações foram submetidas a 100 succussões mecânicas dando origem a 1ª solução dinamizada, chamada de decimal de Hering [DH]. Um ml desta solução foi colocado em 9 ml de água destilada estéril ou PBS; esta solução foi submetida a 100 succussões e, assim, foi obtido o bioterápico 2DH (FONTES, 2005a). Este procedimento foi repetido, sucessivamente, até a obtenção do bioterápico em 30DH, que foi denominado de Influenzinum RC. O mesmo foi preparado com a água destilada estéril e PBS para se fazer um controle somente do veículo dinamizado sobre a infecção [Figura 7].

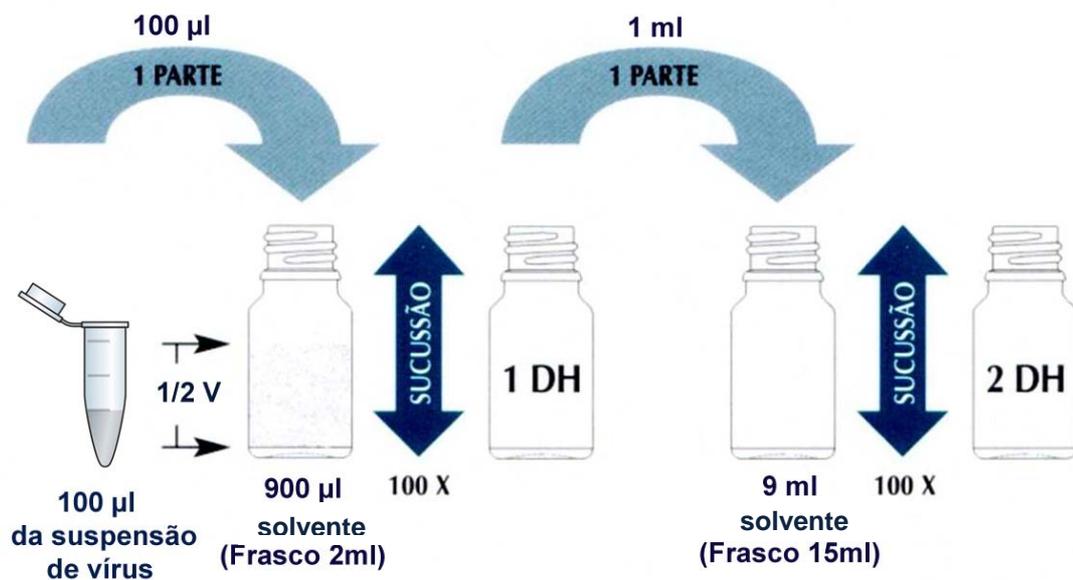


Figura 7: Esquema da manipulação do Influenzinum RC, onde 100 μ l da suspensão de vírus [título 10.240 UHA/25 μ l] foram diluídos em 900 μ l de solvente. Esta solução foi submetida a 100 succussões, obtendo-se a 1DH. Um ml da solução 1 DH foi diluído em 9 ml de solvente e, após ser succussionado por 100 vezes, foi obtida a solução 2 DH. Este procedimento foi repetido até a obtenção do medicamento na potência 30 DH. (Adaptado do MNT, 2003).

4.2.12 Avaliação da integridade da partícula viral por microscopia eletrônica de transmissão

A integridade da partícula viral em água e PBS foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão [Morgagni 268/FEI]. Para este ensaio, 5 µl do bioterápico 1DH manipulado em água e em PBS, foram colocados em grade de níquel com 1 gota de solução de ácido fosfotúngstico 2%, pH 6,8. Após 1 minuto, o material foi seco com papel de filtro e, depois, uma gota de solução aquosa saturada de acetato de uranila foi adicionada. Após 30 segundos, os excessos foram retirados, com auxílio de papel de filtro, e as imagens das amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (FONSECA *et al.*, 1984).

4.2.13 Negativação da infecciosidade do Influenzinum RC

Para confirmar que o Influenzinum RC, na potência utilizada em todos os experimentos, 30 DH, não possuía nenhuma partícula infecciosa, alguns experimentos foram feitos.

4.2.13.1 Inoculação do Influenzinum RC em ovos embrionados

A massa viral para utilização neste projeto foi obtida através da utilização de ovos embrionados. Para a certificação de que o Influenzinum RC não possuía nenhuma partícula infecciosa, o mesmo foi inoculado em ovos embrionados seguindo o protocolo do item 4.2.10, substituindo a inoculação de 0,2 ml de vírus por 0,2 ml de Influenzinum RC. Posteriormente, o conteúdo líquido da cavidade alantóica foi removido e a sua titulação foi realizada, por reação de hemaglutinação, para quantificação das partículas virais.

4.2.13.2 Detecção de proteínas e material genético viral por espectrofotometria

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a existência de material viral na potência utilizada para os experimentos, 30 DH. Este método permite a detecção espectrofotométrica de proteínas e material genético viral os quais apresentam absorção em 280 e 260 nm, respectivamente [SHIMADZU UV 2401 PC]. As leituras foram feitas à temperatura de 28°C, segundo metodologia já descrita (HARRIS, 2005). Foram feitas medidas de absorbância, nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm para todas as potências do bioterápico. Como controle, as mesmas leituras foram feitas com água dinamizada 1 DH.

4.2.14 Tratamento das células MDCK com o Influenzinum RC

Uma suspensão celular de MDCK [Madin-Darby canine kidney] contendo 5×10^4 cels/ml foi plaqueada em placa de 96 poços, por 24h, a 37°C, para obtenção de uma monocamada confluyente de células que teve como meio nutricional DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10%. A este meio foram acrescentados o antibiótico sulfato de gentamicina [50 µg/ml] e o fungistático anfotericina B [2,5 µg/ml] (GUBAREVA *et al.*, 2002). O medicamento, preparado como no item 4.2.11, foi adicionado a cada poço da placa, após adição de novo meio de crescimento, sem soro fetal bovino, segundo o protocolo abaixo:

- Grupo 1 / Controle de células pré-tratadas: as células MDCK foram pré-tratadas com 10% do Influenzinum RC, por 10 dias, através de passagens sucessivas e, posteriormente, infectadas com 25 µl de amostra de vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2). Após adsorção por 1 hora, em estufa a 37°C, o sobrenadante foi retirado e o meio DMEM foi renovado;

- Grupo 2 / Controle de células pós-tratadas: as células MDCK foram previamente infectadas com 25 µl de amostra de vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2). Após adsorção por 1 hora, em estufa a 37°C, o sobrenadante foi retirado e o meio DMEM foi renovado com 10% do Influenzinum RC;
- Grupo 3 / Controle de células pré e pós-tratadas: as células MDCK foram pré-tratadas com 10% do Influenzinum RC por 10 dias, através de passagens sucessivas e, posteriormente, foram infectadas com 25 µl de amostra de vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2). Após adsorção por 1 hora em estufa a 37°C, o sobrenadante foi retirado e o meio DMEM foi renovado com 10% de Influenzinum RC;
- Grupo 4 / Controle positivo: células MDCK infectadas com 25 µl de amostra de vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2). Após adsorção por 1 hora em estufa a 37°C, o sobrenadante foi retirado e o meio DMEM foi renovado;
- Grupo 5 / Controle negativo: células MDCK sem tratamento;
- Grupo 6: Células MDCK pré-tratadas com água 30DH;
- Grupo 7: Células MDCK pré-tratadas com água destilada estéril.

Nos grupos que receberam tratamento com o Influenzinum RC [1, 2 e 3] foram feitos controles apropriados, utilizando água destilada estéril dinamizada [30DH] e não dinamizada e tanto o bioterápico quanto seus controles foram readicionados a cada troca de meio. Foram feitos três experimentos independentes em quintuplicata.

4.2.15 Avaliação da ação do Influenzinum RC sobre a linhagem MDCK

As células MDCK submetidas a diferentes situações experimentais, como descrito no item 4.2.14, foram avaliadas através das seguintes metodologias de análise:

4.2.15.1 Avaliação da citotoxicidade do Influenzinum RC

As células MDCK foram tratadas por 10 dias com o Influenzinum RC, com água dinamizada 30DH e com água estéril não dinamizada, na concentração de 10%, em relação ao meio DMEM e, após este período, foram feitas análises de citotoxicidade pelo ensaio de vermelho neutro, seguindo metodologia já descrita na literatura (FINTER, 1969; ROGERO, 2003). Este corante é solúvel em água e é capaz de atravessar a membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas a sítios aniônicos existentes na matriz lisossomal. Muitas substâncias ou infecções virais danificam a membrana da célula resultando no decréscimo de captura do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela quantificação da coloração desenvolvida (ROGERO, 2003). Este ensaio pode ser usado para avaliação da infectividade viral, para ensaios de neutralização, para estudos de crescimento viral e para testes de citotoxicidade (FINTER, 1969). Brevemente, 100 µl da solução de vermelho neutro [0,5 ml/9,5 ml de meio DMEM] foram adicionados a cada orifício da placa de 96 poços, onde células MDCK foram plaqueadas após tratamento por 10 dias com Influenzinum RC, água 30DH e água destilada estéril. A placa foi incubada por 3h, a 37°C, em estufa seca. Terminada a incubação, a solução de vermelho neutro foi descartada para a adição de 100 µl de solução de formaldeído 4% em PBS. A fixação do material foi feita por 5 minutos. Após este tempo, esta solução foi descartada e 100 µL da solução extratora de vermelho neutro [solução de ácido acético/ metanol] foram adicionados e mantidos em contato por 20 minutos. A absorbância foi medida a 490 nm em espectrofotômetro de placa [Model 3550, Bio-Rad Laboratories], para determinação da viabilidade celular em cada situação (FINTER, 1969; ROGERO, 2003). As leituras de absorbância obtidas em culturas de células submetidas à ação

do Influenzinum RC, ou não, foram comparadas aos seus respectivos controles e os dados foram analisados pelo programa ANOVA.

4.2.15.2 Avaliação da atividade mitocondrial celular por MTT

O método MTT mede a atividade mitocondrial de células viáveis, sendo sensível para avaliar a viabilidade e atividade celular (MOSMANN, 1983). O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan. Este produto de coloração púrpura é acumulado dentro da célula e após solubilização no solvente dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser quantificado em espectrofotômetro do tipo ELISA ($\lambda = 490 \text{ nm}$). Alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente na absorbância, o que permite quantificar a atividade mitocondrial das células MDCK nas diferentes situações experimentais (MOSMANN, 1983).

Nas condições experimentais testadas, as células MDCK foram plaqueadas em placa de 96 poços e, após 24h, foram incubadas com 20 μl de MTT (5,0 mg/ml em PBS), por 3 horas, a 37 °C, na ausência de luz. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e adicionado, a cada poço, 200 μl de DMSO. A absorbância foi lida em leitor de placas do tipo ELISA e os dados foram analisados pelo programa de estatística ANOVA. Foram feitos dois experimentos independentes, em quintuplicata, nas células tratadas por 10 dias e por 30 dias.

4.2.15.3 Avaliação morfológica da linhagem MDCK

4.2.15.3.1 Pelo método de Giemsa

As características morfológicas das células MDCK tratadas e não tratadas pelo Influenzinum RC, água 30DH e água destilada estéril, em diferentes tempos de tratamento, foram analisadas, após coloração pelo método May-Grunwald-Giemsa (VEIGA *et al.*, 2005). Para isto, uma suspensão celular de MDCK contendo 5×10^4 cels/ml foi plaqueada em placas de 24 poços, na presença de lamínula, por 24h, a 37°C, para obtenção de uma monocamada confluyente de células que teve o DMEM como meio nutricional, suplementado com soro fetal bovino a 10%. A este meio foram acrescentados o antibiótico sulfato de gentamicina [50 µg/ml] e o fungistático anfotericina B [2,5 µg/ml]. Após o tempo de 24h, procedeu-se o processo de fixação com a solução de Bouin por 5 minutos, seguido por lavagens com álcool 70% e água destilada, até retirada total da solução fixadora. Cada uma das lamínulas, foi corada com a solução de Giemsa [1:10 em água destilada], por 3 horas. Com auxílio de uma pinça, as lamínulas foram retiradas e colocadas rapidamente em um béquer contendo 10 ml de água destilada e 4 gotas de ácido acético glacial. Posteriormente, estas lamínulas foram submetidas a um processo de desidratação no qual as lamínulas foram embebidas por 10 segundos nos seguintes solventes: acetona 100% por duas vezes; acetona 70% e xilol 30%; acetona 50% e xilol 50%; acetona 30% e xilol 70%; xilol 100% por duas vezes. As lamínulas foram secas e, com auxílio de permaunt, as lâminas foram montadas. No mínimo 3.000 células foram analisadas em microscópio óptico [AXIOPLAN II/ZEISS]. Para a análise das alterações celulares, foram feitos dois experimentos independentes em triplicata (VEIGA *et al.*, 2005).

Por este método foi avaliado o número de células MDCK em mitose quando tratadas pelo Influenzinum RC, água 30DH e água destilada estéril. A frequência de células mitóticas

por cultura é determinada pelo número de células mitóticas em uma população de 1000 células consecutivas, ignorando células fragmentadas e debris celulares (MUEHLBAUER *et al.*, 2003).

Por este método, também, foram quantificados o número de nucléolos em uma população de 1.000 células MDCK, submetidas a diferentes situações experimentais.

4.2.15.3.2 Pelo método *Oil Red*

Corpos lipídicos são tipicamente encontrados em células normais de forma dispersa em seus citoplasmas, porém, seu número aumenta nas células relacionadas com processos inflamatórios (WELLER, 1994). O conteúdo dos corpos lipídicos é rapidamente disponibilizado e o mesmo pode ser refeito e disperso de forma rápida, dependendo da necessidade da célula (MARTIN, 2005). Para avaliação da quantidade de corpos lipídicos presente nos vacúolos das células MDCK, nas diferentes situações experimentais, foi feita a coloração de lipídeos pela utilização do corante *oil red*. Para isto, uma suspensão celular de MDCK contendo 5×10^4 cels/ml foi plaqueada em placa de 24 poços, na presença de lamínula, por 24h, a 37°C, para obtenção de uma monocamada confluyente de células que teve como meio nutricional DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10%. A este meio foram acrescidos o antibiótico sulfato de gentamicina [50 µg/ml] e o fungistático anfotericina B [2,5 µg/ml]. Após o tempo de 24h, procedeu-se a coloração por *oil red* que consiste na fixação das células por formalina, no período de 30 minutos, com posterior lavagem das lamínulas em água corrente e em água destilada. Após lavagem, foi colocado propilenoglicol por 5 minutos, por duas vezes e, depois de retirado, foi adicionada a solução de *oil red* e mantida por 7 minutos em agitação. Em seguida, o material foi incubado em propilenoglicol 85% V/V por 3 minutos e lavado com água destilada. Por último, foi adicionada hematoxilina

por 1 minuto o qual foi removida com água corrente. As lâminas foram montadas, com auxílio de glicerina e analisadas em microscópio óptico [AXIOPLAN II/ZEISS]. A quantidade de corpos lipídicos foi verificada fazendo-se a média de corpos lipídicos por células, avaliando 10 campos de cada situação experimental, e os dados foram analisados pelo programa ANOVA (PROPHET *et al.*, 1994).

4.2.15.3.3 Pela microscopia eletrônica de transmissão

As células submetidas ou não, a ação do Influenzinum RC, de água 30DH e de água destilada estéril foram fixadas, primeiramente, com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M; em seguida, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio para seguir a segunda fixação [pós-fixação] que foi feita com ácido ósmico 1%. A preparação foi novamente lavada e, em seguida, desidratada com acetona. Por fim, o material foi impregnado com resina e polimerizado. O material devidamente emblocado foi levado a um ultramicrotomo [LAICA EM UC6] onde foram feitos os cortes ultrafinos para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão em microscópio MORGANI 265/ FEI (LEWIS *et al.*, 1991).

4.2.15.4 Avaliação da atividade da enzima Fosfofrutocinase-1 [PFK-1] nas células MDCK

A fosfofrutocinase é uma enzima da via glicolítica [Figura 8] e é o elemento de controle mais importante desta via. Através da análise da sua atividade, pode-se verificar se a célula está em processo de glicólise ou se esta via está sendo desviada para formação de

outros produtos como, por exemplo, nucleotídeos, pela ativação da via das pentoses-fosfato (STRYER, 1996).

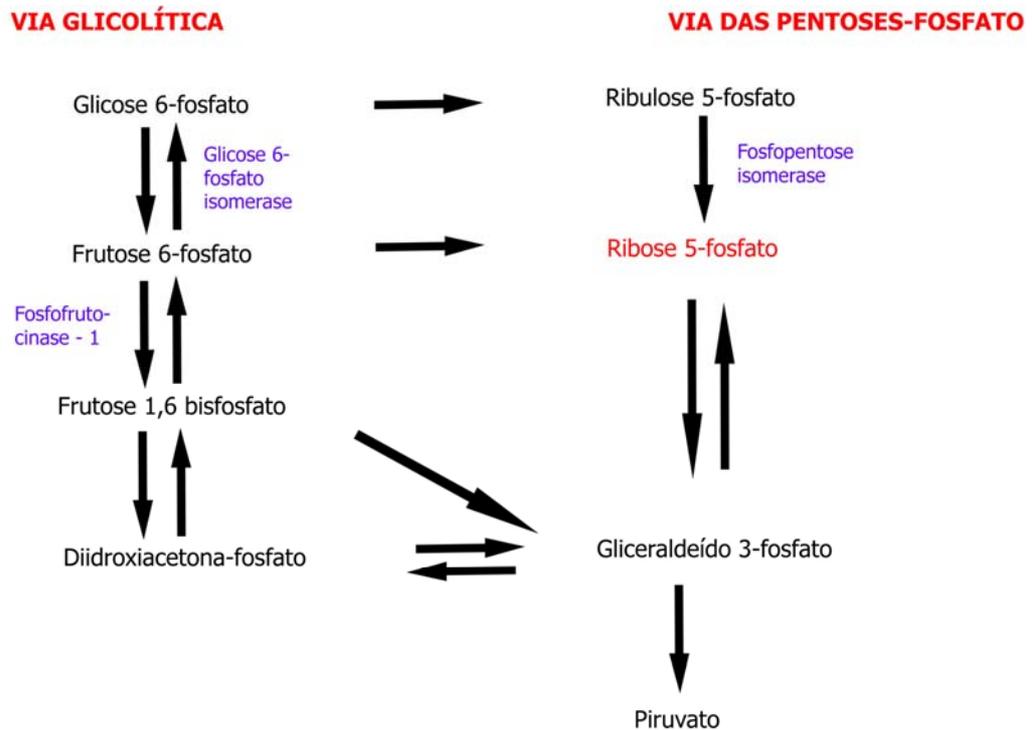


Figura 8: Esquema resumido da via glicolítica e pentoses-fosfato. Caso seja necessária a produção de nucleotídeos e/ou outro produto da via das pentoses, a via glicolítica é desviada para a via das pentoses-fosfato gerando ribose a partir dos produtos glicose-6-fosfato e/ou frutose-6-fosfato.

A atividade fosfofrutocinásica do homogeneizado celular foi avaliada em um meio reacional contendo 1 mM frutose 6-P, 1 mM ATP, 5 mM NADH, 2 mU/ml aldolase, 2 mU/ml triosefosfato isomerase, 2 mU/ml α -glicerofosfato desidrogenase e 100 μ l do homogeneizado celular contendo 1×10^6 cel/ml, em um volume final de 200 μ l. A reação foi iniciada pela adição de uma alíquota do homogeneizado e a oxidação de NADH foi quantificada em um leitor de microplacas a 340 nm (COELHO *et al.*, 2007).

4.2.15.5 Avaliação da infecciosidade viral

4.2.15.5.1 Pelo ensaio do vermelho neutro

A infecciosidade viral foi avaliada através do corante vermelho neutro seguindo metodologia já descrita no ítem 4.2.15.1. As leituras de absorbância obtidas em culturas de células submetidas à ação do Influenzinum RC ou não, infectadas por amostra viral de influenza ou não, foram comparadas aos seus respectivos controles, respeitando os grupos experimentais. Para esta avaliação, foram feitos três experimentos em quintuplicata.

4.2.15.5.2 Pelo método de Reed & Muench

As avaliações foram feitas através da análise do efeito citopático, pelo cálculo do TCID₅₀ [dose infectiva para 50% da cultura celular] pelo método de Reed & Muench (1938). A influência do Influenzinum RC, da água 30DH e da água destilada estéril, sobre a infecção viral pode ser expressa em percentagem de inibição [PI] (Nishimura et al 1977), usando valores antilogaritmicos [$PI = 1 - [\text{antilogaritmo do teste} / \text{antilogaritmo do controle}] \times 100$] e o índice de atividade antiviral [VII] calculado pela seguinte fórmula $VII = B - A$, onde B é título do vírus sem tratamento [controle positivo] e A é o título do vírus na presença de tratamento (SANTOS *et al.*, 1999).

4.2.15.5.3 Pela metodologia de imunofluorescência indireta

Células MDCK pré-tratadas ou não com Influenzinum RC e água 30DH por 30 dias, foram plaqueadas em placas de 6 poços, contendo lamínulas, por 24 horas, a 37°C. O meio

nutricional DMEM foi renovado e 100 µl de vírus [título 10^{-1}] foram adicionados e incubados por 1 hora, a 37°C. O sobrenadante foi substituído por meio DMEM em todas as situações do experimento [Grupos 1 a 5]; Influenzinum RC ou água 30DH foram re-adicionados aos respectivos grupos experimentais [Grupos 2 e 3]. Após 24 horas, 50 µL do antisoro policlonal de coelho para vírus influenza A foram adicionados por 1h, a 37°C, e removidos através de 3 lavagens com PBS. Em seguida, 50 µL de anticorpo IgG-FITC anti-coelho [diluição de 1/100] foram incubados por 1 hora. O segundo anticorpo foi removido por novas lavagens com PBS e as lâminas foram montadas com as lamínulas, usando uma solução de N-propil galato 20 mM e de glicerol a 20% em PBS (SIQUEIRA *et al.*, 2006). A análise microscópica das imagens fluorescentes seguiu usando microscópio de epifluorescência [AXIOPLAN II /ZEISS] equipado com filtros apropriados e usando lentes objetivas de 40 x. A captura de imagens foi feita com uma câmera [Digital ColorView XS] acoplada ao microscópio e a infecção viral foi avaliada de forma qualitativa (SUN *et al.*, 2003).

4.2.16 Efeito do Influenzinum RC sobre os vírus e suas atividades biológicas

4.2.16.1 Por reação de inibição de hemaglutinação

A glicoproteína viral hemaglutinina é a responsável pela adsorção do vírus à célula pela sua ligação a resíduos de ácido siálico presentes na membrana celular. Quando a hemaglutinina viral está preservada, ocorre uma reação de aglutinação entre os resíduos de ácido siálico existentes nas hemácias e a hemaglutinina presente na partícula viral, a qual pode ser detectada macroscopicamente devido à formação de uma rede. Desta forma, a avaliação da atividade de adsorção da amostra de vírus influenza, na presença ou ausência do Influenzinum RC, utilizou esta reação entre hemácias humanas e o vírus influenza A. Para

tanto, foram utilizadas duas amostras do bioterápico, uma pura e uma diluída 50% em PBS, frente à amostra de vírus com título de 4 UHA/25 µL. As amostras, em volume de 25 µl, foram colocadas em contato com 25 µl da suspensão viral e incubadas a 4°C, por 60 minutos em uma placa de 24 poços. A revelação, posterior, foi feita através da adição de 25 µl de hemácias humanas a 0,5%, suspensas em PBS contendo 0,2% de soro albumina bovina [BSA]. A leitura final foi realizada após 30 minutos de incubação a 4°C (COUCEIRO *et al.*, 1994). A capacidade do Influenzinum RC em inibir a adsorção vírus-célula [inibição de hemaglutinação], foi comparada frente aos vários controles do experimento, dentre os quais foram incluídos a água 30DH e água destilada estéril.

4.2.16.2 Por avaliação da atividade sialidásica viral

A avaliação da atividade sialidásica da amostra de vírus influenza, na presença ou na ausência do Influenzinum RC, foi feita com o uso de 4-metilumbeliferil [4-MUNANA], como substrato fluorogênico para a ação enzimática da neuraminidase, sendo avaliada a percentagem de inibição da atividade sialidásica viral causada pelo medicamento frente à amostra de vírus influenza. Para este ensaio, 5 µl de cada amostra [Influenzinum RC, água 30 DH e água destilada estéril] foram incubadas por 30 minutos, a 37°C, com 5 µl de suspensão viral [64 UHA/25 µl], em placa de 96 poços. Após este período, foram adicionados 15 µl de 4-MUNANA a 0,1 mM, em tampão MES 32,5 mM contendo 4 mM de CaCl₂, pH 6,5. A incubação foi feita ao abrigo da luz por 1 hora, a 37°C. A reação foi interrompida com 75 µl de NaOH 0,14 M, em etanol a 83%. A leitura foi feita logo em seguida. Neste processo, a fluorescência emitida pela liberação de 4-metilumbeliferona foi analisada em fluorímetro com

excitação a 365 nm e emissão a 460 nm [modelo SpectraMax M5/M5] (MUNGALL, 2003) e comparada à fluorescência emitida pelo inibidor padrão [DANA].

4.2.17 Efeito do Influenzinum RC sobre os ovos embrionados

Para avaliar se o pré-tratamento dos ovos embrionados com Influenzinum RC modificaria a taxa de infecção viral, os ovos embrionados foram pré-tratados com o bioterápico e os respectivos controles. O pré-tratamento dos ovos envolveu a inoculação, por três vezes, de 100 µl de todas as soluções teste na cavidade alantóica, 24 horas antes da inoculação do vírus. Os ovos foram incubados por 24 horas à 33-34°C e os líquidos alantóicos foram coletados para análise do título viral, conforme descrito no item 4.2.10. Foram feitos três experimentos em triplicata.

4.2.18 Tratamento dos macrófagos J774.G8 com o Influenzinum RC

A linhagem de macrófagos murinos J774.G8, assim como outras linhagens de macrófagos, são suscetíveis à infecção por vírus influenza A (LEHMANN, 1996), e, são células responsáveis pela produção de citocinas imunoestimulatórias durante a infecção viral (JULKUNEN *et al.*, 2001). Os macrófagos, quando infectadas pelo vírus influenza, produzem citocinas, como interferon tipo I [IFN- α/β], Fator de Necrose Tumoral [TNF- α] e interleucinas do tipo IL-1, IL-6 e IL-18 (JULKUNEN *et al.*, 2001).

Para avaliação da produção de TNF- α , a linhagem de macrófagos J774.G8, mantida em meio RPMI, foi submetida a tratamentos com 10% V/V de Influenzinum RC, água 30DH e água destilada estéril. O tratamento se deu por número de estímulos. Foram feitos 6 estímulos

divididos em dois dias. Este número de estímulos equivale aos 10 dias de tratamento os quais as células MDCK foram submetidas.

Os macrófagos foram plaqueados em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^4 cels/ml e submetidos aos 6 estímulos com o Influenzinum RC e respectivos controles. Antes de serem infectados com 25 μ l de vírus influenza, os sobrenadantes foram aliquotados e congelados a -20°C até o uso. Em seguida, foi feita a infecção pelo vírus influenza e, após 24 horas, os sobrenadantes também foram aliquotados e congelados nas mesmas condições. Para este estudo, foram feitos 3 experimentos em duplicata.

4.2.18.1 Dosagem de Fator de Necrose Tumoral [TNF- α]

A dosagem do TNF- α foi feita com o sobrenadante dos macrófagos tratados, nas diferentes situações experimentais, antes e após 24 horas da inoculação viral [item 4.2.18]. Esta dosagem foi feita pelo método de ELISA, onde em placa de 96 poços, foram plaqueados 50 μ l de anticorpo de captura anti TNF de camundongo, α -m TNF [AF-410-NA], na concentração de 1 μ g/ml em PBS, por poço e incubado por 24 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, o sobrenadante foi desprezado e os poços foram lavados com solução de lavagem por 3 vezes. Foram adicionados 200 μ l por poço de solução bloqueadora e após 1 hora de incubação, em temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados por 3 vezes com a solução de lavagem.

O TNF recombinante [r-m TNF/ 410 MT] foi diluído na placa em diluições seriadas, começando com a concentração de 8 ng/ml até a concentração de 0,0156 ng/ml, de modo a ficar com 50 μ l de volume em cada poço, para construção da curva padrão. Neste momento, as amostras foram descongeladas e 50 μ l de cada uma, em duplicata, foram adicionadas aos poços. A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante

foi desprezado e os poços foram lavados com solução de lavagem por 3 vezes. A cada poço, foram adicionados 50 µl de anticorpo de detecção de camundongo, α -m TNF [BAF 410], na concentração de 0,3 µg/ml em solução diluente, com posterior incubação por 24 horas à temperatura de -4°C .

Após este período, o sobrenadante foi, novamente, desprezado e os poços foram lavados com solução de lavagem por 3 vezes. Foram adicionados 100 µl de streptavidina HRP em cada poço, na concentração de 0,05 µl/ml, previamente diluída em solução de lavagem, para incubação por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os poços foram lavados por 3 vezes com a solução de lavagem. Após este procedimento, foram adicionados 100 µl de TMB a cada poço para incubação por 30 minutos. A reação foi parada com adição de 50 µl de HCl 1N e a placa foi lida em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 450 nm (COLIGAN,1995).

5 RESULTADOS

5.1 PREPARAÇÃO E TITULAÇÃO DA AMOSTRA VIRAL

A amostra de vírus influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) foi preparada em ovos embrionados de galinha de 9 dias de incubação, por inoculação de 0,2 ml em cavidade alantóica. O título viral, após purificação, obtido por técnica de hemaglutinação foi de 10.240 UHA/ 25 μ l. A produção do bioterápico, assim como a execução de todos os experimentos, partiram desta amostra de vírus.

5.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA PARTÍCULA VIRAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

O primeiro veículo de escolha para a manipulação do bioterápico foi a solução salina tamponada [PBS]. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão [MET] indicaram que, após a primeira diluição em PBS, seguida por 100 sucussões mecânicas [1DH], as partículas de vírus influenza se mantiveram íntegras [Figura 9A]. Imagens obtidas da diluição em água destilada estéril [Figura 9B] mostraram que as partículas também se mantiveram íntegras, como no caso das soluções em PBS. Desta forma, nos demais experimentos, foi excluído o uso de PBS como solvente do bioterápico e utilizou-se água destilada estéril [Figura 9B].

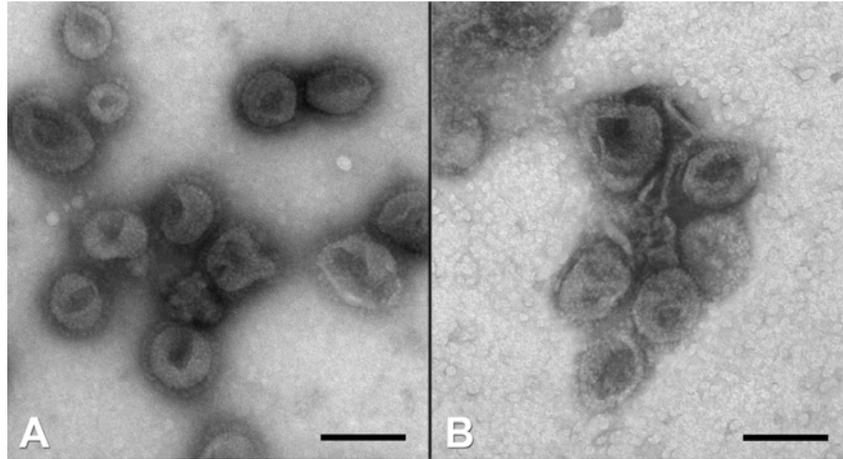


Figura 9: Microfotografia eletrônica da solução de Influenzinum RC na potência de 1DH. Em [A] o aspecto ultraestrutural das partículas virais dinamizadas em PBS. Em [B] o aspecto ultraestrutural das partículas virais dinamizadas em água. Barra de escala: 100nm.

A opção por água no lugar do PBS foi feita, também, em função da presença de substâncias como cloreto de sódio e potássio, na composição do PBS, sendo estas duas substâncias utilizadas atualmente na medicina homeopática, como medicamentos, fato que poderia interferir com os resultados obtidos.

5.3 NEGATIVAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DO INFLUENZINUM RC

5.3.1 Inoculação do Influenzinum RC em ovos embrionados

Pela técnica de hemaglutinação, foi possível detectar título viral < 2 UHA/25 μ l no sobrenadante dos ovos embrionados inoculados com o Influenzinum RC, confirmando a ausência de vírus infeccioso na potência 30DH. O título viral encontrado revelou que, nesta potência, não existiam partículas virais capazes de gerar infecção.

5.3.2 Pela detecção de proteínas e material genético viral por espectrofotometria

Pelo ensaio de espectrofotometria UV-vis foram feitas análises de todas as potências do Influenzinum RC [1 DH até 30 DH] e da água 1 DH [figura 10]. Em relação ao bioterápico, após a potência 4 DH, as leituras foram semelhantes até a última potência, 30 DH e esta leitura foi equivalente à leitura da água 1 DH, o que confirma que, nesta potência, não há mais macromoléculas do tipo ácido nucléico ou proteínas de origem viral. Os resultados de absorvância do medicamento 1DH, 2DH, 3DH, 4DH, 5DH, 30 DH e da água 30 DH representam a média de três leituras em cada comprimento de onda, 260 nm e 280 nm.

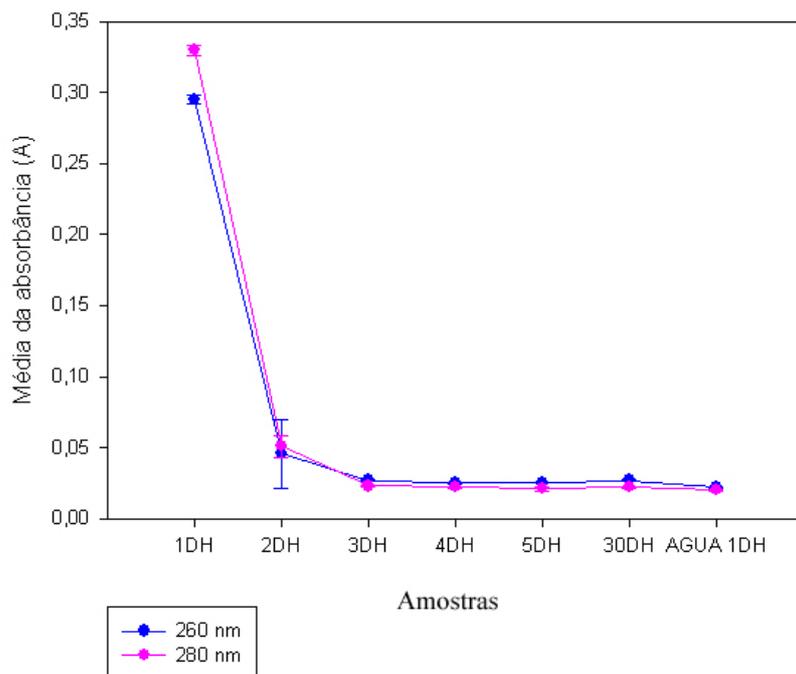


Figura 10: Absorvância de diferentes amostras de Influenzinum RC e água 1 DH obtidas em espectrofotômetro UV-Vis nos comprimentos de onda de 260 nm (linha azul) e 280 nm (linha rosa). Cada ponto representa a média de três leituras independentes feitas em cada comprimento de onda específico.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DO INFLUENZINUM RC NA LINHAGEM MDCK

A citotoxicidade do Influenzinum RC, da água e da água 30DH sobre a linhagem MDCK foi avaliada pelo ensaio de vermelho neutro. Este ensaio evidenciou que a incubação das soluções, na concentração de 10% (V/V) em relação ao meio de cultura, não induz qualquer efeito citotóxico à linhagem MDCK [Figura 11]. Desta forma, o novo medicamento desenvolvido não apresenta toxidez e não altera a viabilidade das células MDCK. Pela avaliação no programa ANOVA, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados e o controle de células (CC).

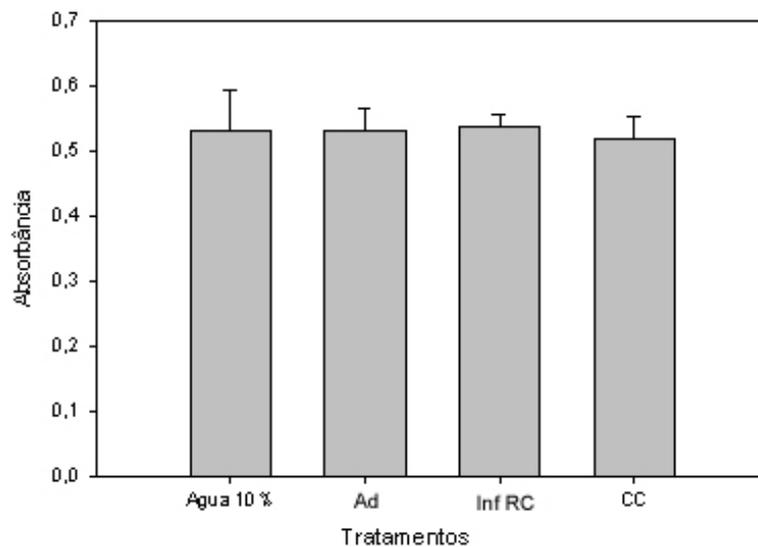


Figura 11: Avaliação da citotoxicidade do Influenzinum RC. Absorbância das células MDCK em meio de cultura (CC) e tratadas por 10 dias com Influenzinum RC (Inf RC), água dinamizada (Ad) e água destilada estéril (Água 10%). Este gráfico é a média de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata. Pela avaliação no programa ANOVA, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados e o controle de células (CC).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL CELULAR POR ENSAIOS DE MTT

Pelo ensaio de MTT foi verificada a atividade mitocondrial das células MDCK tratadas durante 10 dias [Figura 12] e 30 dias [Figura 13], nas diferentes situações experimentais. Esta análise evidenciou que as células MDCK, ao receberem o estímulo homeopático, tiveram suas taxas de respiração celular, significativamente aumentadas indicando uma ativação das enzimas mitocondriais quando as células estão sob o estímulo do Influenzinum RC. O número de estímulos não influencia a atividade mitocondrial de células MDCK [Figuras 12 e 13] uma vez que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$ ANOVA) entre o grupo tratado com Influenzinum RC e o controle de células e entre as células tratadas com água destilada estéril tanto nos grupos tratados por 10 dias quanto nos tratados por 30 dias.

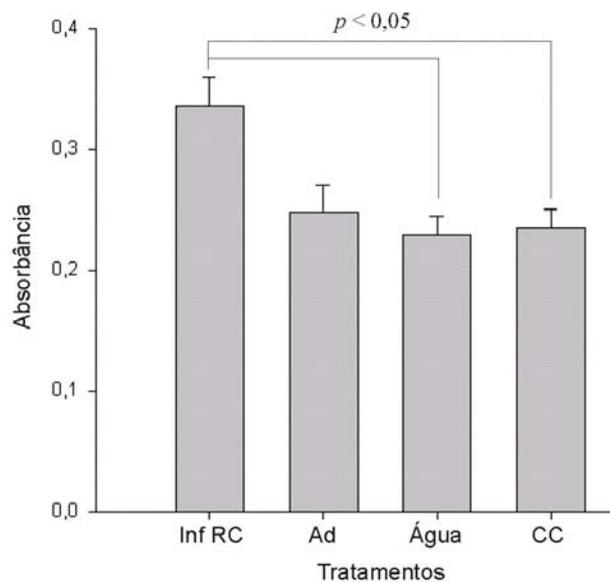


Figura 12: Avaliação da atividade mitocondrial, por MTT, nas células tratadas por 10 dias. Absorbância em 490 nm das células MDCK tratadas por 10 dias nas diferentes situações experimentais. Inf RC: células MDCK tratadas por 10 dias com Influenzinum RC; Ad: Células MDCK tratadas por 10 dias com água dinamizada 30 DH; Água: Células MDCK tratadas com água destilada estéril por 10 dias; CC: Controle de células. Média de dois experimentos independentes feitos em quintuplicata. Houve diferença significativa ($p < 0,05$ ANOVA) entre o grupo tratado com Influenzinum RC e o controle de células e entre as células tratadas com água destilada estéril.

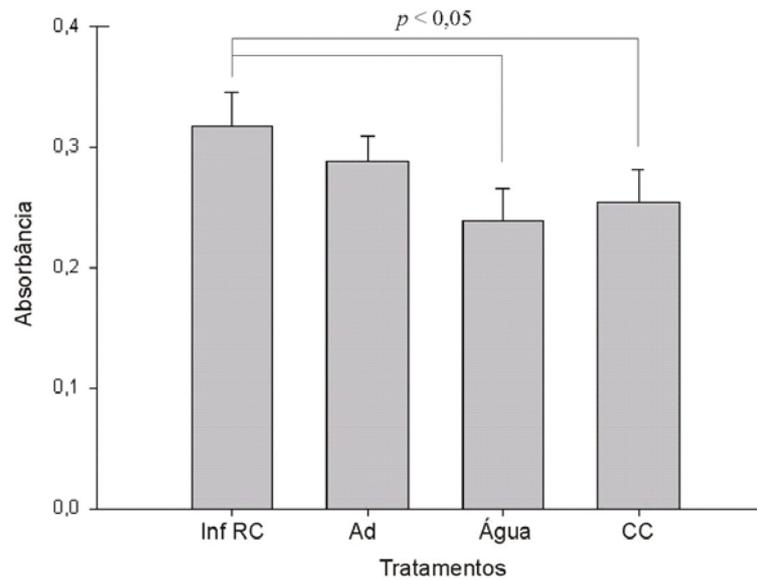


Figura 13: Avaliação da atividade mitocondrial, por MTT, nas células tratadas por 30 dias Absorbância em 490 nm das células MDCK tratadas por 30 dias nas diferentes situações experimentais. Inf RC: células MDCK tratadas por 30 dias com Influenzinum RC; Ad: Células MDCK tratadas por 30 dias com água dinamizada 30 DH; Água: Células MDCK tratadas com água destilada estéril por 30 dias; CC: Controle de células. Média de dois experimentos independentes feitos em quintuplicata. Houve diferença significativa ($p < 0,05$ ANOVA) entre o grupo tratado com Influenzinum RC e o controle de células e entre as células tratadas com água destilada estéril.

5.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDCK PELO MÉTODO DE GIEMSA

As células MDCK tratadas com o Influenzinum RC mostraram uma diferença interessante em seus nucléolos e um aumento de vacúolos citoplasmáticos, revelados pelo corante Giemsa [Figuras 14–20]. Morfologicamente as células MDCK apresentaram alguns vacúolos citoplasmáticos ao redor do núcleo e presença de dois a três nucléolos por célula. Entretanto, após o tratamento, as células mostraram um aumento no número de nucléolos os quais apresentaram um halo claro perinucleolar, mais evidenciado nas células tratadas por 30 dias [Figura 18]. Adicionalmente, os vacúolos citoplasmáticos se tornaram mais evidentes e espalhados por todo o citoplasma, após o tratamento. Este experimento foi feito com células não tratadas [Figura 14A-B] e células tratadas com Influenzinum RC por 1 dia / 1 estímulo

[Figura 15C-D]; 5 dias / 3 estímulos [Figura 16E-F]; 10 dias / 6 estímulos [Figura 17G-H]; 30 dias / 18 estímulos [Figura 18I-J]; Células tratadas com água por 10 dias / 6 estímulos [Figura 19K-L] e com água dinamizada 30 DH por 10 dias / 6 estímulos [Figura 20M-N].

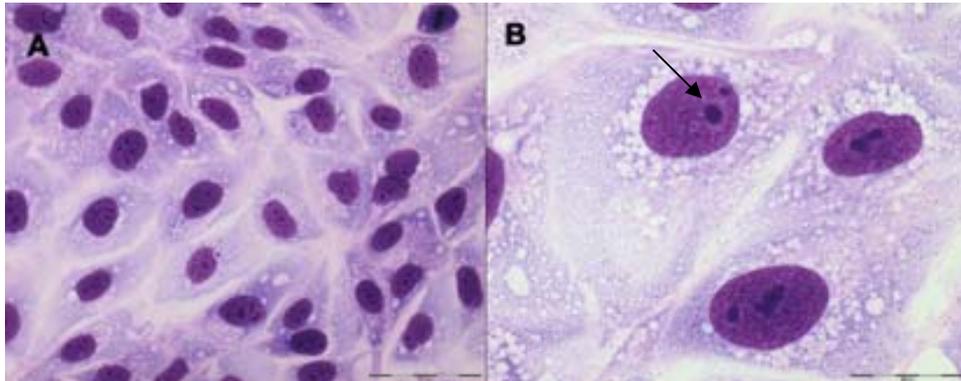


Figura 14: Microscopias ópticas de células MDCK não tratadas, coradas com Giemsa e observadas em diferentes aumentos, 40X [A] e 100X [B]. A seta [figura 14B] aponta o detalhe de um nucléolo. Escala: 50 μ m [A]; 20 μ m [B].

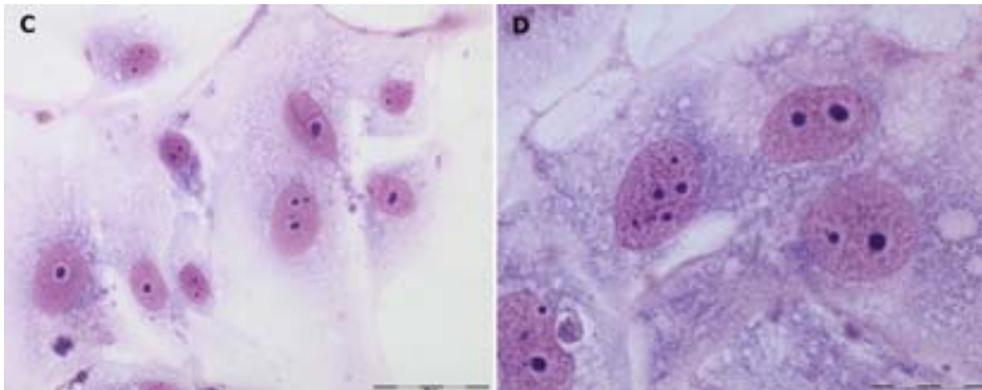


Figura 15: Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 1 dia [1 estímulo], coradas por Giemsa e observadas em diferentes aumentos, 40X [C] e 100X [D]. Escala: 50 μ m [C]; 20 μ m [D].

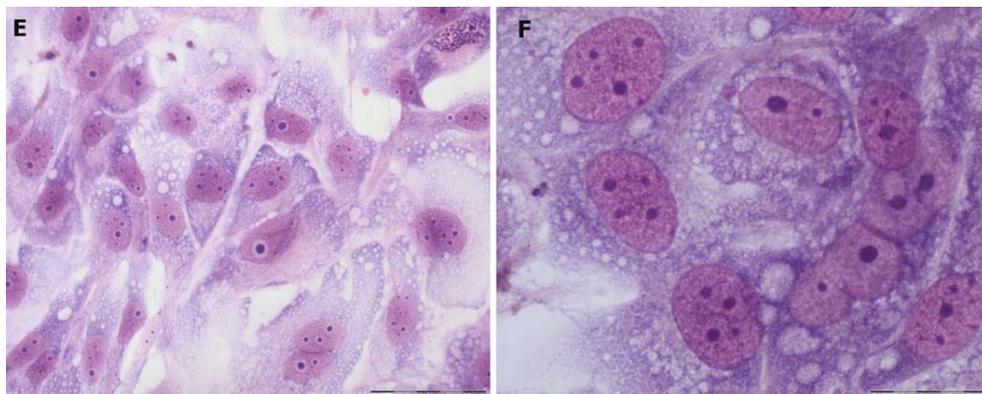


Figura 16: Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 5 dias [3 estímulos], coradas por Giemsa e observadas em diferentes aumentos, 40X [E] e 100X [F]. Escala: 50 μ m [E]; 20 μ m [F].

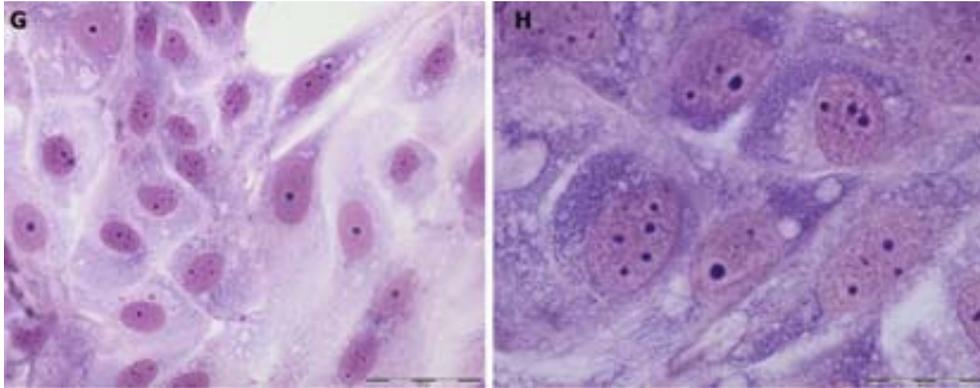


Figura 17: Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 10 dias [6 estímulos], coradas por Giemsa e observadas em diferentes aumentos, 40X [G] e 100X [H]. Escala: 50 μ m [G]; 20 μ m [H].

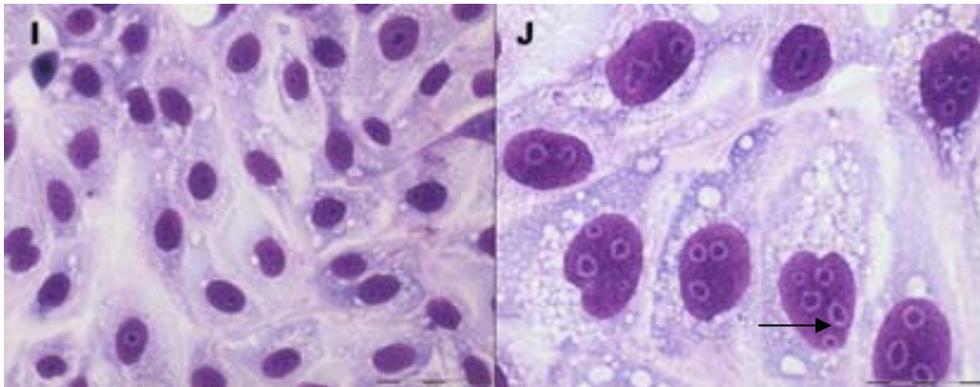


Figura 18: Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 30 dias [18 estímulos], coradas por Giemsa e observadas em diferentes aumentos, 40X [I] e 100X [J]. A seta aponta para os halos perinucleolares ao redor dos nucléolos. Escala: 50 μ m [I]; 20 μ m [J].

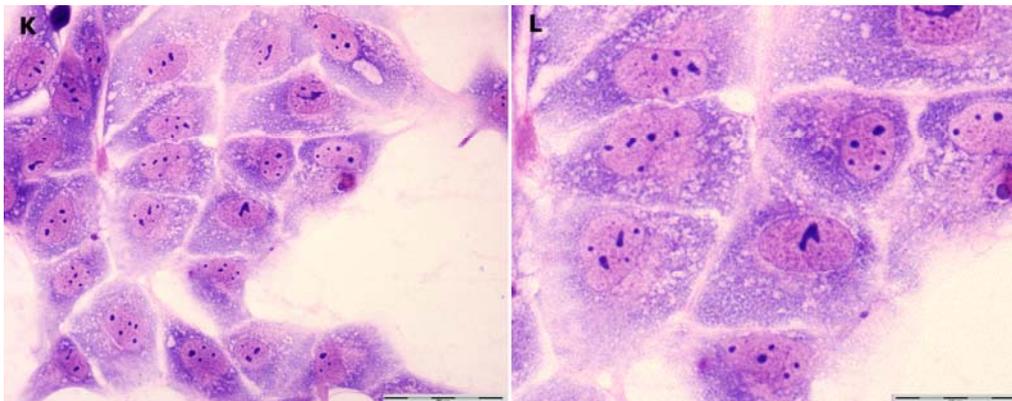


Figura 19: Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com água a 10% por 10 dias [6 estímulos], coradas por Giemsa e observadas em diferentes aumentos, 40X [K] e 100X [L]. Escala: 50 μ m [K]; 20 μ m [L].

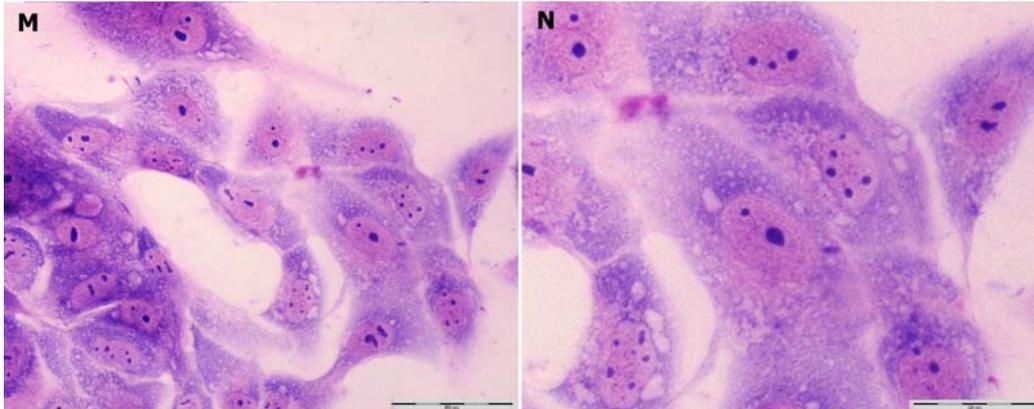


Figura 20: Microscopias ópticas de células MDCK tratadas com água 30DH a 10% por 10 dias [6 estímulos], coradas por Giemsa e observadas em diferentes aumentos, 40X [M] e 100X [N]. Escala: 50 μm [M]; 20 μm [N].

Por esta análise, foi possível verificar que as alterações celulares decorrentes do tratamento por 5, 10 e 30 dias com Influenzinum RC foram semelhantes entre si. Em relação às células tratadas com água [Figura 19] e água 30DH [Figura 20] não foi possível verificar alterações morfológicas significativas. Este experimento foi repetido por 2 vezes sendo observadas cerca de 1.000 células em cada situação.

5.6.1 Quantificação do número de mitoses na linhagem MDCK

O cálculo do número de mitoses foi feito a partir da contagem de 1.000 células por lâmina, feito em triplicata. Em uma população de 3.000 células foram contadas aquelas em típico processo de mitose, como sinalizado na figura 21. O gráfico [Figura 22] foi construído utilizando-se a média do número de mitoses nas diferentes situações experimentais, considerando-se o erro. Pelo teste T de *Student*, pode-se observar que células MDCK tratadas com Influenzinum RC [Inf RC] por 30 dias apresentaram diferença estatisticamente significativa [$p < 0,05$] em relação ao controle de células [CC] e em relação ao controle de células tratadas com água 30DH [Ad] no mesmo período.



Figura 21: Aspecto típico da mitose em células MDCK [Controle de células]. Em destaque, a formação de duas novas células com seus respectivos citoplasmas e cromossomos.
Escala: 20 μm .

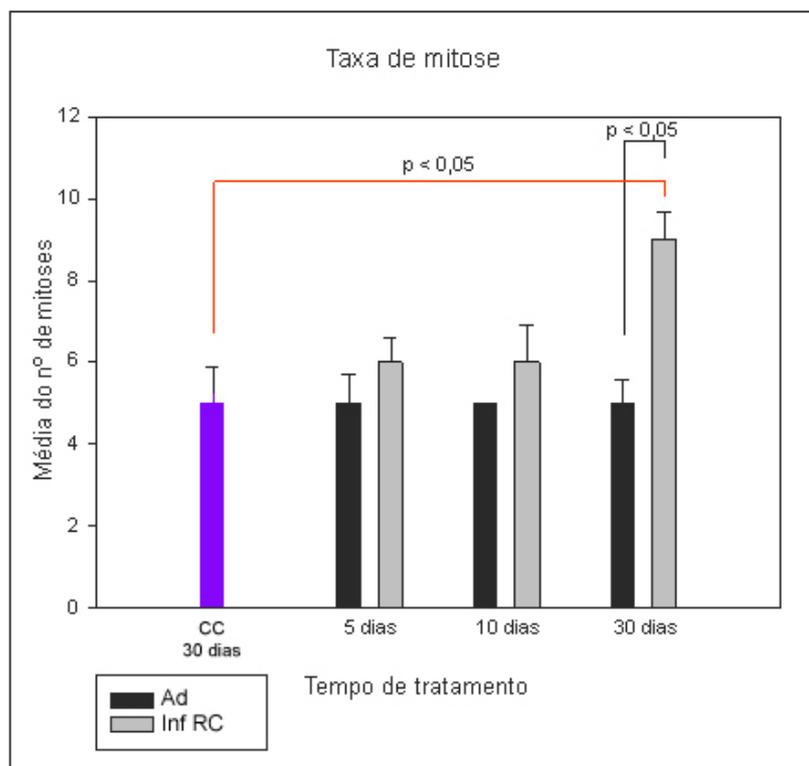


Figura 22: Representação gráfica da taxa de mitose das células MDCK tratadas com Influenzinum RC [barras cinzas] por 5, 10 e 30 dias. Pelo teste T de *Student*, pode-se observar que células MDCK tratadas com Influenzinum RC [Inf RC/ barra cinza] por 30 dias apresentaram diferença significativa [$p < 0,05$] em relação ao controle de células [CC/ barra azul] e em relação ao controle de células tratadas com água 30DH [Ad/ barra preta] no mesmo período.

O teste de correlação de *Pearson* mostrou uma tendência em aumentar o número de mitoses à medida que se aumenta o tempo de tratamento com o Influenzinum RC ($p < 0,03$).

O mesmo resultado foi observado com o teste de correlação de *Spearman* ($p < 0,05$).

5.6.2 Quantificação do número de nucléolos na linhagem MDCK

As alterações celulares induzidas pelo estímulo homeopático incluíram o aumento do número de nucléolos nas células MDCK. Para a quantificação deste aumento, foram utilizadas as lamínulas preparadas por Giemsa das células MDCK tratadas por 10 dias, como descrito anteriormente [Figura 23]. O número de nucléolos foi quantificado através da contagem do número de células e o total de nucléolos encontrados em cada campo analisado. No total, foram analisadas, 1.000 células. Este procedimento foi seguido para quatro situações experimentais, a saber: células MDCK tratadas por 10 dias com Influenzinum RC [Inf RC]; células MDCK tratadas por 10 dias com água dinamizada 30 DH [Ad]; células MDCK tratadas por 10 dias com água destilada estéril [Água]; células MDCK mantida em meio de cultura por 10 dias [CC]. A análise dos dados pelo programa ANOVA indicou que o número de nucléolos nas células MDCK tratadas com Influenzinum RC foi estatisticamente superior ao número de nucléolos quantificados em todas as outras situações experimentais.

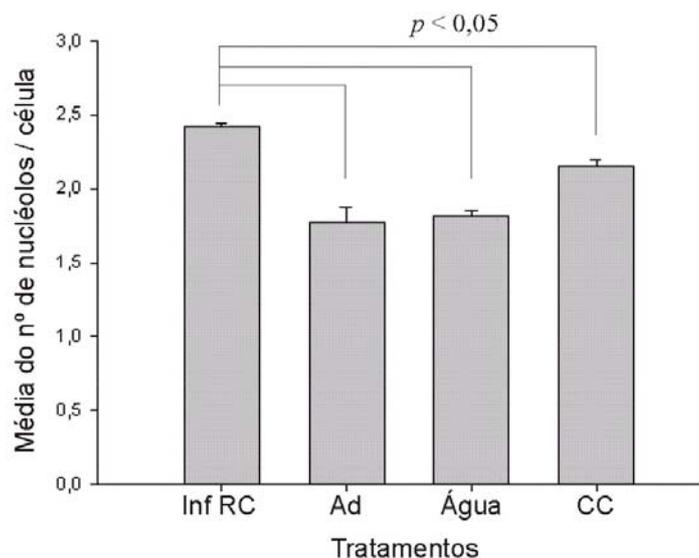


Figura 23: Representação gráfica da média de nucléolos por célula nas diferentes situações experimentais. A média de nucléolos nas células MDCK tratadas com Influenzinum [Inf RC] foi estatisticamente superior às outras situações experimentais ($p < 0,05$).

5.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDCK PELO MÉTODO *OIL RED*

Como as alterações celulares, pelo método Giemsa, foram observadas a partir de 5 dias, a coloração por *Oil Red*, que é um corante que apresenta grande solubilidade para substâncias lipofílicas, foi feita somente no tempo de 10 dias de tratamento [Figura 24A-D]. Após a coloração, os corpos lipídicos ficam vermelhos e, por microscopia óptica, podem ser quantificados. A quantificação foi feita pela contagem do número de corpos lipídicos por célula tendo sido analisado um total de 10 campos por cada lamínula preparada [Figura 25]. Os valores quantificados foram plotados em um gráfico no qual foi inserida a média do número de corpos lipídicos contados em cada uma das lamínulas. Como foram preparadas três lamínulas de cada situação experimental e contados um total de 10 campos por lamínula, no eixo das ordenadas foram plotadas esta média e no eixo da abscissa cada uma das situações experimentais [Figura 25].

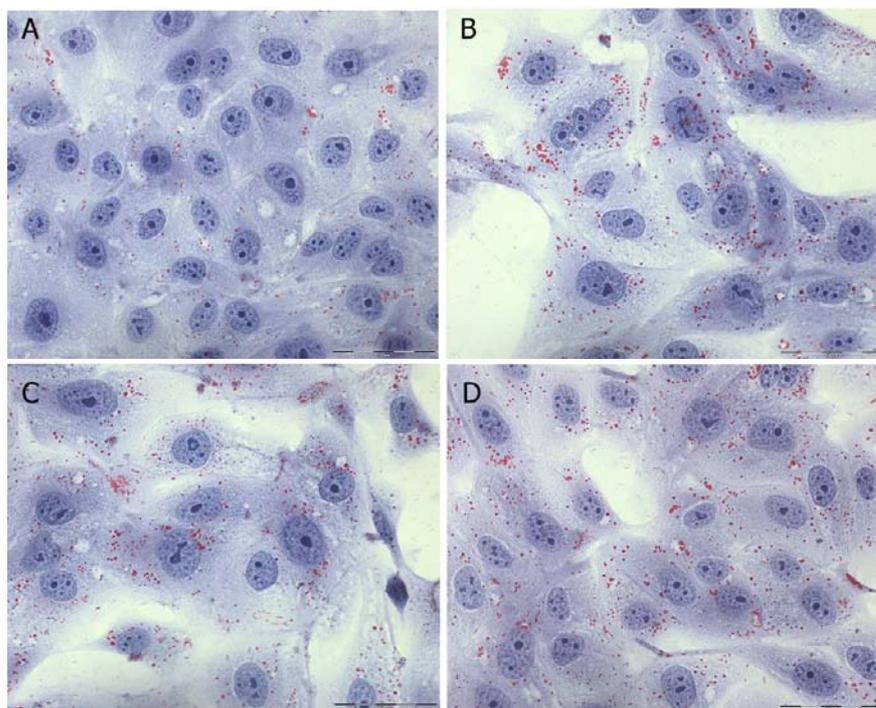


Figura 24: Coloração das células MDCK por *Oil Red* para quantificação dos corpos lipídicos e avaliação por microscopia óptica. A: Células MDCK tratadas por 10 dias com Influenzinum RC; B: Células MDCK tratadas por 10 dias com água 30DH; C: Células MDCK tratadas por 10 dias com água destilada estéril; D: Controle de células/ Células MDCK mantidas em meio de cultura por 10 dias. Escala: 50 μ m.

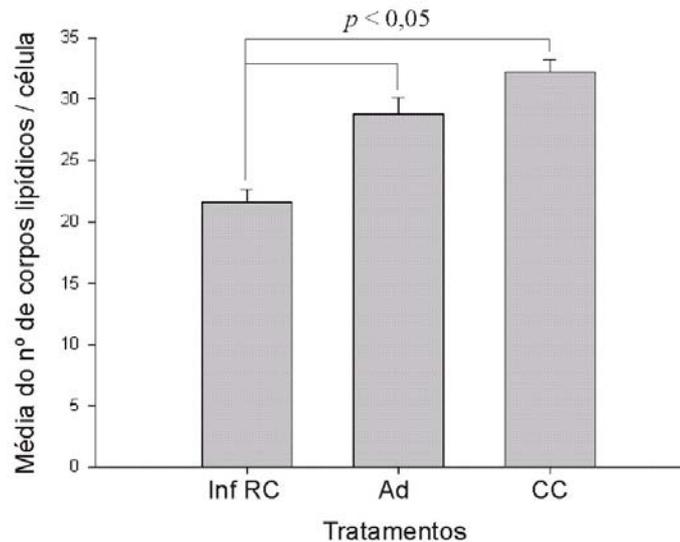


Figura 25: Quantificação dos corpos lipídicos em células MDCK nas diferentes situações experimentais. Inf RC: células MDCK tratadas com Influenzinum RC, por 10 dias. Ad: células MDCK tratadas com água 30 DH por 10 dias. CC: Controle de células. A média de corpos lipídicos nas células MDCK tratadas com Influenzinum [Inf RC] foi inferior às outras situações experimentais, com diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos experimentais ($p < 0,05$).

A análise dos dados por ANOVA mostrou que o número de corpos lipídicos após o tratamento com Influenzinum RC diminuiu significativamente quando comparado aos controles ($p < 0,05$).

5.8 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDCK POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As células MDCK submetidas ao tratamento com Influenzinum RC por 10 dias foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão [Figura 26] sendo esta morfologia comparada àquela de células MDCK tratadas com água dinamizada e mantidas em meio de cultura [controle de células]. Nenhuma alteração celular significativa foi observada após incubação com Influenzinum RC. A análise das micrografias eletrônicas evidenciou organelas celulares inalteradas e constituintes citoplasmáticos e membranares preservados nas três situações experimentais.

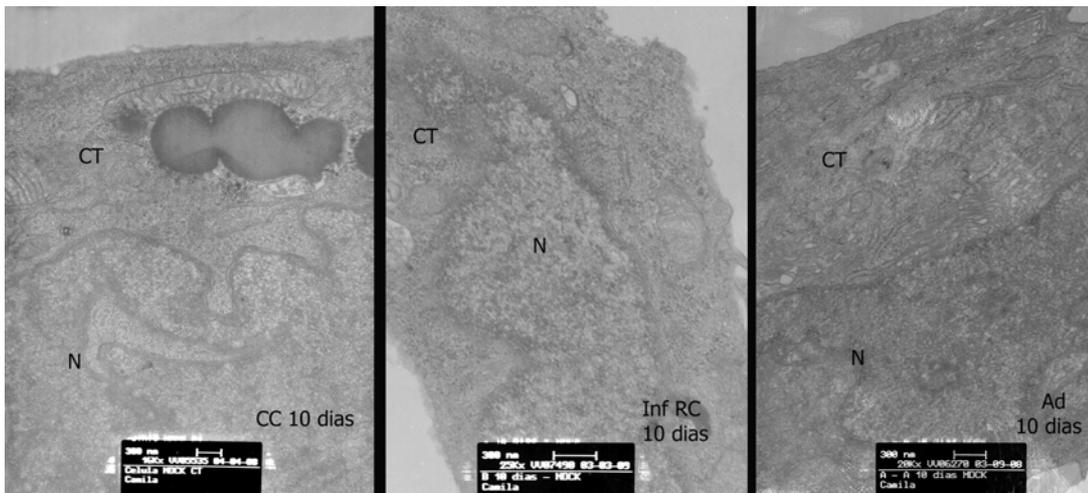


Figura 26: Microscopia eletrônica de transmissão das células MDCK tratadas nas diferentes situações experimentais. Análise das células tratadas com Influenzinum RC por 10 dias [Inf RC], com água dinamizada [Ad] por 10 dias e o controle de células de 10 dias [CC]. Pode ser verificado o núcleo [N] e o citoplasma [CT] onde estão as organelas preservadas. Escala: 300 nm.

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOFRUTOCINASE-1 NAS CÉLULAS MDCK

Na via glicolítica, que tem todas as suas reações ocorrendo no citossol da célula, a primeira etapa é a conversão de glicose a frutose 1, 6 bisfosfato. Nesta etapa, a glicose é, primeiramente, fosforilada pelo ATP e catalisada por hexocinase à glicose 6-fosfato. Esta glicose 6-fosfato é isomerizada pela fosfoglicose isomerase à frutose 6-fosfato e, por uma fosforilação pelo ATP, catalisada pela fosfofrutocinase, se transforma em frutose 1,6 bisfosfato. A via glicolítica tem a função de degradar glicose para formação de ATP.

A enzima fosfofrutocinase-1 [PFK-1] é uma enzima importante nesta via. Quando sua atividade está diminuída, ocorre um acúmulo de glicose 6-fosfato que pode ser desviada para a via das pentoses-fosfato. Nesta via, ocorre a geração de NADPH quando a glicose 6-fosfato é oxidada a ribose 5-fosfato. Esta pentose e seus derivados são componentes de biomoléculas muito importantes, como ATP, RNA e DNA. Todas essas reações também ocorrem no citossol. Desta forma, a avaliação da atividade da enzima PFK-1 foi importante para o

presente estudo em função das alterações na viabilidade celular, no número de mitoses e nucléolos, dentre outras, induzidos pelo Influenzinum nas células MDCK.

Pelas figuras 27, 28 e 29, pode-se observar a média da atividade da enzima PFK-1 nas diferentes situações experimentais e nos diferentes tempos de tratamento. Foram feitos três experimentos independentes em triplicata e os dados foram analisados pelo programa ANOVA.

A atividade da PFK-1 nas células MDCK tratadas por 5 dias [Figura 27] e por 10 dias [Figura 28], nas diferentes situações experimentais, não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa [$p > 0,05$] entre os grupos. Porém, pode-se observar que, nas células tratadas por 10 dias [Figura 28] ocorre uma diminuição na atividade desta enzima, quando as células foram tratadas com Influenzinum RC e com água dinamizada 30 DH.

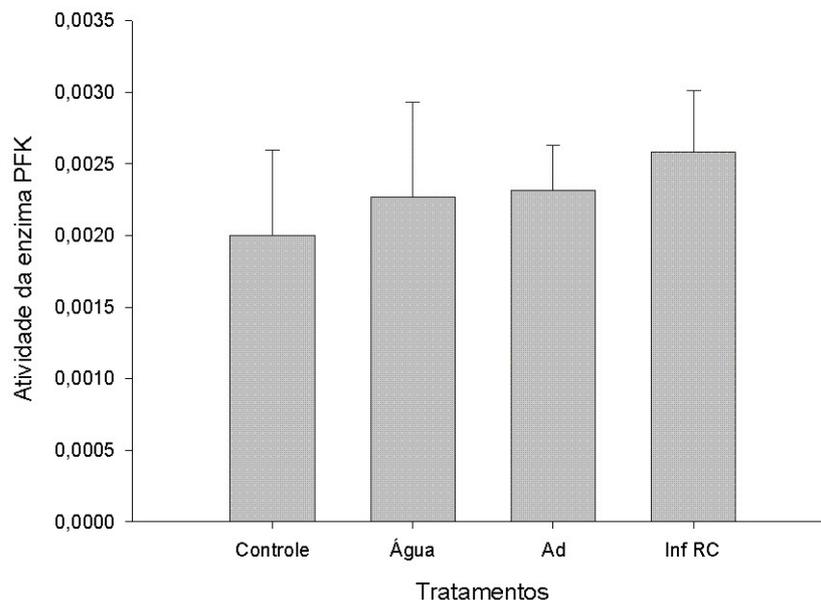


Figura 27: Atividade da enzima PFK-1 das células MDCK submetidas a 5 dias de tratamento nas diferentes situações experimentais. Controle: Células MDCK mantidas em meio de cultura por 5 dias; Água: células MDCK tratadas com água por 5 dias; Ad: células MDCK tratadas com água 30 DH por 5 dias; Inf RC: células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 5 dias. Os dados foram analisados pelo programa ANOVA e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi obtida entre os grupos.

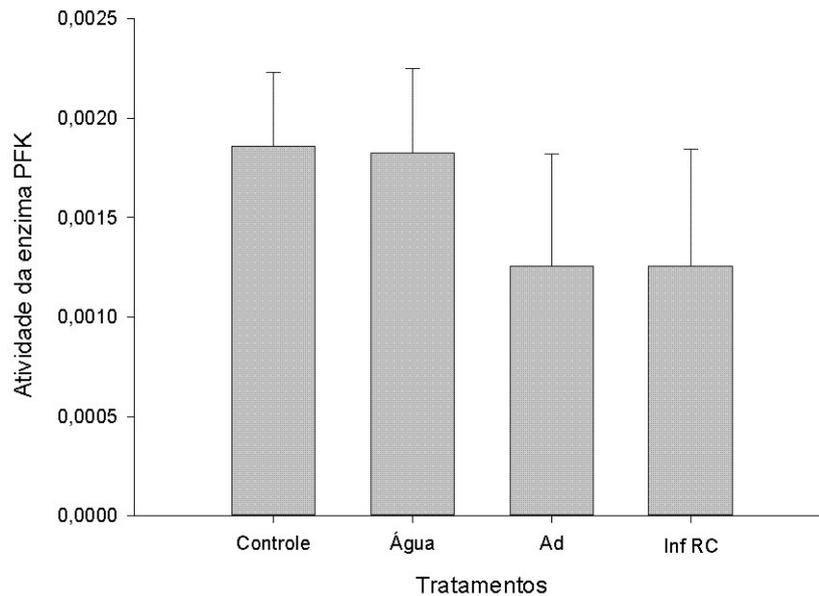


Figura 28: Atividade da enzima PFK-1 das células MDCK submetidas a 10 dias de tratamento nas diferentes situações experimentais. Controle: células MDCK mantidas em meio de cultura por 10 dias; Água: células MDCK tratadas com água por 10 dias; Ad: células MDCK tratadas com água 30 DH por 10 dias e Inf RC: células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 10 dias. Os dados foram analisados pelo programa ANOVA e nenhuma diferença significativa foi obtida entre os grupos.

Entretanto, a atividade da enzima PFK-1 nas células MDCK tratadas por 30 dias [Figura 29] mostrou-se alterada, sendo revelada uma diferença estatisticamente significativa [$p < 0,05$] entre os grupos. Verifica-se que a atividade da PFK-1 nas células mantidas em meio [controle] durante 30 dias se manteve constante quando comparada às incubações por 5 e 10 dias. Por outro lado, a atividade da PFK-1 nas células tratadas pelo Influenzinum RC induziu uma redução de 47,92% quando comparada às células tratadas, nas mesmas situações, por 10 dias. Os dados foram analisados pelo programa ANOVA e houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a atividade da enzima PFK-1 nas células tratadas com Influenzinum RC em relação às tratadas com água e ao controle de células.

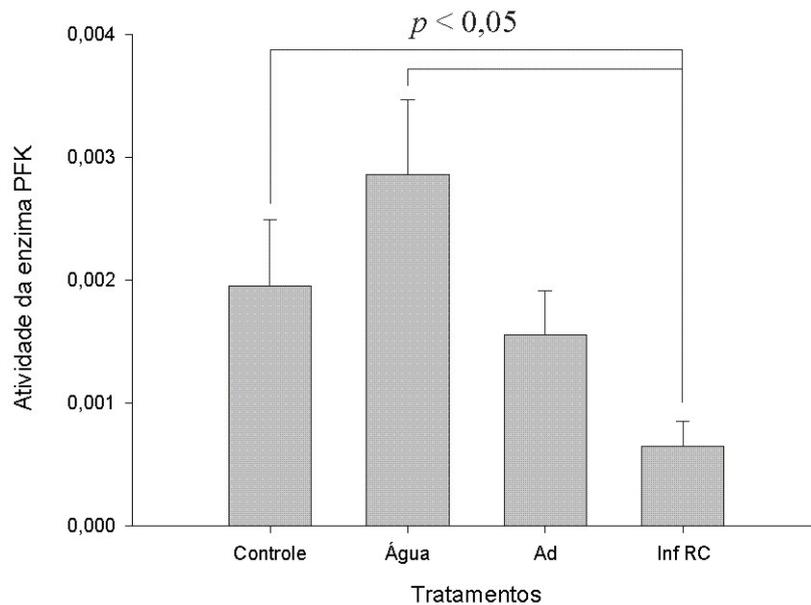


Figura 29: Atividade da enzima PFK-1 das células MDCK submetidas a 30 dias de tratamento nas diferentes situações experimentais. Controle: células MDCK mantidas em meio de cultura por 30 dias; Água: células MDCK tratadas com água por 30 dias; Ad: células MDCK tratadas com água 30 DH por 30 dias e Inf RC: células MDCK tratadas com Influenzinum RC por 30 dias. Os dados foram analisados pelo programa ANOVA e houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a atividade da enzima PFK-1 nas células tratadas com Influenzinum RC em relação às tratadas com água e ao controle de célula.

5.10 AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE VIRAL

5.10.1 Pelo ensaio de vermelho neutro

Após a verificação de que o vírus em água se mantinha íntegro, todas as amostras de Influenzinum RC foram manipuladas em água destilada estéril. Inicialmente, foram feitos ensaios com diferentes concentrações de bioterápico, água 30DH e água destilada estéril, utilizando-se 1%, 5% e 10% destas soluções em relação ao meio de cultura. Como foi observado que a concentração de 10% não era citotóxica, decidiu-se trabalhar com esta concentração, uma vez que é a concentração utilizada na preparação de diferentes formas farmacêuticas homeopáticas. Através do ensaio com vermelho neutro, pôde-se observar que diferentes esquemas terapêuticos com Influenzinum RC, ou seja, pré-tratamento das células MDCK por 10 dias e o pré- e pós-tratamento [10 dias de pré-tratamento e 1 dia de pós-

tratamento] das células, não foram capazes de promover proteção às células MDCK frente ao vírus, quando comparados ao controle positivo [somente vírus em células MDCK]. Esta confirmação foi obtida utilizando-se o programa ANOVA onde foi demonstrado que não houve diferença estatisticamente significativa [$p > 0,05$] entre as células tratadas com o Influenzinum RC, com a água 30DH e com a água destilada estéril, em comparação ao controle de vírus, em todas as diluições [título viral] testadas.

No grupo de pós-tratamento [infectado pelo vírus e tratado por 24 horas com o bioterápico] não foi possível observar nenhuma diferença na viabilidade celular, quando comparado ao controle de vírus.

5.10.2 Pelo método de Reed Müench

Os resultados obtidos pelo vermelho neutro foram confirmados pelo cálculo de TCID₅₀ através do método de Reed & Müench (1938), utilizando-se como parâmetro o efeito citopático. Não houve diferença entre os grupos, conforme demonstrado na Tabela 2. Para este ensaio, foram feitos três experimentos, em quintuplicata, e os resultados obtidos foram iguais em todos os experimentos.

Devido à ausência de qualquer efeito do Influenzinum RC sobre o processo infeccioso, uma vez que os títulos virais mantiveram-se inalterados a $10^{4,5}$ TCID₅₀ / 25 µl, a percentagem de inibição foi igual a zero.

Tabela 2: Cálculo do título viral [TCID₅₀] pelo método de Reed & Muench. CV: Controle de vírus; Influenzinum RC: células MDCK tratadas por 10 dias com Influenzinum RC na concentração de 10%; Ad: células MDCK tratadas por 10 dias com água dinamizada 30DH na concentração de 10%; Água: células MDCK tratadas por 10 dias com água na concentração de 10%. A tabela mostra que não houve diferença entre os grupos.

TÍTULO VIRAL				
Experimento	CV	Influenzinum RC	Ad	Água
1º	10 ^{4,5} TCID ₅₀ /25µl			
2º	10 ^{4,5} TCID ₅₀ /25µl			
3º	10 ^{4,5} TCID ₅₀ /25µl			

5.10.3 Pela metodologia de imunofluorescência indireta

A partir da observação feita por microscopia óptica, nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao efeito citopático verificado em todas as preparações pré-tratadas e pós-tratadas, assim como no controle positivo. A verificação do efeito citopático é feita visualmente: em microscópio é observado que as células se desprendem da placa e se tornam arredondadas quando são infectadas pelo vírus.

A metodologia de imunofluorescência indireta foi realizada utilizando-se um tempo de pré-tratamento igual a 30 dias, durante o qual o Influenzinum RC foi repostado durante os sucessivos repiques da linhagem MDCK. Nestes experimentos, foi possível observar uma redução na fluorescência quando as células eram tratadas com o bioterápico e comparadas ao grupo controle positivo e ao grupo que foi tratado apenas com a água 30DH [Figura 25 A-F]. Porém, a discreta redução de fluorescência observada não permite afirmar que houve uma diminuição na capacidade de infecção viral pela ação do Influenzinum RC, uma vez que, em ensaios quantitativos [ensaio de vermelho neutro e de TCID₅₀], este fato não pode ser observado.

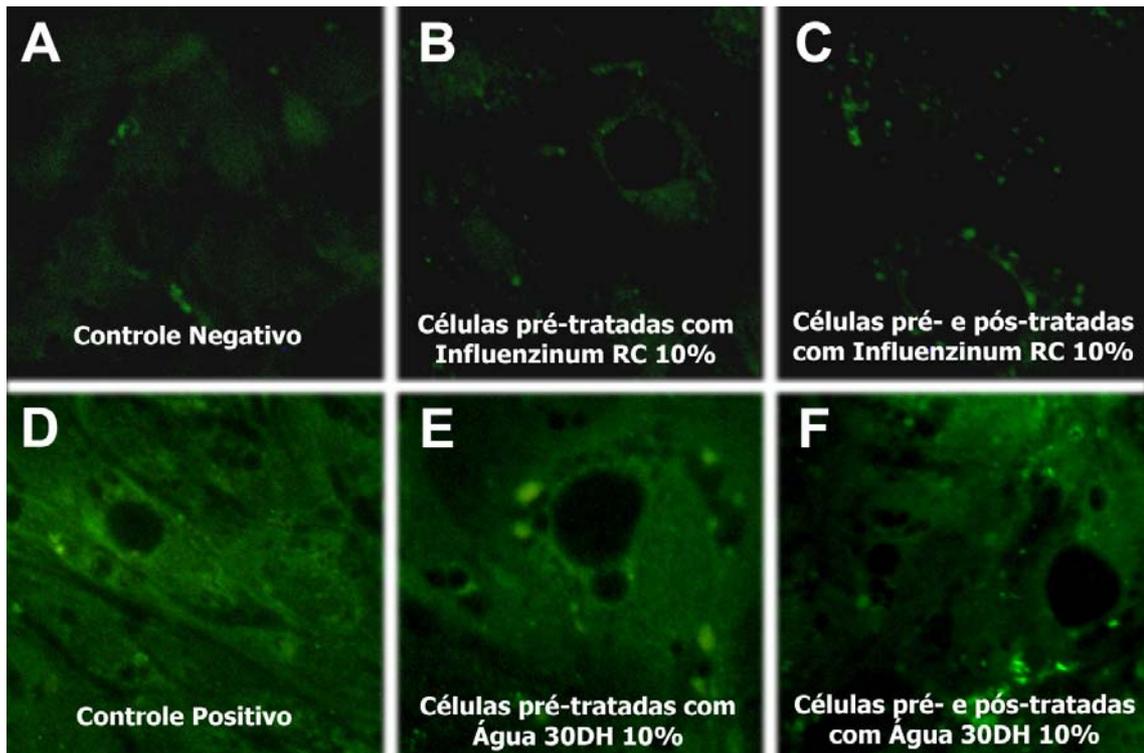


Figura 30: Microscopia de fluorescência das células MDCK incubadas com Influenzinum RC ou água 30 DH por 30 dias, detectada por análise de fluorescência usando antisoro policlonal de coelho para vírus Influenza A e anticorpo IgG-FITC anti-coelho, como descrito anteriormente. A-Controle Negativo [Controle de células]; B: Células pré-tratadas por 30 dias com Influenzinum RC; C: Células pré-tratadas por 30 dias, incubadas com 100 μ l de vírus influenza e pós-tratadas por 1 dia; D: Controle Positivo [Controle de vírus]; E: Células pré-tratadas com água 30DH por 30 dias; F: Células pré-tratadas com água 30 DH, incubadas com 100 μ l de vírus e pós-tratadas por 1 dia.

5.11 EFEITO DO INFLUENZINUM RC SOBRE OS VÍRUS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.11.1 Por reação de inibição de hemaglutinação

Neste experimento, foi avaliada a atividade da glicoproteína viral hemaglutinina, nas diferentes situações experimentais. Esta glicoproteína é responsável pela adsorção do vírus à célula e quando a sua atividade é comprometida o vírus não consegue prosseguir a infecção. Como resultado de inibição, as hemácias humanas, usadas como reveladores, precipitam ao invés de aglutinarem entre si.

Por este experimento, não foi possível verificar ação significativa dos diferentes grupos experimentais no processo de adsorção do vírus à célula. Estes experimentos foram realizados em paralelo aos controles de vírus, hemácias e medicamento [puro e 1:2] e indicaram que o Influenzinum RC não atua como inibidor do processo de adsorção do vírus-célula.

5.11.2 Por avaliação da atividade sialidásica viral

Neste experimento foi avaliada a atividade da glicoproteína viral, neuraminidase, nas diferentes situações experimentais. Esta glicoproteína é responsável pela clivagem dos resíduos de ácido siálico promovendo, então, a liberação do vírus influenza da célula infectada para o prosseguimento da infecção em novas células. Caso sua ação esteja comprometida, o vírus não consegue prosseguir a infecção e, no experimento, não se observa fluorescência emitida pela liberação de 4-metilumbeliferona, analisada por fluorimetria. Por este experimento, não foi possível verificar ação significativa de nenhum dos grupos experimentais como inibidores da atividade sialidásica viral.

5.12 EFEITO DO INFLUENZINUM RC SOBRE OS OVOS EMBRIONADOS

A ação do Influenzinum RC sobre os ovos embrionados foi verificada com o objetivo de avaliar se o pré-tratamento dos ovos seria capaz de modificar o título viral quando os mesmos eram inoculados com vírus para obtenção de massa viral. As inoculações das soluções [Influenzinum RC, água 30DH e água destilada estéril] nos ovos embrionados, não alteraram o título viral e, desta forma, a produção de vírus não foi alterada em nenhuma das

situações experimentais, quando comparada ao controle de vírus [ovos embrionados inoculados por vírus].

5.13 TRATAMENTO DOS MACRÓFAGOS J774.G8 COM INFLUENZINUM RC

Os macrófagos são células susceptíveis à infecção viral e, frente a uma infecção por vírus influenza A, os mesmo liberam citocinas imunoestimulatórias.

5.13.1 Dosagem de Fator de Necrose Tumoral [TNF- α]

Uma das citocinas liberadas pelos macrófagos quando ocorre uma infecção por influenza A é o Fator de Necrose Tumoral (TNF). Para este experimento, os macrófagos foram estimulados 6 vezes durante 2 dias com o Influenzinum RC, água 30DH e água destilada estéril e o sobrenadante foi recolhido para análise, antes e após 24 horas a infecção por influenza.

Os dados obtidos sob a forma de absorbância, foram transformados em dados de concentração de TNF- α [ng / ml], tomando-se como base a absorbância de TNF- α -padrão, conforme descrito no item 4.2.18.1.

Os sobrenadantes da cultura dos macrófagos J774.G8 foram analisados antes e após 24 horas da adição do vírus influenza. Desta forma, foi determinado que CC é o sobrenadante do controle de células não tratadas; Inf é o sobrenadante dos macrófagos tratados com o Influenzinum RC com 6 estímulos, antes da infecção por influenza; CV é o sobrenadante dos macrófagos não tratados após a infecção por influenza; Inf V é o sobrenadante dos macrófagos tratados com Influenzinum RC após a infecção por influenza. Foram realizados

três experimentos independentes e os dados foram plotados sob a forma de proporção em relação a concentração do TNF- α no sobrenadante do controle de células [Figura 31].

Os dados referentes à concentração de TNF- α no sobrenadante de macrófagos tratados com água dinamizada 30 DH e com água destilada estéril não estão presentes no gráfico, pois não houve diferença significativa, nestas situações experimentais, quando comparados aos sobrenadantes do controle de células, macrófagos não tratados, e do controle de vírus.

Na figura 31 pode ser observado que antes da infecção pelo vírus influenza, a produção de TNF- α pelos macrófagos foi baixa [CC]. Entretanto, após a infecção viral, a concentração de citocina no sobrenadante dos macrófagos pré-tratados pelo Influenzinum RC [Inf V] foi significativamente aumentada [$p < 0,05$], quando comparada às células não tratadas e infectadas pelo vírus [CV] e às células tratadas pelo Influenzinum RC, após a infecção [Inf V].

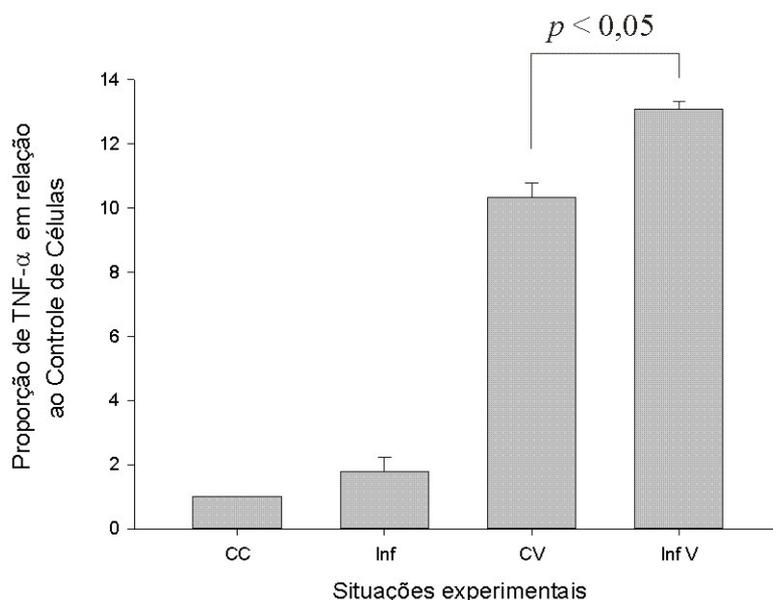


Figura 31: Produção de TNF- α pelos macrófagos J774.G8 nas diferentes situações experimentais em relação ao sobrenadante do controle de células. Quantidade de TNF- α produzida no sobrenadante do controle de células foi considerada 100%. CC: sobrenadante do controle de células não tratadas; Inf: sobrenadante dos macrófagos tratados com Influenzinum RC com 6 estímulos antes da infecção por influenza; CV: sobrenadante dos macrófagos não tratados após a infecção por influenza; Inf V: sobrenadante dos macrófagos tratados com Influenzinum RC após a infecção por influenza. Os dados foram analisados pelo programa ANOVA e houve diferença estatisticamente significativa [$p < 0,05$] entre a concentração de TNF- α no sobrenadante das células tratadas pelo Influenzinum RC após a infecção e as células não tratadas e após a infecção.

6 DISCUSSÃO

A homeopatia é um dos métodos de medicina complementar mais utilizado no mundo e a OMS vem estimulando o uso da Medicina Complementar e Alternativa nos sistemas de saúde de forma integrada, com os tratamentos clássicos. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou recentemente a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde” (BRASIL, 2006), com o intuito de incentivar e apoiar projetos de assistência, ensino e pesquisas homeopáticas nas diversas esferas do Sistema Único de Saúde, o que representa um grande avanço para homeopatia em nosso país.

O Brasil vem ocupando lugar de destaque dentro do cenário mundial com um grande número de trabalhos científicos e de relatos clínicos significativos com o uso de diversas preparações homeopáticas, incluindo os bioterápicos (GOMES et al., 1998 a,b; ALMEIDA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2006; SILVA et al., 2005; BRENER et al., 2000; COSTA et al., 2008; AQUINO et al., 2008; VARRICCHIO et al., 2008; HOLANDINO et al., 2008a, b; ALEIXO et al., 2008; FONTES, 2005a; CAVALCANTI et al., 2003).

Uma das razões pelas quais a homeopatia vem ocupando lugar de destaque nos cenários nacional e internacional é o fato desta terapia figurar como uma forma de tratamento seguro e barato para antigas patologias, como a Doença de Chagas (HOLANDINO, 2008c) a gripe e outras (VICKERS & SMITH, 2006). O interesse das autoridades sanitárias para infecções gripais tem crescido, em parte, devido à grande mutabilidade que os vírus apresentam. Esta alta taxa de mutação faz com que estes microorganismos se tornem resistentes às drogas antivirais com muita facilidade o que vem despertando o interesse de muitos grupos de pesquisa na busca por novas drogas antivirais e terapêuticas eficazes, capazes de destruir as novas espécies virais que aparecem no cenário mundial.

No Brasil o médico homeopata brasileiro Roberto Costa, descreveu o uso de vírus infeccioso para a produção de bioterápicos, do tipo nosódio vivo, para o tratamento da gripe humana (COSTA, 1984). Os estudos clínicos realizados por este médico homeopata brasileiro evidenciaram que o uso de microorganismos infectivos, como ponto de partida para o preparo de nosódios, originava medicamentos homeopáticos mais potentes, especialmente quando utilizados na potência 30DH (COSTA, 1984, 2002). Entretanto, como Roberto Costa era um clínico homeopata, seus estudos foram todos feitos com pacientes. Desta forma, nesta dissertação de mestrado foram avaliados, pela primeira vez, os efeitos de um nosódio vivo de vírus influenza A H3N2 [A/Aichi/2/68] infeccioso. Esta preparação foi submetida à farmacotécnica homeopática descrita na Farmacopéia Homeopática Brasileira (BRASIL, 1996), sendo diluída e dinamizada até a potência 30DH que, ao final do seu preparo, recebeu a denominação de Influenzinum RC, porque foi preparada a partir de uma amostra isolada do vírus influenza A, acrescida das iniciais RC em homenagem ao Dr. Roberto Costa.

O potencial antiviral do Influenzinum RC foi avaliado frente à linhagem de células de rim canino, Mardin-Darby canine kidney [MDCK], as quais são classicamente descritas na literatura como modelo para a avaliação da eficácia de fármacos antivirais para influenza (COUCEIRO *et al.*, 2005; SERKEDJIEVA *et al.*, 1998; SIDWELL *et al.*, 2000). Além da linhagem MDCK foram utilizados também macrófagos da linhagem J774G8, sendo a produção de citocinas liberadas por estas células, estimuladas ou não por Influenzinum RC, quantificadas através de ELISA.

As pesquisas realizadas até o momento mostraram que o vírus influenza A não lisa quando colocado em água, mesmo após o processo de sucussão. A análise por microscopia eletrônica da potência 1DH evidenciou a presença de partículas virais íntegras o que garantiu a execução do protocolo descrito por Roberto Costa para o preparo de nosódios vivos. O uso de água como veículo do bioterápico evitou a interferência dos constituintes do PBS,

especialmente NaCl e KCl, os quais após dinamização, poderiam influenciar de maneira significativa os resultados experimentais, por serem substâncias utilizadas na terapêutica homeopática.

A escolha da água como solvente deste novo bioterápico tornou necessária a criação de grupos controle adequados, especialmente por ser a potência de estudo a 30DH. Sabe-se que nesta potência não é possível detectar átomos ou moléculas oriundas da matriz inicial, ou seja, do vírus influenza A. Em verdade, teoricamente, acima da potência 24DH, o número de Avogrado ($6,02 \times 10^{23}$ átomos / mol de substância) é ultrapassado não sendo mais possível detectar moléculas originais da substância na solução capazes de promover um estímulo molecular específico (BASTIDE *et al.*, 1995).

Entretanto, vários estudos têm comprovado que os sistemas biológicos são capazes de responder, de maneira diferenciada, quando estimulados por soluções homeopáticas ultradiluídas (BILDET *et al.* 1989; DAVENAS *et al.*, 1987; BONAMIN *et al.*, 2001; POITEVIN *et al.*, 1998; WAYNE *et al.*, 2001; SHIPLEY *et al.*, 1983; LONG & ERNST, 2001; MESQUITA, 1998; AABEL *et al.*, 2000) e que estas respostas são diferentes daquelas oriundas apenas de solventes dinamizados (COSTA *et al.*, 2008; AQUINO *et al.*, 2008; VARRICCHIO *et al.*, 2008). Por isto, os resultados experimentais desenvolvidos com Influenzinum RC foram sempre comparados àqueles obtidos pela água destilada e pela água dinamizada.

A ausência de partículas infectivas na potência 30DH foi comprovada por espectroscopia UV-vis, que não foi capaz de detectar proteínas e/ou material genético de origem viral no Influenzinum RC. Este ensaio, feito na ausência de células, teve o seu resultado corroborado pelos experimentos feitos em ovos embrionados de 9 dias, os quais após inoculação do bioterápico, não se tornaram infectados. Desta forma, o uso deste novo nosódio na potência de 30DH não apresenta qualquer risco de infecção.

Os experimentos com vermelho neutro, corante que permeia a membrana plasmática de células viáveis (FINTER, 1969; ROGERO, 2003), indicou que nenhuma das concentrações de Influenzinum RC (1%, 5%, 10%) foi citotóxica à linhagem MDCK. Entretanto, apesar de não ter sido detectado qualquer efeito citotóxico, foi possível observar que a incubação das células MDCK com Influenzinum RC, promoveu uma aceleração das taxas metabólicas celulares, fato comprovado qualitativamente, através da observação diária feita das garrafas de cultura de células em microscópio. Foi possível verificar que àquelas células estimuladas pelo bioterápico sempre apresentaram densidade celular superior àquelas estimuladas com água e água 30DH, indicando uma influência do Influenzinum RC sobre as taxas de divisão celular.

De fato, esta observação qualitativa foi confirmada através dos ensaios com MTT: tanto as células estimuladas por 10 dias quanto àquelas estimuladas por 30 dias, tiveram suas atividades mitocondriais significativamente aumentadas ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle. O ensaio de MTT avalia a atividade mitocondrial de células viáveis, através da enzima succinato desidrogenase, que transforma o sal tetrazolium, de cor azul, em cristal de formazan, de cor púrpura (MISHRA, 2003). A quantidade de cristais formados é proporcional ao número de células viáveis e, conseqüentemente, fornece parâmetros da respiração celular. A enzima succinato desidrogenase catalisa a oxidação do succinato a fumarato, reação pertencente ao ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. A geração de moléculas de ATP e de intermediários para biossínteses como, aminoácidos, fundamentais para a síntese de proteínas, estão sob o controle do ciclo de Krebs. Desta forma, os resultados obtidos pelo MTT nos experimentos com as células MDCK tratadas pelo Influenzinum RC, sugerem que o bioterápico foi capaz de ativar o ciclo de Krebs, promovendo um aumento na produção de energia e também na geração de aminoácidos para a síntese de proteínas, situações comuns às células que estão com as taxas de proliferação aumentadas.

A quantificação do número de células em mitose permitiu detectar que o tratamento por 30 dias induziu um aumento significativo do número de mitoses feitas pelas células incubadas com o bioterápico em relação aos grupos controle. O teste de correlação de Pearson [$p < 0,03$] indicou que quanto maior o tempo de tratamento maior foi o número de células MDCK em mitose.

Os estudos morfológicos feitos por coloração de Giemsa evidenciaram outras alterações nas células MDCK a partir do quinto dia de tratamento com Influenzinum RC, como: aumento do número de vacúolos citoplasmáticos; aumento do número de nucléolos; aumento dos halos perinucleolares e alterações nos corpos lipídicos. Segundo Bruce (2002) os nucléolos têm como função a organização dos ribossomos celulares, organelas responsáveis pela síntese protéica e produção de RNAs, eventos relacionados à divisão celular. A observação de pelo menos 1.000 células em cada situação experimental permitiu concluir que, o número de nucléolos nas células MDCK tratadas pelo Influenzinum RC, se apresentou significativamente aumentado quando comparado aos grupos controle. Já os halos perinucleolares são normalmente verificados quando há fusão entre os nucléolos, logo após a mitose. Durante a mitose ocorre a síntese de vários pequenos nucléolos que coalescem rapidamente à medida que crescem para formar um grande nucléolo (BRUCE, 2002). Mesmo ocorrendo fusão entre os nucléolos, devido ao grande número de halos perinucleolares, o número de nucléolos continuou aumentado de forma estatisticamente significativa apenas nas células MDCK estimuladas por Influenzinum RC.

Para verificar o conteúdo dos vacúolos citoplasmáticos das células MDCK que também tiveram, aparentemente, seu número aumentado a partir de 5 dias de tratamento com Influenzinum RC, foi feita a coloração de *Oil Red* para corpos lipídicos. Os corpos lipídicos podem ser formados ou dispersados a todo o momento, dependendo da necessidade celular. A primeira função destes é estocar e abastecer a célula de colesterol e ácidos graxos para as

necessidades fisiológicas (MARTIN, 2005). As células MDCK tratadas por 10 dias com Influenzinum RC, apresentaram um número reduzido de corpos lipídicos. Esta diminuição, provavelmente, foi devida ao recrutamento destes lipídeos para a formação de novas membranas celulares, dentre outras funções fisiológicas, necessárias às células que estão com suas taxas de proliferação aumentadas. O tratamento das células MDCK com a água destilada ou água 30 DH resultou em um número de corpos lipídicos semelhantes ao grupo controle de células, uma vez que, sob essas condições experimentais não ocorreu aumento nas taxas de divisão celular.

Esse conjunto de dados experimentais obtidos com as células MDCK tratadas com Influenzinum RC sugeriram uma ativação direta deste bioterápico sob os processos de divisão e respiração celular. Desta forma, nos sentimos motivados a investigar também a atividade da enzima fosfofrutocinase 1 (PFK-1), enzima chave na regulação da via glicolítica, nas células tratadas com o nosódio. Através da análise espectrofotométrica da atividade da PFK-1, do homogeneizado celular nas diferentes situações experimentais, foi verificada uma diminuição na atividade desta enzima das células tratadas pelo Influenzinum RC a partir de 10 dias de tratamento, sendo esta diminuição estatisticamente significativa, a partir de 30 dias de tratamento. Tal modificação pode ser resultado da necessidade das células MDCK desviarem a via glicolítica para uma outra via bioquímica necessária a formação de nucleotídeos, como a via das pentoses-fosfato. Com isso, a via glicolítica continuaria ocorrendo, porém como a atividade da PFK-1 está diminuída pelo Influenzinum RC, ocorreria um acúmulo de glicose 6-fosfato e/ou de frutose 6-fosfato, substratos para a via das pentoses-fosfato. Estas moléculas vão dar origem ao açúcar ribose 5-fosfato que, em última análise, vão ser utilizados para a síntese de biomoléculas como DNA, RNA e ATP, fundamentais às células MDCK em processo de divisão celular. Este ensaio bioquímico corrobora os dados obtidos sobre o aumento das taxas de mitose induzido pelo Influenzinum RC nas células MDCK.

Apesar de todas as alterações celulares e bioquímicas evidenciadas por técnicas variadas, o estudo por microscopia eletrônica de transmissão [MET] não permitiu registrar alterações ultraestruturais significativas nas células MDCK tratadas pelo nosódio. Tal fato pode ser justificado pelo uso de um grande número de substâncias eletrodensas, normamente utilizadas na rotina de preparo de materiais para observação em MET, que podem ter mascarado alterações mais sutis nas organelas responsáveis pela respiração celular [mitocôndrias], as quais apresentaram cristas e membranas semelhantes aos grupos controle. Outras organelas como os ribossomos, responsáveis pela síntese de proteínas e outras organelas citoplasmáticas, da mesma forma, se apresentaram inalteradas à observação em MET, sendo a morfologia das células tratadas bastante semelhante a dos grupos controle.

A atividade antiviral do Influenzinum RC foi avaliada através do método clássico descrito na literatura para drogas antivirais que é a quantificação do efeito citopático [CPE]. A diminuição do CPE induzida pela droga antiviral se traduz num aumento da viabilidade celular (FINTER, 1969; ROGERO, 2003). No presente estudo, a atividade antiviral do Influenzinum RC foi verificada através do corante vermelho neutro com posterior análise da absorvância celular em ELISA. Em nenhuma situação experimental foi verificado um aumento na viabilidade das células MDCK pré, pós e pré e pós-tratadas, indicando que o Influenzinum RC não influencia a capacidade infectiva do vírus influenza A.

Outro experimento utilizado para verificação de efeito antiviral de fármacos é o cálculo de TCID₅₀, através do Método Reed & Muench. Como verificado com o vermelho neutro, o tratamento das células MDCK com Influenzinum RC não alterou o título viral. Desta forma, verificamos que, embora o Influenzinum RC seja capaz de suscitar diferentes respostas celulares, este não foi capaz de alterar o CPE e o título viral das células MDCK. Da mesma forma, as glicoproteínas hemaglutinina e neuramidase do vírus influenza A tratado com Influenzinum RC não foram alteradas.

De fato, embora ainda não exista, nos dias de hoje, evidência científica sobre o mecanismo de ação do medicamento homeopático, especialmente quando acima do número de Avogrado, uma das hipóteses existentes é a de que o medicamento homeopático possua um efeito direto sobre o organismo vivo e não sobre o agente etiológico (CARILLO, 2008). 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 (FONTES, 2005b). Em última análise, o medicamento homeopático trata o doente e não a doença. Seguindo essa linha de pensamento, deveríamos esperar que o Influenzinum RC agisse sobre as células MDCK, induzindo alterações celulares e bioquímicas e não sobre o vírus influenza A, o que foi de fato verificado nos vários protocolos experimentais aplicados ao estudo do Influenzinum RC.

O ensaio de microscopia óptica de fluorescência, embora seja de conotação qualitativa e não quantitativa, indicou novamente um efeito do Influenzinum RC sobre as células MDCK, as quais se tornaram menos fluorescentes quando comparadas ao grupo controle de vírus. A redução na fluorescência registrada nas células tratadas com o bioterápico indicou que, de alguma forma, o reconhecimento dos anticorpos policlonais de coelho para influenza A, foi alterado naquelas células que tiveram contato com o Influenzinum RC. Entretanto, por ser um ensaio qualitativo, apenas nos traz uma hipótese, que, novamente vai ao encontro ao que alguns autores defendem sobre o efeito do medicamento homeopático sobre as células hospedeiras.

Alguns trabalhos científicos têm registrado a eficácia dos medicamentos homeopáticos frente à células do sistema imunológico (OLIVEIRA *et al.*, 2006; DANNINGER *et al.*, 2000). Além disso, resultados experimentais obtidos com o bioterápico de *Tripanossoma cruzi* (ALMEIDA *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2006) indicaram que a administração deste bioterápico a camundongos, como etapa preliminar à infecção pelos parasitas, foi capaz de

estimular o sistema imunológico dos animais tratados a produzir antígenos contra *T. cruzi*. Estes trabalhos evidenciaram que os bioterápicos parecem agir como uma espécie de vacina, com resultados semelhantes àqueles descritos pelo uso de vacinas classicamente produzidas com antígenos de *T. cruzi* (BASOMBRIO & BESUSCHIO, 1982; SEPULVEDA *et al.*, 2000).

Baseado nestes dados da literatura, o efeito do Influenzinum RC sobre a produção de citocinas pelos macrófagos da linhagem J774 foi avaliado de maneira preliminar. Para tanto, os macrófagos receberam 6 estímulos de Influenzinum RC, água 30 DH e água destilada estéril, previamente à inoculação do vírus influenza A. Foi observado um aumento na produção do Fator de Necrose Tumoral [TNF- α] pelos macrófagos J774.G8 sugerindo um efeito do Influenzinum RC sobre estes macrófagos. Entretanto, novos experimentos precisam ser feitos para melhor compreensão dos efeitos deste bioterápico sobre células sanguíneas.

O presente trabalho traz importantes avanços acerca dos efeitos *in vitro* induzidos por um bioterápico, do tipo nosódio vivo de influenza A, sobre células mantidas em laboratório. Como já era esperado, o medicamento não foi capaz de agir diretamente sobre as partículas virais, mas, em contrapartida, suscitou várias respostas celulares importantes, que podem estar relacionadas a mecanismos de defesa do organismo. O presente trabalho está sendo complementado por um estudo clínico, do tipo duplo-cego, randomizado, placebo controlado, que encontra-se em fase de desenvolvimento. Para tanto, seiscentas crianças do Programa da Saúde da Família de Petrópolis serão submetidas a um protocolo específico previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, sob o número 194/08. Este projeto foi iniciado em fevereiro de 2009 sendo as crianças agrupadas em três grupos distintos. A cada grupo foi oferecido solução placebo, o bioterápico desenvolvido [Influenzinum RC] e o bioterápico IRA [Infecções Respiratórias Agudas], de maneira aleatória. Ambos os bioterápicos foram preparados na potência 30 DH e o placebo

escolhido foi o veículo de ambos os medicamentos [álcool 30% V/V]. Este projeto permitirá aumentar a compreensão dos efeitos do Influenzinum RC em indivíduos humanos e poderá ser uma alternativa segura, eficaz e barata para a profilaxia da gripe humana.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação nos permitiram concluir que:

- O bioterápico de origem viral pode ser manipulado em água mantendo, assim, a integridade viral;
- O tratamento das células MDCK pode ser feito com 10% de medicamento em relação ao meio, sendo esta concentração não citotóxica;
- A potência de 30 DH do bioterápico, utilizada em todos os experimentos, se mostrou não infecciosa, ou seja, não foi capaz de induzir infecção viral;
- As células MDCK tratadas com o Influenzinum RC mostraram um aumento na taxa de atividade mitocondrial,
- As células MDCK tratadas com o Influenzinum RC mostraram um aumento significativo nas suas taxas de mitose após 30 dias de estimulação;
- As células MDCK tratadas com o Influenzinum RC apresentaram aumento do número de vacúolos citoplasmáticos, do número de nucléolos e dos halos perinucleares;
- O Influenzinum RC induziu uma diminuição da atividade da enzima fosfofrutocinase-1 das células MDCK;
- As células MDCK tratadas pelo Influenzinum RC apresentaram um número reduzido de corpos lipídicos quando comparadas ao controle de células;
- O Influenzinum RC não induz alterações ultraestruturais em células MDCK;
- O Influenzinum RC não age sobre as glicoproteínas virais [hemaglutinina e neuraminidase] nem, tampouco, modifica o título viral;
- O Influenzinum RC aumenta a produção da citocina do tipo Fator de Necrose Tumoral- α pelos macrófagos J774G8.

- O Influenzinum RC induziu alterações celulares apenas nas células hospedeiras e não sobre o vírus influenza comprovando o efeito da homeopatia sobre a modulação celular.

REFERÊNCIAS

AABEL, S., *et al.* Is homeopathic 'immunotherapy' effective? A double-blind, placebo-controlled trial with the isopathic remedy *Betula 30c* for patients with birch pollen allerg. **Br Homeopathy J**, v. 89(4), p. 161-8, 2000.

AITCHISON, T.C. *et al.* Randomised controlled trial of homoeopathy versus placebo in perennial allergic rhinitis with overview of four trial series. **British Medical Journal**, v. 321, p. 471-476, 2000.

ALEIXO, D.L., *et al.* Changes of RAPD profiles of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and Benznidazole. **Homeopathy**, v. 97, p. 59-64, 2008.

ALMEIDA, C.M.C. **Nosódios**: Uma revisão crítica. 1997. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) - Instituto Hahnemanniano do Brasil, 1997.

ALMEIDA, R.L., *et al.* Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, v. 97 (2), p. 65-69, 2008.

AQUINO, C. L. *et al.* High dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. (AVELOZ) modify the viability and glycolytic metabolism of cell lines. **International Journal of High Dilution Research**, v.7, p.132 - 139, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FARMACÊUTICOS HOMEOPATAS. **Manual de normas técnicas para farmácia homeopática**. 3 ed. São Paulo, 2003.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. **Homeopatia**. Disponível em: <www.amhb.org.br>. Acesso em: 02/03/09.

BARROS, J.J.F. *et al.* Characterization of sialidase from an influenza A (H3N2) virus strain: kinetic parameters and substrate specificity. **Intervirolgy**, v. 46, p. 199-206, 2003.

BASOMBRIO, M.A., BESUSCHIO, S. *Trypanosoma cruzi* culture used as vaccine to prevent chronic Chagas disease in mice. **Infect. Immun.**, v. 36(1), p. 351-356, 1982.

BASTIDE, M., LAGACHE, A., LEMAIRE-MISONNE, C. Le paradigme des signifiants: schème d'information applicable à l'Immunologie et à l'Homéopathie. **Rev Int Systémique**, v. 9, p. 237-249. 1995.

BEIGEL, J., BRAY, M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. **Antiviral Research**, v. 78, p. 91-102, 2008.

BERCHIERI, A. *et al.* Evaluation of isopathic treatment of *Salmonella enteritidis* in poultry. **Homeopathy**, v. 95, p. 94-97, 2006.

BILDET, J. *et al.* The effect of dilutions of *Apis mellifica* and *Apium virus* on ultraviolet light-induced erythema in the guinea pig. **Ann Pharm Fr**, v. 47(1), p. 24-32, 1989.

BONAMIM, L.V. Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects *in vivo*. **Br Homeopath J**, v. 90(4), p.198-203, 2001.

_____. **Signals and Images: Contributions and contradictions about High Dilution Research**. Springer, 2008.

BORDET, M.F., *et al.* Treating hot flushes in menopausal women with homeopathic treatment – Results of an observational study. **Homeopathy**, v. 97, p. 10-15, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**. 2 ed. Parte I, São Paulo: Atheneu Editora, 1997.

_____. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares – PMNPC**, Brasília, DF, Fev de 2005. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ResumoExecutivoMedNatPratComp11402052.pdf>>. Acesso em 02/03/09.

_____. Decreto nº 78841, de 25 de novembro de 1976. Apóia a primeira edição da Farmacopéia Homeopática Brasileira. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 25 dez 1976. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15457&word=>. Acesso em: março de 2009.

_____. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 04 de maio de 2006. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22773&word=Politica Nacional de Medicina Natural e Praticas complementares>. Acesso em: março de 2009.

BRENER, Z., ANDRADE, Z.A., NETTO, M.B. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000. pp 431.

BRUCE, A. *et al. Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland Science, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=mboc4.TOC&depth=10>>. Acesso em: janeiro de 2009.

CARILLO, R. J. *O milagre da imperfeição – Vida, Saúde e Doença numa visão sistêmica*. 1 ed. São Paulo: Editora Cultrix, 2008. pp 167.

CASTRO, D. *et al.* Uso do nosódio meningococcinum como preventivo contra a meningite meningocócica. **Similia**, v. 16, 1975.

CAVALCANTI, A.M.S. *et al.* Effects of homeopathic treatment on pruritus of haemodialysis patients: a randomised placebo-controlled double-blind trial. **Homeopathy**, v. 92 (4), p. 177-181, 2003.

CÉSAR, AT. Dinamização. **Cultura Homeopática**, v. 5, p. 25-41, 2003.

COELHO, W.S., COSTA, K.C ., SOLA-PENNA, M. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofruuto-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 92, p. 364-370, 2007.

COLIGAN, J.E. *et al.* **Current Protocols in Immunology**. v.1, cap. 6. Publicado por John Wiley & Sons, Inc. 1995.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Resolução 319, de 30 de outubro de 1997. Dispõe sobre prerrogativas para exercício da responsabilidade técnica em homeopáticos. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucoes/319.pdf>>. Acesso em: março de 2009.

COSTA, R.A. **Nosódios Vivos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Farmácia Homeopática Átomo Ltda., 2002.

_____. **Homeopatia Atualizada**. 2 ed. Petrópolis: Ed Vozes, 1984.

_____. **Homeopatia Atualizada: Escola Brasileira**. 3 ed amp. Petrópolis: Ed Vozes, 1988. 274p.

COSTA, B. G. B. *et al.* Development of a new biotherapeutic of *Candida albicans* to the treatment of oral candidiasis. In: **63rd Congress of the Liga Medicorum Homeopathica Internationalis (LMHI)**, v.63. p.1 – 8, 2008.

COUCEIRO, J.N.S.S. *et al.* Comparative evaluation of a simple and sensitive assay for detection of orthomyxo and paramyxoviruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 183-187, 1994.

_____. *et al.* Natural piperine as a new alternative against influenza viruses. **Virus Reviews and Research**, v. 10, p. 27-32, 2005.

_____. & ALBUQUERQUE, M.C.M. **Viroses Respiratórias**. In: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V. & Eigg, M.D. **Introdução à virologia humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 245-289.

DANNINGER, T. *et al.* Immunologic changes in healthy probands and HIV infected patients after oral administration of *Staphylococcus aureus* 12C: a pilot study. **British Homeopathic Journal**, v. 89, p. 106-115, 2000.

DAVENAS, E., POITEVIN, B., BENVENISTE, J. Effect of mouse peritoneal macrophages of orally administered very high dilutions of silica. **Eur J Pharmacol**, v. 135(3), p. 313-9, 1987.

DOS SANTOS, A.L., *et al.* *In vivo* study of the anti-inflammatory effect of *Rhus toxicodendron*. **Homeopathy**, v. 96, p. 95-101, 2007.

ENGLUND, J.A. Antiviral Therapy of Influenza. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13 (2), p. 120-128, 2002.

FINTER, N. B. Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. **Journal of General Virology**, v. 5, p. 419-427, 1969.

FONSECA, M.E.F. A combined staining technique developed for virus particle observation in the electron microscope. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 37-40, 1984.

FONTES, O.L. **Farmácia Homeopática: Teoria e Prática**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2005a.

_____. *et al.* Ação terapêutica do medicamento homeopático em ratas com infecção urinária por *Escherichia coli*. **Cultura Homeopática**, v. 13, p. 9-18, 2005b.

FORLEO-NETO, E. *et al.* Influenza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36 (2), p. 267-274, 2003.

GOMES, M.L., *et al.* Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. **Acta Tropica**, v. 69 (2), p. 99-109, 1998a.

_____. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp Parasitol**, v. 88, p. 28-33, 1998b.

GUBAREVA, L.V. *et al.* Influenza virus neuraminidase inhibitors. **The Lancet**, v. 355, p. 827-835, 2000.

_____. *et al.* Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. **Antiviral Research**, v. 53, p. 47-61, 2002.

GUTMAN, W. Nosode de la influenza. **Divulgacion de la hom.**, v. 43 (253), p. 4, 1989.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 912p.

HAYDEN, F.G. Antivirals for influenza: Historical perspectives and lessons learned. **Antiviral Research**, v. 71, p. 372-378, 2006.

_____. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? **Clinical Infectious Disease**, v. 48(1), p. S3 – 13, 2009.

HOLANDINO, C. *et al.* **Mechanical versus handmade succussions: a physical chemistry comparison**. In: GIRI's book (Signal and Images II). Germany: Ed.Heidelberg, 2008a , v.2, p. 37-48.

_____. *et al.* Modeling Physical-Chemical Properties of High Dilutions: an electrical conductivity study. **International Journal of High Dilution Research**, v.7, p.165 - 173, 2008b.

_____. Chagas disease: an old disease in need of new therapies. **Homeopathy**, v. 97 (2), p. 57-58, 2008c.

KNIPE, D.M. *et al.* *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1647-1740.

KOSSAK-ROMANACH, A. **Imunomodulação, Ultradiluições Hahnemannianas e Isoterapia**. São Paulo: Elcid, 2003. 330p.

JULKUNEN, I. *et al.* Inflammatory responses in influenza A virus infection. **Vaccine**, v. 19, p. S32-S37, 2001.

LEHMANN, C. *et al.* Infection of macrophages by influenza A virus: characteristics of tumour necrosis factor- α (TNF α) gene expression. **Research of virology**, v. 147, p. 123-130, 1996.

LEWIS, P.R. *et al.* **Staining Methods for Sectioned Material**. New York: Elsevier Biomedical Press, 1991.

LYRIO, C. **Nosódios Bioterápicos**: Repertório. Rio de Janeiro: C. Lyrio, 2002. 71p.

LONG, L. & ERNST, E. Homeopathic remedies for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. **Br Homeopath J**, v. 90(1), p. 37-43, 2001.

MACEDO, S.B. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Arnica Montana* 6CH: preclinical study in animals. **Homeopathy**, v. 93, p. 84-87, 2004.

MARTIN, S., PARTON, R.G. Caveolin, cholesterol and lipid bodies. **Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 163-174, 2005.

MESQUITA, L.P., Homeopathy and physiotherapy with special reference to osteoarthropathy. **Br Homeopath J**, v. 76(1), p.16-18, 1998.

MISHRA, A.K. *et al.* A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 211-216, 2003.

MOJAVER, Y.N., MOUSAVI, F., SHERAFATI, S. *Ignatia* in the treatment of oral lichen planus. **Homeopathy**, v. 98, p. 40-44, 2009.

MONTO, A.S. *et al.* Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50 (7), p. 2395-2402, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MOTA, A.R. *et al.* Mormo em eqüídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20 (4), p. 155-159, 2000.

MUEHLBAUER, P.A., SCHULER, M.J. Measuring the mitotic index in chemically-treated human lymphocyte cultures by flow cytometry. **Mutation Research**, v. 537, p. 117-130, 2003.

MUGALL, B.A., XU, X., KLIMOV, A. Assaying susceptibility of avian and other influenza A viruses to zanamivir: comparison of fluorescent and chemiluminescent neuraminidase assays. **Avian diseases**, v. 47, p. 1141-1144, 2003.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. **Guillain-Barré Syndrome Information**. Disponível em: <<http://www.ninds.nih.gov/disorders/gbs/gbs.htm>>. Acesso em: Janeiro de 2009.

NATIONAL REYE'S SYNDROME FOUNDATION. **Reye's Syndrome**. Disponível em : <<http://www.reyessyndrome.org>>. Acesso em: janeiro de 2009.

NISHIMURA, T., TOKU, K., FUKUYASU, H. Antiviral compounds . XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenil-substituted carbonyl compounds against influenza in eggs and mice. **Kitasato Archives Medicine**, v. 50, p. 39-46, 1977.

OLIVEIRA, C.C. *et al.* Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, v. 52, p. 420–432, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Influenza**: Overview. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/influenza/en/>>. Acesso em: fevereiro de 2009.

_____. **Avian influenza**. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_02_030/en/index.html>. Acesso em: março de 2009.

PALESE, P. Influenza: old and new threats. **Nature Medicine Supplement**, v. 10 (12), p. S82-S87, 2004.

PEDALINO, C.M. *et al.* Effect of *Atropa belladonna* and *Echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, v. 93, p. 193-198, 2004.

PERKER, J., COULAMY, A. Enquête sur lês habitudes de prescription dès médecins homéopathes au sujet d’um médicament singulier: influenzzinum. **L’Homéopathie Européenne**, v. 6, p. 172-177, 1999.

PERKO, S.J. **The homeopathic treatment of influenza**: Surviving Influenza Epidemics and pandemics past, present and future with homeopathy. United States: Benchmark Homeopathic Publications, 2005. 456p.

POITEVEIN, B., DAVENAS, E., BENVENISTE, J. In vitro immunological degranulation of human basophils is modulated by lung histamine and *Apis mellifica*. **Br J Clin Pharmacol**, v. 25(4), p. 439-444, 1998.

PROBER, C.G. Antiviral therapy for influenza virus infection. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13 (1), p. 31-39, 2002.

PROPHET, E.B., *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology. Washington: Ed. American Registry of Pathology, p. 279, 1994.

PUSTIGLIONE, M. **O moderno Organon da arte de curar de Samuel Hahnemann**. 1 ed. São Paulo: Typus Editora, 2001. 320 p.

QUEIROZ, A.O. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30DH: Um estudo *in vivo*. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Farmácia, Universidade Estácio de Sá, 2005.

_____. *et al.* Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: Um Estudo *In Vivo*. **Cultura Homeopática**, v. 17, p. 9-13, 2006.

REED, L.J. & MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RIBEIRO, R.D. *et al.* Comportamento de tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, inoculados endovenosamente em camundongos normais e tratados com bioterápicos. **Revista de Homeopatia**, v. 157, p. 14-18, 1983.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste *in vitro* de Citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6 (3), p. 317 – 320, 2003.

SALLES, S.A.C. **A interface entre a Homeopatia e a Biomedicina: o ponto de vista dos profissionais de saúde não homeopatas**, 2006. 244 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006.

SANTOS, M.G.M., *et al.* A screening for the antiviral effect of extracts from brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. **Botanica Marina**, v. 42, p. 227-230, 1999.

SCHEPPER, L.D. **Hahnemann Revisited**: A textbook of Classical Homeopathy for the Professional. United States: Full of Life Publications, 2001. 572 p.

SEPULVEDA, P. *et al.* DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.**, v. 68(9), p.4986-4991, 2000.

SERKEDJIEVA, J., HAY, A.J. *In vitro* anti-influenza virus activity of a plant preparation from *geranium sanguineum* L. **Antiviral Research**, v. 37, p. 121-130, 1998.

SHIPLEY, M. *et al.* Controlled trial of homoeopathic treatment of osteoarthritis. **Lancet**, v. 1, p. 97-98, 1983.

SIDWELL, R.W. *et al.* *In vitro* and *in vivo* assay systems for study of influenza virus inhibitors. **Antiviral Research**, v. 48, p. 1-16, 2000.

SILVA, A.M.C.P. *et al.* Uso de bioterápico de *Mycoplasma* spp. em rebanho bovino leiteiro. **Cultura Homeopática**, v. 4(13), p. 43-47, 2005.

SIQUEIRA, C.M. *et al.* Desenvolvimento de um novo bioterápico a partir do vírus influenza infeccioso e verificação de sua eficácia *in vitro*. **Cultura Homeopática**, v. 16, p. 56, 2006.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Stanford University: Guanabara Koogan, 1996. 1000p.

SUN, X. and WHITTAKER, G.R. Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. **Journal of Virology**, v. 77 (23), p. 12543-12551, 2003.

TÉTAU, M. **Hahnemann**: Muito além da genealidade. São Paulo:Editora Organon, 2001. 262 p.

VARRICCHIO, M.C.B.N. *et al.* Chronic toxicological effects of high diluted solutions of Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.) on healthy mice: a preliminary study. **International Journal of High Dilution Research**, v.7, issue 25, p.174-178, 2008.

VEIGA, V.F. *et al.* Exposure of human leukemic cells to direct electric current: generation of toxic compounds inducing cell death by different mechanisms. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 42, p. 61-74, 2005.

VICKERS & SMITH. Homoeopathic Oscilloccinum for preventing and treating influenza and influenza-like syndromes. **Cochrane Database Syst Rev.**, v.3, 2006.

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

WELLER, P.F., DVORAK, A.M. Lipid bodies: Intracellular sites for eixosanoid formation. **J.Allergy Clin. Immunol.**, v. 94, p. 1151-1156, 1994.