



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA MONTEIRO SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS PARA GRIPE HUMANA
POR ENSAIOS *IN VITRO*, PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO

Rio de Janeiro

2013

CAMILA MONTEIRO SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS PARA GRIPE HUMANA POR
ENSAIOS *IN VITRO*, PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Profa. Dra. Carla Holandino Quaresma

Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro

Rio de Janeiro

2013

Siqueira, Camila Monteiro

Avaliação de medicamentos homeopáticos para a gripe humana
por ensaios in vitro, pré-clínico e clínico/

Camila Monteiro Siqueira; orientadores: Carla Holandino Quaresma,
José Nelson dos Santos Silva Couceiro. – Rio de Janeiro: UFRJ,
Faculdade de Farmácia, 2013.

xxv, 152 f.: il.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ, Faculdade
de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Bioterápico - Nosódios. 2. Gripe humana.
 3. Ensaios clínicos e não clínicos. 4. Homeopatia
- I. Título.

CAMILA MONTEIRO SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS PARA GRIPE HUMANA POR
ENSAIOS *IN VITRO*, PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

Orientadores:



Prof. Dra. Carla Holandino Quaresma
Faculdade de Farmácia – UFRJ

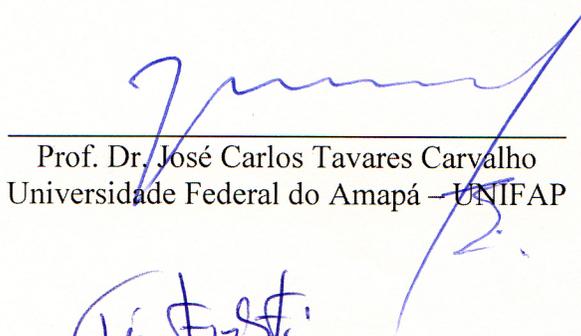


Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ

Banca Examinadora:



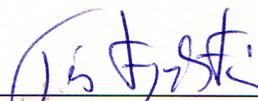
Prof. Dr. Leandro Machado Rocha
Faculdade de Farmácia – UFF



Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP



Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior
Faculdade de Farmácia - UFRJ



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



Profa. Dra. Morgana T. L. Castelo Branco
Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ



Profa. Dra. Suzana Guimarães Leitão
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Ao meu esposo Juny, pelo amor e compreensão.

Aos meus pais, Francisco e Vitória, pela força e confiança.

*A minha filha Júlia que compartilhou desses últimos
momentos da preparação da tese.*

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 no mesmo. Por ter sido uma mãe em todos os momentos me orientando e dando conselhos muito válidos. Obrigada pelo carinho, atenção, confiança e por ser um exemplo de profissional para mim.*

*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. Muito obrigada por ter me orientado e ter sido tão atencioso esses anos todos.*

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

*Ao meu querido esposo, **Juny**, pela compreensão de sempre, 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!*

*A minha filha **Júlia**, ainda em meu ventre, que me presenteou com sua presença de maneira inesperada, porém muito amada. Peço desculpas pelas vezes que te deixei “estressada” devido a preparação do meu Qualifying e da Tese. Sei que sentiu tudo comigo e espero que você tenha isso como um estímulo a sempre buscar por conhecimento.*

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

*Ao ex-aluno e atual amigo **Douglas**, por ter sido incansável em me explicar bioquímica e me ajudar a decifrar os dados obtidos. Muito obrigada por seu carinho e torcida. Gosto muito de você e sempre serei grata!*

*Ao amigo **Cesar Augusto** por ter me ajudado, também de forma incansável, a entender a dinâmica de uma célula e vibrar com os resultados junto comigo! Muito obrigada!!!*

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

A amiga, “mãe” e, agora, “tia-avó” **Fortune**, pelos momentos agradáveis que passamos juntas no laboratório assim como pelos momentos onde estávamos quebrando a cabeça para entender a famosa bioquímica. Obrigada por tudo!!!

A todos do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas, **Ana Paula, Alexandre Carnevale, Felipe, Marina, Lucas, Roana** pela amizade e momentos de descontração.

A **Juliana Grechi** por ter me orientado nos trabalhos com macrófagos RAW 264-7.

A **Ana Maria, Alba e Marta**, pela amizade, torcida e força.

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

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

A Prof Dra **Leoni Bonamin** por toda a recepção em São Paulo, por ter ajudado com muita paciência nos experimentos pré-clínicos, assim como na preparação do artigo e revisão da tese. Sem palavras para expressar o quão importante foi para este trabalho. Muito obrigada!

Um agradecimento especial aos alunos que me ajudaram no estudo pré-clínico que foi realizado na Universidade Paulista, em especial, **Priscilla, Thayná** e a técnica de laboratório **Michelle**.

A Prof Dra **Dorly** por ter me cedido material, equipamentos e alunos para me auxiliarem nos experimentos com macrófagos. Em especial, meu agradecimento à **Eneida e Diogo** que foram incansáveis nas análises que ocorreram na Universidade Federal do Paraná.

A Prof. Dra. **Patrícia Zancan**, por ter cedido material e equipamento para as análises de atividade da PFK. Em especial, agradeço a aluna **Mariah Marcondes** que me ajudou com as análises.

Ao Prof Dr. **Antonio Galina** por ter permitido que eu utilizasse de seu laboratório para fazer todas as análises bioquímicas da tese.

A Prof. Dra. **Morgana Castelo Branco**, pela sua dedicação e ajuda nos ensaios com macrófagos e pela ajuda como banca de acompanhamento.

A Profa. Dra. **Sheila Garcia** pelas contribuições durante todo o período da pesquisa como banca de acompanhamento.

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 **Leticia Cortez, Juliana Paiva, Flávia Almada, Kelen Soares, Viviane Rezende, Raquel Rennó e Vivian Silva**, pelo carinho e torcida.*

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. **Avaliação de medicamentos homeopáticos para a gripe humana por ensaios *in vitro*, pré-clínico e clínico.** Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O vírus influenza tem sido responsável por doenças respiratórias altamente contagiosas com elevadas taxas de mortalidade principalmente em idosos e pacientes imunocomprometidos, o que vem estimulando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da gripe humana. 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 bioterápicos manipulados a partir do vírus influenza íntegro e inativado (A/Aichi/2/68 e A/Victoria/3/75), nas potências 12DH e 30DH, e avaliar a sua resposta através de estudos *in vitro*, pré-clínico e clínico. O preparo do bioterápico íntegro seguiu a técnica do Dr. Roberto Costa, sendo avaliados, inicialmente, os aspectos ultraestruturais das partículas virais manipuladas na potência 1DH, em dois solventes: água e etanol 70%. A análise por microscopia eletrônica de transmissão indicou que as partículas virais se mantiveram íntegras e completamente lisadas na presença de água e etanol 70%, respectivamente. Os experimentos *in vitro* evidenciaram alterações nas atividades de enzimas importantes, assim como na capacidade respiratória máxima, quando células MDCK foram tratadas com o bioterápico íntegro, na potência 30DH. Em contrapartida, alterações bioquímicas e celulares pouco significativas foram detectadas nas duas linhagens de macrófagos testadas (J774G8 e RAW 264-7). O estudo pré-clínico, feito com camundongos Balb-c, indicou que os bioterápicos íntegro e inativado, na potência 30DH, não foram capazes de induzir efeitos patogênicos e/ou alterações imunológicas, quando os animais foram desafiados com o antígeno de influenza, após 21 dias da administração dos mesmos *ad libitum*. Em contrapartida, no segundo *set* de experimentos *in vivo* realizado com

os bioterápicos íntegros nas potências 12DH e 30DH, importantes alterações celulares induzidas pela potência 30DH, foram detectadas, a saber: aumento do número de células B e *Natural Killer* (NK), diminuição das células B2, aumento das células B-1 e CD4+. Estas alterações indicaram que o tratamento com o bioterápico 30DH foi capaz de estimular de maneira muito significativa a resposta imunológica dos camundongos Balb-c quando os mesmos foram desafiados com o antígeno de influenza. O estudo clínico feito em parceria com o Instituto Roberto Costa e a Secretaria de Saúde de Petrópolis/RJ comprovou de maneira estatisticamente significativa o efeito profilático dos medicamentos homeopáticos (bioterápico íntegro 30DH e IRA) em relação ao placebo, contra os sintomas da gripe e da infecção respiratória aguda. Este estudo clínico, pioneiro na literatura, avaliou um número significativo de crianças (600) com idades entre 1 a 5 anos de idade, através de protocolo triplo-cego, randomizado e controlado por placebo, conferindo robustez e confiabilidade a esta pesquisa. O conjunto de resultados obtidos no presente trabalho fornecem fortes evidências de que o bioterápico íntegro de influenza 30DH apresenta potencial terapêutico e profilático para infecções produzidas pelos vírus da gripe.

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

ABSTRACT

SIQUEIRA, Camila Monteiro. **Evaluation of homeopathic medicines for human flu using *in vitro*, pre-clinical and clinical studies.** Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Influenza viruses have been responsible for highly contagious acute respiratory illnesses with high mortality, mainly in the elderly and immune compromised patients, which encourages the development of new drugs for the treatment of human flu. The biotherapies are medicines prepared from biological products, which are compounded according to homeopathic procedures indicated for infectious diseases with known etiology. The purpose of the present study is to develop biotherapies prepared from the intact and inactivated influenza A virus (A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75), at 12DH and 30DH potencies, and evaluate its *in vitro*, pre-clinical and clinical effectiveness. The intact biotherapy was prepared according to Roberto Costa's technique and the ultrastructural aspects of viral particles prepared at the potency of 1DH in two solvents (water and alcohol 70%) were evaluated. Transmission electron microscopy images indicated that the viral particles remained intact and completely lysed in the presence of water and alcohol 70%, respectively. The *in vitro* experiments showed alterations in important enzyme activities and in the maximum respiratory capacity when MDCK were treated with intact biotherapy 30DH. In contrast, biochemical and cell alterations were not detected in the macrophages tested (J774G8 e RAW 264-7). The pre-clinical study was carried out in Balb-c mice, and the results indicated that the intact and inactivated biotherapy at 30DH was not able to induce pathogenetic effects and/or immune alterations, when the animals were challenged with influenza antigen, after 21 days, using the biotherapy *ad libitum*. In contrast, in the second set of experiments with intact biotherapies 12DH and 30DH, some important cell alterations induced by 30DH were detected, namely: B and non-B cells increased, B2 cells decreased, B1 and CD4+ increased. These alterations

indicated that the treatment with biotherapeutic 30DH was able to stimulate the immune response when the animals were challenged with influenza antigen. The clinical trial done in partnership with Roberto Costa Institute and Brazilian Public Health System in Petropolis/RJ proved that homeopathic medicines (intact biotherapeutic 30DH and IRA) have a prophylactic effect against flu and acute respiratory infection symptoms , when compared to placebo.. This clinical trial, pioneer in the literature, evaluated a significant number of children (600) ranging from 1 to 5 years of age, by a triple blind, randomized and placebo controlled protocol, bringing robustness and reliability to this investigation. The set of results obtained in this study provide strong evidence of the therapeutic and prophylactic potential of the intact biotherapeutic 30DH against infections caused by influenza viruses.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de produção de massa viral.	55
Figura 2. Representação esquemática da reação de redução do MTT	60
Figura 3. Esquema resumido da via glicolítica e pentoses-fosfato.	61
Figura 4. Representação do Campo Aberto.	71
Figura 5. Imagem das amostras rotuladas.	78
Figura 6A. Microfotografia eletrônica da solução de bioterápico íntegro na potência de 1DH.	82
Figura 6B. Microfotografia eletrônica da solução de bioterápico inativado na potência de 1DH.	82
Figura 7. Avaliação da atividade mitocondrial, por MTT, nas células que receberam 6 tratamentos.	83
Figura 8. Avaliação da atividade mitocondrial, por MTT, de células que receberam 18 tratamentos.	83
Figura 9. Atividade da enzima PFK-1 nas células submetidas a 6 e 18 tratamentos.	84
Figura 10. Avaliação do consumo de oxigênio nas células submetidas a 6 tratamentos.	86
Figura 11. Avaliação do consumo de oxigênio nas células submetidas a 18 tratamentos.	87
Figura 12. Avaliação da hidrólise de ATP em células MDCK submetidas a 6 e 18 tratamentos.	89
Figura 13. Avaliação da enzima citrato sintase em células MDCK submetidas a 6 e 18 tratamentos.	89
Figura 14. Avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase em células MDCK submetidas a 6 tratamentos.	90
Figura 15. Avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase em células MDCK submetidas a 18 tratamentos.	90
Figura 16. Produção de TNF- α pelos macrófagos J774G8.	92
Figura 17. Produção de IL-12 pelos macrófagos J774G8.	93

Figura 18. Produção de MCP-1 pelos macrófagos J774G8.	94
Figura 19. Produção de óxido nítrico pelos macrófagos RAW264-7	95
Figura 20. Avaliação da atividade mitocondrial por MTT de macrófagos RAW2647.	96
Figura 21. Deta peso, em gramas, dos animais do grupo Imunologia.	100
Figura 22. Consumo relativo de água, em gramas, do grupo Imunologia.	100
Figura 23. Consumo relativo de ração, em gramas, do grupo Imunologia.	101
Figura 24. Peso relativo do baço, em graças, do grupo Imunologia.	102
Figura 25. Peso relativo do primeiro conjunto, em gramas, do grupo Imunologia.	102
Figura 26. Fotomicrografia do pulmão do grupo AI.	103
Figura 27. Histometria do folículo do baço do grupo Imunologia.	104
Figura 28. Histometria do centro germinatido do grupo Imunologia.	104
Figura 29. Delta peso, em gramas, dos camundongos - Experimento II	105
Figura 30. Peso relativo do baço, em gramas – Experimento II.	106
Figura 31. Consumo relativo de água, em gramas – Experimento II.	107
Figura 32. Consumo relativo de ração, em gramas – Experimento II.	107
Figura 33. Área positiva para macrófagos CD11+.	108
Figura 34. Área positiva para linfócitos T CD3+.	108
Figura 35. Diagrama de pontos representando a distribuição de linfócitos e Fagócitos.	109
Figura 36. Relação macrófagos/ linfócitos.	109
Figura 37. Proporção entre macrófagos maduros/ macrófagos derivados de B1.	110
Figura 38. Proporção entre células B/outros linfócitos.	111
Figura 39. Proporção de células B1a/B1b.	111
Figura 40. Diagrama de pontos representando as subpopulações de linfócitos e fagócitos.	112
Figura 41. Proporção de células B1/B2.	113

Figura 42. Diagrama de pontos representando as subpopulações de células T.	113
Figura 43. Proporção de células CD4/CD8.	114
Figura 44. Fluxograma das crianças incluídas no estudo clínico.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito dos 6 tratamentos nos parâmetros respiratórios das células MDCK.	86
Tabela 2. Efeitos dos 18 tratamentos nos parâmetros respiratórios das células MDCK.	87
Tabela 3. Delta peso, em gramas, dos animais do grupo Patogenesisia.	97
Tabela 4. Peso relativo do primeiro conjunto e média dos valores, em gramas.	98
Tabela 5. Peso relativo do baço e média dos valores, em gramas.	98
Tabela 6. Características clínicas e demográficas dos pacientes.	116
Tabela 7. Mediana de episódios de gripe/ infecção respiratória aguda.	117
Tabela 8. Número de episódios de gripe/ infecção respiratória aguda.	117

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1 Autorização da Comissão de Ética de uso de animais/UFRJ
- ANEXO 2 Autorização da Comissão de Ética de uso de animais/UFRJ
- ANEXO 3 Aprovação do Relatório Final CEP/UFRJ
- ANEXO 4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
Ad	Água dinamizada
AMHB	Associação Medicina Homeopática Brasileira
APC	Células apresentadoras de antígeno
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Soro Albumina Bovina
CC	Controle de Células
CEP	Conselho de Ética e Pesquisa
CFM	Conselho Federal de Medicina
CH	Centesimal de Hahnemann
CIC	<i>Circulating Immune Complexes</i>
COX	Citocromo c oxidase
CTL	Células T citotóxicas
DH	Decimal de Hering
DMEM	Dulbecco Modified Eagles's Médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DTNB	5,5' ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ETS	Sistema Transportador de Elétrons
FHB	Farmacopéia Homeopática Brasileira

FITC	Fluoresceína Isotiocianato
Frutose 6-P	Frutose 6-fosfato
HA	Hemaglutinina
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
HU	Hospital Universitário
I	Imunologia
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IHB	Instituto Hahnemanniano do Brasil
IRA	Infecções Respiratórias Agudas
KCl	Cloreto de Potássio
KCN	Cianeto de Potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio monobásico
LM	Cinquenta Milsimal
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
NA	Neuraminidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio

NaN ₃	Azida
NaOH	Hidróxido de sódio
NEP	Proteína de exportação celular
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NP	Formador de Nucleocapsídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Patogenesia
PBS	Tampão salina fosfato
PE	Ficoeritrina
PFK-1	Fosfofrutocinase-1
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PI	Porcentagem de Inibição
R _{ATP}	Respiração acoplada a síntese de ATP
RC	Roberto Costa
R _L	<i>Proton Leak</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA-m	Ácido Ribonucléico mensageiro
ROX	Consumo Residual de Oxigênio
R _{RO}	Respiração de Rotina
SPF	Livre de patógeno
SUS	Sistema Único de Saúde
TCID50	Dose Infectiva para 50% da cultura celular
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UHA	Unidade hemaglutinante
UNIP	Universidade Paulista
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
N°	Número
N	Normal
H	Hora (s)
mU	MiliUnidade (s)
% v/v	Percentual volume (ml) / volume (ml)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1. VÍRUS INFLUENZA	28
2.2. GRIPE	29
2.2.1. Etapas e sintomas da gripe	30
2.2.2. Pandemias	33
2.2.3. Tratamentos Atuais	34
2.2.4. Resposta imunológica ao vírus influenza	36
2.3. HOMEOPATIA	38
2.3.1. A terapêutica homeopática no mundo e no Brasil	38
2.3.2. Princípios básicos da homeopatia	41
2.3.3. Origem do medicamento homeopático	42
2.3.4. Escalas	42
2.4. BIOTERÁPICOS / NOSÓDIOS	43
2.4.1. História	44
2.4.2. Isoterápicos	47
2.4.3. Referências bibliográficas a bioterápicos	47
2.4.4. Bioterápicos Dr. Roberto Costa	49
2.4.5. Tratamento da gripe com bioterápicos	50
3. OBJETIVOS	52
3.1. OBJETIVO GERAL	52
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52

4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1.1. Equipamentos	53
4.2. MÉTODOS	54
4.2.1. Preparação e titulação da amostra viral	54
4.2.2. Preparação dos bioterápicos	55
4.2.3. Avaliação da integridade da partícula viral por microscopia eletrônica de transmissão	56
4.3. MÉTODOS UTILIZADOS NOS ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	57
4.3.1. Tratamento das células MDCK	57
4.3.2. Avaliação da ação dos bioterápicos sobre a linhagem MDCK	59
4.3.2.1. Avaliação da atividade mitocondrial celular por MTT	59
4.3.2.2. Avaliação da atividade da enzima PFK-1 nas células MDCK	60
4.3.2.3. Avaliação do Consumo de Oxigênio: Oxigrafia de Alta Resolução	62
4.3.2.4. Quantificação da enzima lactato desidrogenase	62
4.3.2.5. Quantificação da atividade de hidrólise de ATP	63
4.3.2.6. Quantificação da atividade de citrato sintase	64
4.3.2.7. Dosagem de proteína	64
4.3.3. Tratamento dos macrófagos J774.G8 com os bioterápicos	65
4.3.3.1. Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos J774.G8	66
4.3.4. Dosagem de óxido nítrico produzidos pelos macrófagos RAW 264-7	67
4.3.4.1. Avaliação da atividade mitocondrial dos macrófagos RAW 264-7 por MTT	68
4.4. MÉTODOS UTILIZADOS NO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO	68
4.4.1. Experimentos com camundongos Balb-c	68
4.4.2. Animais	69
4.4.3. Experimento I – Patogenesia e Imunologia	69
4.4.3.1. Protocolo de Patogenesia	70

4.4.3.2. Protocolo de Imunidade	71
4.4.4. Experimento II – Avaliação imuno histoquímica do baço e citometria de fluxo do lavado peritoneal dos camundongos	72
4.5. METODOLOGIAS UTILIZADAS NO ESTUDO CLÍNICO	75
4.5.1. Critérios de inclusão e exclusão	76
4.5.2. Área de estudo	76
4.5.3. Delineamento da pesquisa	77
4.5.4. Parâmetros avaliados	79
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
6. RESULTADOS	81
6.1. Preparação e titulação da amostra viral	81
6.2. Avaliação da integridade da partícula viral por microscopia eletrônica de transmissão	81
6.3. RESULTADOS DOS ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	82
6.3.1. Avaliação da atividade mitocondrial das células MDCK por MTT	82
6.3.2. Avaliação da atividade da enzima Fosfofrutocinase-1 nas células MDCK	84
6.3.3. Estudo da Função Respiratória: Oxigrafia de Alta Resolução	85
6.3.4. Avaliação da atividade de Citrato Sintase e Hidrólise de ATP	87
6.3.5. Quantificação da atividade de lactato desidrogenase	90
6.3.6 Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos J774.G8	91
6.3.7 Dosagem de óxido nítrico produzido pelos macrófagos RAW 264-7	94
6.3.8. Avaliação da atividade mitocondrial dos macrófagos RAW 264-7 por MTT	96
6.4. RESULTADOS DO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO	96
6.4.1. Experimento I	96
6.4.1.1. Experimento I - Patogenesis	97

6.4.1.2. Experimento I - Imunologia	99
6.4.2 Experimento II – Avaliação por Citometria de Fluxo do lavado peritoneal dos camundongos	105
6.5. RESULTADOS DO ESTUDO CLÍNICO	114
7. DISCUSSÃO	119
8. CONCLUSÕES	138
REFERÊNCIAS	140

1. INTRODUÇÃO

Os vírus influenza têm sido responsáveis por doenças respiratórias altamente contagiosas, afetando humanos desde os tempos antigos com altas taxas de mortalidade principalmente em idosos e pacientes imunocomprometidos (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, foram avaliados novos medicamentos homeopáticos para a gripe humana, do tipo bioterápico, usando, como ponto de partida, o vírus influenza A/H3N2 íntegro ou inativado, verificando, inclusive, as respostas às diferentes potências homeopáticas. Para tanto, as partículas virais foram diluídas em água destilada estéril ou solução hidroalcoólica 70% para obtenção do bioterápico íntegro e inativado, respectivamente. Ambos os bioterápicos foram dinamizados mecanicamente até a potência 12DH e 30 DH, de acordo com a Farmacopéia Homeopática Brasileira (BRASIL, 2011). A avaliação destes bioterápicos foi feita através de modelos não-clínicos e clínicos, porém a terminologia utilizada neste trabalho foi *in vitro*, pré-clínico e clínico. Através de métodos *in vitro*, foram estudadas as 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 e macrófagos, das linhagens J774G8 e RAW 264-7, para avaliação da resposta

imunológica (COUCEIRO *et al.*, 2005; SERKEDJIEVA *et al.*, 1998; SIDWELL *et al.*, 2000). Para avaliação pré-clínica foram utilizados camundongos balb-c em dois experimentos independentes realizados em colaboração com a Universidade Paulista (UNIP). O primeiro com o objetivo de avaliar os diferentes pontos de partida dos bioterápicos (vírus íntegro ou inativado) e, o segundo, com o intuito de verificar qual preparação apresentaria uma melhor resposta imunológica nestes animais. Para avaliação clínica, foi conduzido um estudo triplo cego, randomizado e placebo controlado no qual 600 crianças do Programa de Saúde da Família de Petrópolis foram submetidas ao tratamento com o bioterápico do tipo íntegro 30DH e acompanhadas durante um ano. Este estudo foi realizado em parceria com o Instituto Roberto Costa, da cidade de Petrópolis.

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 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).

No modelo de infecção pelo vírus Influenza A, a partícula viral adsorve-se às células, através da ligação entre a glicoproteína hemaglutinina (HA) e os 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 pelo complexo polimerase (PB2-PB1-PA) que age 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 (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, associados a quadros benignos do resfriado e de menor incidência dos vírus A e B, diferem destes, entre outras características, pela ausência do gene codificador da neuraminidase (PROBER *et al.*, 2002).

2.2 GRIPE

A gripe é uma doença infecciosa aguda de origem viral que acomete o trato respiratório e, a cada epidemia sazonal, 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. Seu agente etiológico é o vírus influenza ou vírus da gripe que já apresentou algumas de suas características

descritas anteriormente. 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 10/04/2013).

A infecção geralmente dura uma semana e 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/index.html>, acessado em 10/04/2013), nas epidemias de influenza, a cada ano.

2.2.1. Etapas e sintomas da gripe

O período de incubação da gripe consiste no tempo entre o contato inicial com o vírus e o aparecimento dos primeiros sintomas. A incubação do vírus influenza se dá, geralmente, por dois dias, mas pode ser de um dia a quatro dias (FORLEO-NETO *et al.*, 2003).

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 aureus*, *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 27/04/2013);

- 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 ou pode, inclusive aparecer após a administração da vacina contra a gripe (DOMINGUES, 2012; <http://www.ninds.nih.gov/disorders/gbs/gbs.htm>, acessado em 10/04/2013);
- 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

Pandemias de influenza têm ocorrido ao longo da história, se disseminando largamente infectando uma grande proporção de pessoas. A pandemia pode ocorrer quando uma cepa do vírus é transmitida a humanos a partir de espécies animais como os porcos, galinhas e patos. A OMS alerta para um risco substancial de nova pandemia. Os candidatos mais fortes devido às suas características específicas de patogenicidade são os subtipos: H7N9, H7N3, H7N7 e H9N2 de vírus influenza A. O impacto causado por uma pandemia dessas é difícil de prever, pois depende da virulência do vírus da imunidade pré-existente das pessoas devido aos anticorpos adquiridos através das infecções sazonais de influenza e de fatores do hospedeiro (MICHAELIS, 2009).

Três importantes pandemias de gripe ocorreram no último século, a última tendo ocorrido no período de 2009 – 2010. 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.

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 (PALESE, 2004).

No período 2009-2010, aconteceu a primeira pandemia do século XXI, iniciada no México e se disseminando nos Estados Unidos a partir do estado da Califórnia, atingindo todo o mundo. O agente etiológico foi o vírus H1N1 tendo sido responsável por cerca de 18.500 mortes confirmadas, estudo recente indica estes números como subavaliados e estimam o número total de mortes entre 105.700 e 395.600, atingindo 214 países (TSCHERNE & GARCIA SASTRE, 2011; DAWOOD *et al.*, 2012).

Dados recentes da OMS mostram que uma nova gripe chegou a China originada pelo vírus influenza subtipo H7N9 que já levou a confirmação, até abril de 2013, de 108 casos, incluindo 22 mortes, (http://www.who.int/csr/don/2013_04_09/en/index.html, acesso em 27/04/2013).

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, crianças, profissionais de saúde, adultos de 20 a 29 anos e gestantes. Em resposta a última pandemia, o governo brasileiro empreendeu a maior campanha de vacinação já organizada no país que gerou a administração de mais de 89 milhões de doses de março a julho de 2010, gerando um custo de 1,3 milhões de dólares ao Ministério da Saúde (DOMINGUES, 2012).

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). Para o ano de 2013, a vacina produzida no Brasil é trivalente e deve conter cepas de vírus A/H3N2, A/H1N1 e B (http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0052_28_09_2012.html, acesso em 10/04/2013).

Alguns efeitos adversos foram relatados pelas pessoas que receberam a vacinação, a saber: síndrome de Guillain Barre, paralisia facial, casos de anafilaxia, febre, porém a maioria dos efeitos adversos é do tipo leve a moderado (DOMINGUES, 2012).

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⁺. 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 gastrointestinal, aspectos que têm restringido sua utilização na prática clínica. No ano de 2009 – 2010, 99% dos vírus circulantes nos Estados Unidos eram do subtipo H1N1 e todos eles eram resistentes a amantadina e rimantadina e suscetíveis a

oseltamivir (RASMUSSEN *et al.*, 2011; 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. 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 à agregação dos vírus entre si e na membrana citoplasmática da célula infectada, não permitindo a disseminação da infecção.

O surgimento de resistência a estes medicamentos antivirais tem sido observado pelo mundo (MONTA *et al.*, 2006; RASMUSSEN *et al.*, 2011).

2.2.4. Resposta imunológica ao vírus influenza

A resposta imunológica natural e adquirida ao vírus influenza tem por objetivo bloquear a infecção e eliminar células infectadas (ABBAS *et al.*, 2008). Os vírus são inicialmente detectados e destruídos pelos mecanismos de resposta imunológica inata não específica, mas, caso os vírus escapem desta defesa, são detectados e eliminados pelos mecanismos da resposta imunológica adaptativa (TAMURA e KURATA, 2004).

A resposta à infecção de vírus influenza envolve uma cascata de eventos mediada por várias células e moléculas que destroem as células infectadas, limita a propagação de novos vírus e neutraliza vírus livres (TAMURA e KURATA, 2004).

Células apresentadoras de antígeno (APC) são essenciais na indução e amplificação da resposta imunológica em humanos (AKIRA *et al.*, 2001). Os antígenos virais compreendem

as partículas virais inativadas, vírus intactos e apoptóticos, células infectadas sendo, então, endocitados e os peptídeos se ligam às moléculas MHC classe I e II das APCs (TAMURA e KURATA, 2004). O objetivo da APC é estimular tanto a imunidade inata quanto a adaptativa.

Como primeira linha de defesa, APC e células infectadas estimulam a imunidade inata através da secreção de interferons (IFN α e β) (JULKUNEN *et al.*, 2001) que interagem com células saudáveis e as transformam em resistentes, prevenindo, de forma eficiente, a propagação de novos vírus, permitindo que a resposta imune adaptativa se desenvolva a tempo de eliminar os vírus. A liberação de IFN também é responsável por promover os sintomas como febre que ocorre no início da infecção e, a dimensão destes sintomas, está relacionada com o grau de eliminação dos vírus (TAMURA e KURATA, 2004).

Como segunda linha de defesa, a APC estimula os componentes celulares da imunidade inata que consiste em células efectoras como as células T citotóxicas (CTL) ou *Natural killer* (NK) que destroem as células infectadas, antes que elas liberem os vírus. As células NK são ativadas por citocinas IL-1, IL-6, TNF- α e IL-12 liberadas pelos macrófagos. Células T ativadas produzem vários fatores importantes na cinética da infecção por vírus influenza, a saber: células T helper secretam IL-2 e CTL produzem IFN- γ que aumenta a expressão de MHC, agindo na destruição de células infectadas por vírus. Os peptídeos do complexo MHC classe I apresentados nas células infectadas são reconhecidos pelas células T CD8⁺ (células Th1) que destroem células infectadas (TAMURA *et al.*, 2005).

Finalmente, as células APC estimulam a imunidade adaptativa pela ativação da proliferação de células sanguíneas específicas que produzem anticorpos que se ligam aos vírus influenza e os neutralizam. Os antígenos neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA) são endocitados pela APC e são degradados. Os peptídeos resultantes são carregados pelas moléculas MHC classe II e expressas pelo APC. O complexo MHC classe II e peptídeo são reconhecidos pelas células T CD4⁺ (células TH2) o que resulta na produção de anticorpos

específicos para HA e NA. Anticorpos anti-HA neutralizam a infectividade do vírus, enquanto que anticorpos anti-NA previnem a liberação de vírus das células infectadas (JOHANSSON *et al.*, 1989) o que leva a uma aceleração na recuperação da infecção (TAMURA *et al.*, 2005; HANCIOGLU *et al.*, 2007).

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.. A terapêutica homeopática 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, 2005; 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, 2005).

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, 2005; 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 (FONTES, 2005).

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/ResumoExecutivoMed/NatPratCompl1402052.pdf> . acesso em 10/04/13).

Em 1977, no Brasil, foi publicada a primeira edição da Farmacopéia Homeopática Brasileira (FHB) após a publicação do Decreto nº 78.841 (BRASIL, 1977). Vinte anos mais tarde, foi publicada a segunda edição (BRASIL, 1997). No ano de 2003 foi publicada a segunda parte desta mesma edição, na qual foram incluídas monografias de substâncias utilizadas em homeopatia. Mais recentemente, a 3ª edição foi publicada no ano de 2011 e está disponível pela internet no endereço http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf (BRASIL, 1976; BRASIL, 2011 <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15457&word>, acessado em 10/04/13).

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, 2005).

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 10/04/13).

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 10/04/13).

2.3.2. Princípios básicos da homeopatia

Esta ciência tem por fundamento quatro princípios: o “Princípio da Semelhança”; a “Experimentação no homem sã”; “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 apoia 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, 2005).

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, 2005).

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 cinquenta milesimal. 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, 2011). 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, 2005).

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. 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, 2011). 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 (ABFH, 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, 2005).

2.4.1. História

O termo nosódio se refere ao medicamento feito a partir de tecido ou secreções patológicas. Tecnicamente, um nosódio é preparado a partir do material patológico de vegetais, animais ou humanos. Como exemplos, temos: *Secale cornutum* e *Ustilago maidis*: nosódios vegetais preparados a partir do fungo que infesta centeio e milho, respectivamente; *Tuberculinum bovinum*: nosódio animal preparado a partir do escarro de uma vaca com tuberculose bovina; *Psorinum*: produto de doença humana, preparado a partir do conteúdo da vesícula da sarna. O preparado destes medicamentos envolve a trituração com lactose da secreção patogênica, fluido de erupções ou tecido patológico seguida de succussão, considerando a escala e método preconizados. 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 com 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 preparado 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, 2005). 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. A isopatia se baseia no tratamento das doenças com produtos dinamizados oriundos da mesma doença e se baseia na lei “Igual cura o Igual”. Entretanto, os medicamentos isopáticos têm uma aplicação muito mais específica do que os outros homeopáticos com usos mais direcionados a determinadas doenças enquanto os homeopáticos podem apresentar uma vasta indicação para aspectos mentais, emocionais e fisiológicos, do paciente (FONTES, 2005; 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, 2005) 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, 2005). O racional desta indicação segue a premissa de que a secreção patológica encerra em si os microorganismos ou talvez os antígenos, que originaram a 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, Allen publicou a primeira “Matéria Médica dos Nosódios”, considerada a mais importante obra 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 patogênese 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 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 patogênese (KOSSAK-ROMANACH, 2003).

Alguns homeopatas consideram os nosódios como isopatias desde que administrados para a cura de uma mesma doença. Mas os nosódios também são prescritos para uma vasta gama de 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).

2.4.2. Isoterápicos

São preparações medicamentosas obtidas a partir de insumos relacionados com a patologia / enfermidade do paciente (BRASIL, 2011). São 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.

2.4.3. 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*) com aumento das 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).

Costa e colaboradores estudaram o efeito do bioterápico *Candida albicans* 30DH em cultura de células e verificaram uma diminuição dos índices de adesão das leveduras à células epiteliais previamente tratadas com este bioterápico (COSTA, 2008).

Ferraz e colaboradores verificaram que os camundongos respondem de maneira diferente a bioterápico de tripomastigota 7DH administrados antes da infecção, sugerindo um efeito do sistema imunológico do hospedeiro (FERRAZ *et al.*, 2011).

Siqueira e colaboradores observaram alterações celulares e bioquímicas em células de rim canino (MDCK) e macrófagos (J774G8) receberam tratamento com bioterápico de vírus influenza 30DH, sendo este estudo prévio a esta tese de doutorado (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

2.4.4. 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 no sistema imune do organismo oriunda da memória imunológica, induzida por este mesmo agente causal (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 protocolo do Dr. Roberto Costa envolve o uso de diluentes, como a solução salina (cloreto de sódio a 0,9%), nas primeiras dinamizações das suspensões microbianas. Para o caso específico de dinamizações contendo partículas virais, Dr. Roberto Costa orientava que a manipulação fosse feita em água destilada afim de excluir a participação de íons sódio e cloreto do efeito terapêutico. De fato, estudos prévios conduzidos por Siqueira e colaboradores indicaram ser possível preservar a integridade do vírus influenza A/Aichi/2/68 quando o mesmo é dinamizado em água destilada estéril (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

2.4.5. Tratamento da gripe com bioterápicos

Atualmente, na medicina homeopática existe o medicamento *Influenzinum* (GUTMAN, 1989; PERKER *et al.*, 1999). Este bioterápico foi desenvolvido a partir da vacina antigripal do Instituto Pasteur (ABFH, 2003; FONTES, 2005) e teve sua eficácia comprovada por observação clínica (PERKER *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 pelo Dr. Joseph Roy, na França em 1919. É um medicamento preparado a partir do auto lisado filtrado de fígado e coração de pato (*Anas barbarie*) e foi introduzido nos Estados Unidos, em 1984. Um estudo duplo cego, placebo controlado realizado 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 *Oscillococcinum* 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).

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo geral:

- Avaliar os possíveis mecanismos de ação de formulações farmacêuticas homeopáticas, do tipo bioterápico de influenza A, para o tratamento da gripe humana.

3.2. Objetivos específicos:

- Preparar bioterápicos a partir de amostras íntegras e inativadas de vírus influenza H3N2;
- Avaliar por microscopia eletrônica de transmissão características morfológicas das diferentes preparações virais;
- Avaliar a respiração celular, produção de lactato, citrato sintase e hidrólise de ATP na linhagem MDCK tratada pelos diferentes bioterápicos;
- Quantificar a atividade da enzima fosfofrutocinase-1 de células MDCK estimuladas pelos bioterápicos em estudos;
- Avaliar a resposta de macrófagos estimulados por bioterápicos preparados a partir do vírus influenza íntegro H3N2 e a partir dos mesmos vírus inativados;
- Avaliar a produção de diferentes citocinas e de óxido nítrico por macrófagos estimulados pelos bioterápicos em estudo;
- Avaliar as repostas imuno-farmacológicas em camundongos tratados pelos bioterápicos;
- Avaliar a resposta clínica induzida por bioterápicos em crianças saudáveis do Programa de Saúde de Família de Petrópolis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Equipamentos

Balança analítica – METTLER TOLEDO – AG 204;

Braço mecânico - AUTIC;

Câmera fotográfica Panasonic Lumix SZ35;

Capela de Fluxo Laminar – VECO – ULFS 12;

Citômetro de Fluxo – modelos FACScalibur e ATTUNE;

Estufa de cultura – FANEM – 002CB;

Estufas de esterilização – Modelo 315SE - FANEM;

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

Espectrofotômetro - SHIMADZU UV 2401 PC;

Isoladores – Technoplast;

Leitor de microplacas VICTOR3 (PerkinElmer, USA);

Microscópio eletrônico de transmissão - MORGANY/ FEI;

Microscópio invertido - OLYMPUS;

Microscópio óptico de fluorescência - AXIOPLAN II/Zeiss;

Panela Elétrica – Panasonic;

Ultracentrífuga Beckman - Modelo Optima LE-80K.

4.2. MÉTODOS:

4.2.1. Preparação e titulação da amostra viral

As amostras de vírus influenza subtipo H3N2 A/Aichi/2/68 e A/Victoria/3/75 foram preparadas 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 1). 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; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

A titulação das amostras virais purificadas, 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.

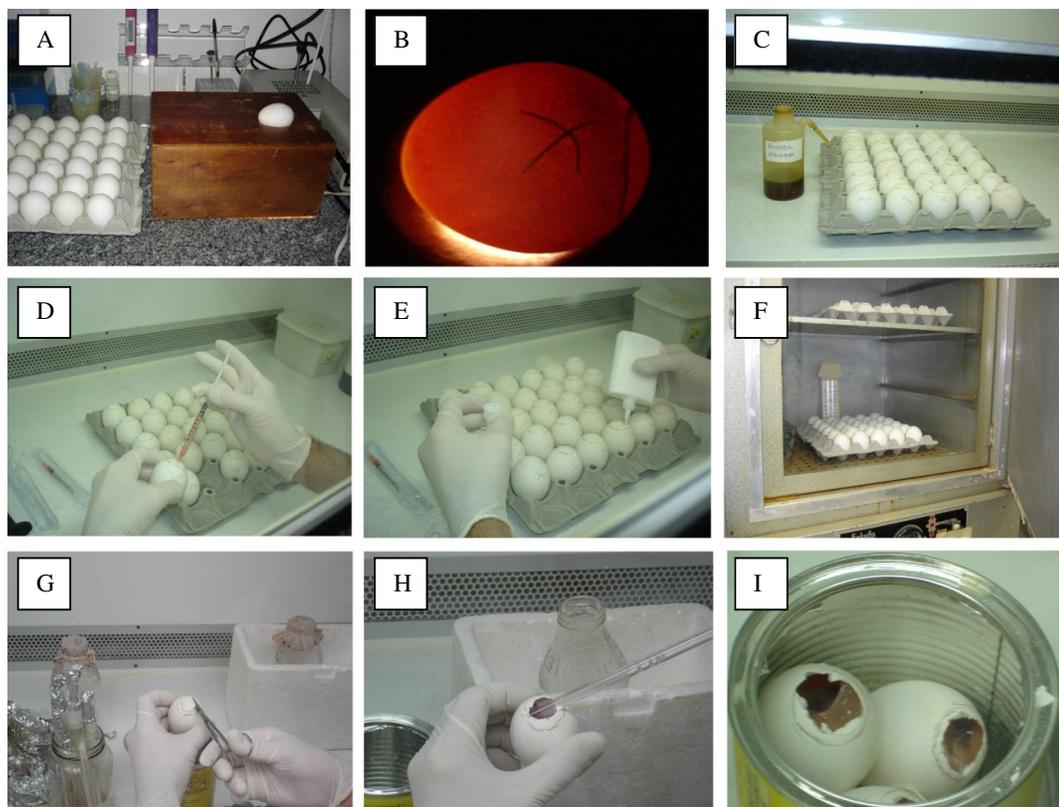


Figura 1: Esquema de produção de massa viral. (A) localização do embrião por ovoscopia; (B) marcação da cavidade alantóica por ovoscopia; (C) colocação do material em fluxo laminar; (D) inoculação de vírus; (E) fechamento dos orifícios nos ovos; (F) incubação em estufa; (G) abertura/ corte dos ovos; (H) recolhimento do líquido alantóico para obtenção da massa viral a ser manipulada; (I) inutilização do material não aproveitado.

4.2.2. Preparação dos bioterápicos

Os bioterápicos foram preparados a partir das amostras íntegras e inativadas de duas amostras de vírus influenza, A/Aichi/2/68 (H3N2), utilizadas para o estudo *in vitro* e pré-clínico e, A/Victoria/3/75, usados no clínico. O vírus A/Aichi/2/68 é uma cepa original da Pandemia Hong Kong de 1975 cedida por Toon Stegmann (Laboratory of Physiological Chemistry, University of Groningen, The Netherlands) enquanto que a amostra A/Victoria/3/75 foi gentilmente cedida pelo professor José Nelson Couceiro do laboratório de virologia, UFRJ. Estas preparações purificadas foram, então, submetidas ao processo de diluições sucessivas para o preparo do bioterápico conforme descrito na Farmacopeia Homeopática Brasileira (BRASIL, 2011). Nesta tese foram preparadas amostras de bioterápicos a partir de vírus íntegro e inativado, nas potências 12 e 30DH.

A preparação dos bioterápicos íntegros 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 µL, foi submetida ao processo de diluições sucessivas e sucussões para preparação do bioterápico. Para isto, 0,1 ml da amostra viral foram adicionados a 0,9 ml de água destilada estéril. Em seguida, estas preparações foram submetidas a 100 sucussões 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; esta solução foi submetida a 100 sucussões e, assim, foi obtido o bioterápico 2DH (BRASIL, 2011). Este procedimento foi repetido, sucessivamente, até a obtenção dos bioterápicos em 12DH e 30DH, que foram denominados, respectivamente, de H3N2 A 12DH e H3N2 A 30DH.

O bioterápico inativado pelo uso de solução hidroalcoólica 70% foi manipulado da mesma forma anterior, porém, a primeira dinamização (1DH) foi realizada tendo esta solução como veículo com o objetivo de inativar as partículas virais. A partir da potência 2DH, o veículo utilizado foi água destilada estéril até a potência desejada. Os bioterápicos manipulados nas potências 12DH e 30DH foram chamados, respectivamente, de H3N2 I 12DH e H3N2 I 30DH.

O mesmo procedimento foi realizado com a água destilada estéril para obtenção das soluções controle, sendo as mesmas denominadas de H2O 12DH e H2O 30DH.

4.2.3. Avaliação da integridade da partícula viral por microscopia eletrônica de transmissão

A integridade da partícula viral, no bioterápico que teve como ponto de partida o vírus íntegro, foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (Morgagni 268/FEI). Para este

ensaio, 5 µl do bioterápico 1DH manipulado em água, 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 (SIQUEIRA, 2009).

O mesmo procedimento foi realizado para o bioterápico na potência 1DH preparado com o vírus inativado para a certificação de que não havia qualquer partícula íntegra na solução.

4.3. MÉTODOS UTILIZADOS NOS ESTUDOS *IN VITRO*

4.3.1. Tratamento das células MDCK

Uma suspensão celular de MDCK (Madin-Darby canine kidney) contendo 5×10^4 cels/ml foi mantida em garrafas de cultura de células por 3 dias, a 37 °C, para obtenção de uma monocamada confluyente de células que teve como meio nutricional DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10% (SIQUEIRA, 2009). Após este período, as células começavam a receber tratamento com os medicamentos, nas respectivas garrafas. O período de incubação com as soluções teste duravam 2 dias, quando as mesmas recebiam um total de 6 tratamentos ou, 4 dias, quando recebiam um total de 18 tratamentos.

Os bioterápicos preparados conforme o item 4.2.2 foram acrescentados à cada garrafa após adição de novo meio de crescimento, segundo o protocolo abaixo:

- Grupo 1: células MDCK que receberam 6 tratamentos com o bioterápico íntegro (H3N2 A 12DH);

- Grupo 2: células MDCK que receberam 6 tratamentos com o bioterápico íntegro (H3N2 A 30DH);
- Grupo 3: células MDCK que receberam 6 tratamentos com o bioterápico inativado (H3N2 I 12DH);
- Grupo 4: células MDCK que receberam 6 tratamentos com o bioterápico inativado (H3N2 I 30DH);
- Grupo 5: células MDCK que receberam 6 tratamentos com água dinamizada na potência 12DH (H2O 12DH);
- Grupo 6: células MDCK que receberam 6 tratamentos com água dinamizada na potência 30DH (H2O 30DH);
- Grupo 7: células MDCK que receberam 6 tratamentos com água destilada estéril (H2O);
- Grupo 8: células MDCK que receberam 18 tratamentos com o bioterápico íntegro (H3N2 A 12DH);
- Grupo 9: células MDCK que receberam 18 tratamentos com o bioterápico íntegro (H3N2 A 30DH);
- Grupo 10: células MDCK que receberam 18 tratamentos com o bioterápico inativado (H3N2 I 12DH);
- Grupo 11: células MDCK que receberam 18 tratamentos com o bioterápico inativado (H3N2 I 30DH);
- Grupo 12: células MDCK que receberam 18 tratamentos com água dinamizada na potência 12DH (H2O 12DH);

- Grupo 13: células MDCK que receberam 18 tratamentos com água dinamizada na potência 30DH (H₂O 30DH);
- Grupo 14: células MDCK que receberam 18 tratamentos com água destilada estéril (H₂O);
- Grupo 15: Controle negativo contendo células MDCK mantidas sob as mesmas condições experimentais, exceto pelo tratamento com as soluções testes (grupo CC);

Para a realização dos experimentos realizados no mínimo três vezes, de maneira independente e em quintuplicata, a cada troca de meio as respectivas soluções testes eram readicionadas.

4.3.2. Avaliação da ação dos bioterápicos sobre a linhagem MDCK

As células MDCK submetidas a diferentes situações experimentais, como descrito no item 4.3.1, foram avaliadas através das metodologias de análise descritas abaixo:

4.3.2.1. 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 brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um sal de tetrazólio hidrossolúvel, de cor amarelada em solução aquosa. O princípio deste método consiste na absorção do sal tetrazolium pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan (cor púrpura) pela enzima succinato desidrogenase (Figura 2). 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 ($\lambda = 490$ 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).

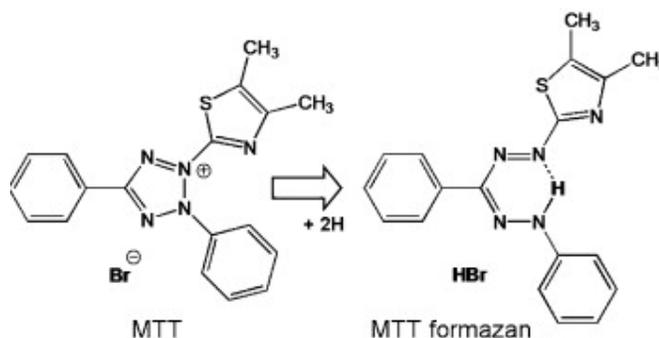


Figura 2: Representação esquemática da reação de redução do MTT. Adaptado de Storcket, 2012.

Nas condições experimentais testadas, as células MDCK foram plaqueadas em placa de 96 poços e, após 24h, foram incubadas com 20 μ l de MTT (5,0 mg/ml em PBS), por 3 horas, a 37 °C, na ausência de luz. Em seguida, a placa foi centrifugada e o sobrenadante foi desprezado. A cada poço foi adicionado 200 μ l de DMSO. A absorbância foi lida em leitor de placas do tipo ELISA (ThermoPlate) e os dados foram analisados pelo programa de estatística ANOVA. Foram feitos três experimentos independentes, em quintuplicata, nas células que receberam 6 e 18 tratamentos.

4.3.2.2. Avaliação da atividade da enzima Fosfofrutocinase-1 (PFK-1) nas células MDCK

A fosfofrutocinase é uma enzima da via glicolítica (Figura 3) 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).

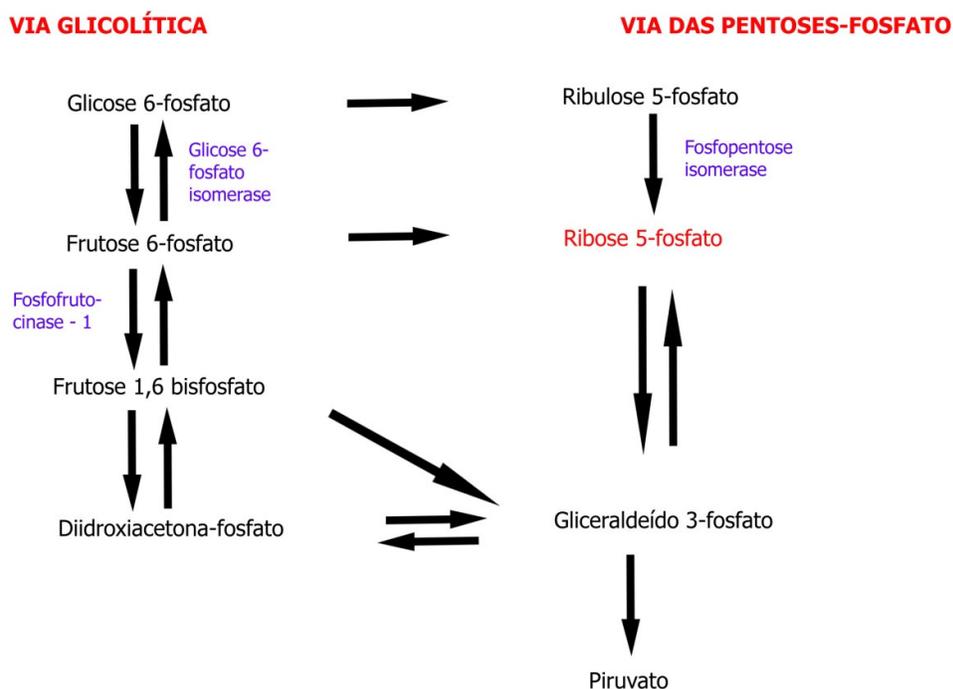


Figura 3: Esquema resumido da via glicolítica e pentoses-fosfato. Caso seja necessária a produção de nucleotídeos e/ou outro produto da via das pentoses, a via glicolítica é desviada para a via das pentoses-fosfato gerando ribose a partir dos produtos glicose-6-fosfato e/ou frutose-6-fosfato.

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 VICTOR3 (PerkinElmer, USA) a 340 nm (COELHO *et al.*, 2007).

4.3.2.3. Avaliação do Consumo de Oxigênio: Oxigrafia de Alta Resolução

A fim de avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a função mitocondrial e o metabolismo oxidativo das células MDCK, o consumo de oxigênio foi avaliado através de oxigrafia de alta resolução. O equipamento utilizado foi um Oxígrafo de Alta Resolução – Oroboros – Austria (com eletrodo de Clark). Este equipamento dispõe de um sensor polarográfico de oxigênio de alta sensibilidade posicionado numa câmara hermética onde a amostra (suspensão de células) é colocada. Este é acoplado a um computador com um *software* Oroboros O2k e as variações da concentração de oxigênio na câmara são medidas e o consumo pela amostra é calculado (GNAIGER, 2011). As células MDCK foram plaqueadas em garrafas na concentração de 5×10^4 células/ml e, 48 horas após este procedimento, as mesmas começaram a receber 6 ou 18 tratamentos para avaliação da resposta. Vale lembrar que neste experimento os tratamentos foram realizados com os bioterápicos preparados a partir do vírus íntegro nas potências 12DH e 30DH, água 30DH e água destilada estéril. No momento da determinação do consumo de oxigênio, as células foram retiradas das garrafas e contadas com auxílio do azul de tripan. Para a análise do consumo de oxigênio foram necessárias 5×10^5 células/ml. As células foram ressuspensas em 2 ml de meio DMEM sem suplementação com soro fetal bovino. A respiração basal das células foi medida a 37 °C. Foram utilizados diferentes inibidores para a avaliação dos parâmetros mitocondriais. As concentrações de cada inibidor utilizado estão indicadas nas legendas das Figuras. Foram realizados pelo menos seis experimentos independentes em duplicata.

4.3.2.4. Quantificação da enzima lactato desidrogenase

As células MDCK foram plaqueadas em placas de 12 poços e, após 24 horas, receberam 6 tratamentos, por 48 horas, ou 18 tratamentos, por 72 horas, com bioterápicos

íntegros nas potências 12DH e 30DH, água destilada estéril e água dinamizada 30DH. Após os tratamentos com as diferentes condições experimentais, o meio de cultura foi substituído por 2 ml de meio sem soro. Imediatamente após a troca de meios foram coletadas alíquotas de 100 µl em diferentes tempos (0, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos), e 100 µl de meio sem soro foram repostos aos poços. No tempo de 20 minutos, foi adicionado 1mM de KCN, um inibidor do complexo IV do sistema de transporte de elétron, o que induz a célula a utilizar somente a glicólise para a produção de ATP (*shift* metabólico). A avaliação do lactato foi realizada através de ensaio enzimático em tampão hidrazina/glicina (0,35/ 0,6M) (pH 9,2), contendo β -NAD⁺ 15 mM e lactato desidrogenase 30 unidades/ml. A formação de NADH foi quantificada em leitor de microplacas a 340 nm utilizando o fator de extinção molar para o NADH (3,44) (PEREIRA-DA-SILVA, 2009).

4.3.2.5. Quantificação da atividade de hidrólise de ATP

As células MDCK, na concentração de 5×10^4 cels/ml, foram plaqueadas em placa de 6 poços, por 24 horas. Após este período, as células receberam 6 ou 18 tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH e 30DH, água destilada estéril e água dinamizada 30DH. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 200 µl de PBS e congeladas a -70 °C até a análise. A atividade de hidrólise de ATP foi avaliada em diferentes tempos (0, 5, 10, 15 e 20 minutos) em um meio de reação contendo: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM ATP; 0,5 µM de FCCP; 100 mM de KCl e 10 mM MgCl₂, a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 50 µl de células. Como controle foi realizado o mesmo procedimento na presença de azida (NaN₃) que é um inibidor da ATP sintase mitocondrial. A medida da hidrólise de ATP foi realizada através da quantificação do fosfato inorgânico liberado (Pi) pelo método de Fiske & Subbarow (1925) através da atividade NaN₃ sensível. A reação de

quantificação de Pi foi determinada em espectrofotômetro a 660nm, utilizando um curva padrão com concentrações conhecidas de Pi.

4.3.2.6. Quantificação da atividade de citrato sintase

A atividade de citrato sintase foi avaliada por método espectrofotométrico utilizando o reagente de Ellmans (DTNB). A reação foi realizada em meio contendo fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 10 mM, EDTA 2 mM, DTNB 2 mM e Triton X-100 0,1% (v/v), ao qual foi adicionado 20 μl de amostra. A reação foi iniciada ao adicionar 1,25 μl de acetil CoA 0,1mM e 5 μl de oxaloacetato 5mM a 0,5 ml de meio de ensaio com pH 7,2. Como amostra foi utilizado um homogeneizado de células MDCK, contendo 5×10^4 cels/ml, plaqueadas em placa de 6 poços, por 24 horas. Após este período, as células receberam 6 ou 18 tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH e 30DH, água destilada estéril e água dinamizada 30DH. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 200 μl de PBS e congeladas a -70°C até a análise (KUZNETSOV, 2010).

4.3.2.7. Dosagem de proteína

Para os experimentos de atividade enzimática, a determinação da concentração de proteína foi realizada através do método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.3.3. Tratamento dos macrófagos J774.G8 com os bioterápicos

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 infectados 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 e quimiocinas como a MCP1 (JULKUNEN *et al.*, 2001; SPRENGER, 1996).

Para avaliação da produção de citocinas, a linhagem de macrófagos J774.G8, mantida em meio RPMI, foi submetida a tratamentos com 10% V/V de bioterápicos íntegro e inativado na potência 30DH, água 30DH e água destilada estéril. Foram conduzidos 6 tratamentos divididos em dois dias. A potência 12DH não foi utilizada neste experimento, pois a presença de qualquer partícula viral ou parte dela resultaria na ativação dos macrófagos. Como estudos anteriores verificaram a ausência de qualquer partícula na potência 30DH, esta foi a potência de escolha para o presente experimento (SIQUEIRA, 2009).

Os macrófagos foram plaqueados em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^4 cels/ml e submetidos aos 6 tratamentos com os bioterápicos 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 realizados 3 experimentos em duplicata.

4.3.3.1. Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos J774.G8

A análise dos sobrenadantes resultantes dos tratamentos dos macrófagos J774.G8 descrito anteriormente, foi feita por Citometria de Fluxo [FACScalibur (Becton Dickenson e BD) equipado com laser de íon argônio (488 nm)]. Esta análise foi feita na Universidade Federal do Paraná em parceria com o Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas, sob a coordenação da Prof Dra Dorly de Freitas Buchi e orientação da Prof Dra Eneida Janiscki da Lozzo. As amostras dos sobrenadantes foram enviadas em gelo seco, de avião, para a referida universidade. As citocinas detectadas neste experimento foram interleucina-10 (IL 10), interleucina-12 (IL 12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e a quimiocina MCP1. O kit utilizado para essa quantificação foi Mouse Inflammation Kit (BD Cytometric Bead Array) e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 50 μ l dos *beads* de captura em tubos de ensaio apropriados e homogeneizados antes de adicioná-los aos tubos dos experimentos. Estes tubos receberam 50 μ l de cada sobrenadante já descongelado e, à estes tubos, foram adicionados 50 μ l dos anticorpos contra as citocinas IL 10, IL 12, TNF- α e MCP1 conjugados com ficoeritrina (PE) por 2 horas, à temperatura ambiente e no escuro. A cada tubo do experimento foram adicionados 1 ml da solução de lavagem (*washing buffer*) e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 200 \times g, por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado, acrescido de 300 μ l de solução de lavagem a cada tubo e homogeneizado em “vortex”. Finalmente, a fluorescência foi medida em citômetro de fluxo. A concentração da citocina foi obtida pela comparação dos dados obtidos em cada grupo experimental com aqueles oriundos da curva padrão da citocina, utilizando um software específico (*software* BD CBA). Essa dosagem foi realizada levando-se em consideração três experimentos independentes em duplicata. Os resultados foram avaliados e expressos em pg/mL.

4.3.4. Dosagem de óxido nítrico produzidos pelos macrófagos RAW 264-7

A dosagem de óxido nítrico foi feita com macrófagos RAW 264-7 em cultura uma vez que a produção deste indica ativação dos mesmos (OLIVEIRA, 2011). Macrófagos (5×10^6 cels/ml) da linhagem de macrófagos RAW 264-7 foram previamente plaqueados em placa de 96 poços, por 24 horas, a 37 °C em estufa de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi removido para retirada das células não aderentes e os macrófagos foram tratados pelos respectivos grupos experimentais: bioterápicos íntegro e inativado na potência 30DH, água 30DH e água destilada estéril, estes dois últimos, controles do experimento. Pelo motivo explicado anteriormente, a potência 12DH não foi utilizada neste experimento. No primeiro dia de tratamento, os 200 µl do sobrenadante da cultura celular foram substituídos por 100 µl de meio com a solução teste a 10% como primeiro tratamento. No mesmo dia, após 4 horas, para o segundo tratamento foram acrescentados 100 µl da solução descrita acima. No segundo dia de tratamento, o mesmo procedimento do primeiro dia de tratamento foi repetido. Ao final das 48 horas de incubação (equivalente a 4 tratamentos) com as soluções teste, os macrófagos foram ativados com LPS (100 ng/mL) e novamente incubados por 24 horas, a 37 °C. Em seguida, 100µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para outra placa de 96 poços e homogeneizados, em igual volume, com reagente de Griess (1:1 de Solução A: naftiletilenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e Solução B: Sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5%), à temperatura ambiente. A leitura foi feita imediatamente após a homogeneização em leitor de placa em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito produzida foi calculada de acordo com a curva padrão de nitrito de sódio (concentrações: 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 250 µg/mL) o qual é um produto estável da reação de produção de NO, no sobrenadante das culturas (GREEN *et al.*, 1982).

4.3.4.1. Avaliação da atividade mitocondrial dos macrófagos RAW 264-7 por MTT

O método MTT mede a atividade mitocondrial de células viáveis, sendo sensível para avaliar a viabilidade e a atividade celular como já descrito anteriormente (MOSMANN, 1983). Alterações na atividade mitocondrial celular resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente, na absorbância, o que permite quantificar a atividade mitocondrial dos macrófagos nas diferentes situações experimentais (MOSMANN, 1983). Em placa de 96 poços, foram colocados 5×10^6 cels / mL da linhagem de macrófagos RAW 264-7 e os mesmos foram tratados pelos bioterápicos íntegro e inativado na potência 30DH, água 30DH e água destilada estéril, estes dois últimos, controles do experimento. Após a retirada do sobrenadante para avaliação da produção de óxido nítrico, as células 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, os sobrenadantes, após centrifugação, foram desprezados e substituídos por 200 µl de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em leitor de placas do tipo ELISA e os dados foram analisados pelo programa de estatística ANOVA. Foram realizados três experimentos independentes, em quintuplicata, utilizando os macrófagos tratados por 4 vezes durante 48 horas.

4.4. MÉTODOS UTILIZADOS NO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

4.4.1. Experimentos com camundongos Balb-c

4.4.2. Animais

Os procedimentos experimentais usados para o estudo pré-clínico desta tese foram aprovados pelo Comitê de ética com uso de animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob os números DFBCICB 037 e DFBCICB 040 (ANEXO 1 e 2).

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Paulista, sob orientação da Prof Dra Leoni Bonamin. Para tanto, sessenta e dois camundongos balb-c com 28 dias de idade foram avaliados durante 42 dias. Os mesmos chegaram ao biotério com 21 dias de vida e foram separados randomicamente em isoladores (Techinoplast®) onde recebiam água autoclavada e ração comercial *ad libitum*, sendo mantidos em quarentena durante 7 dias, com observações diárias do início até o final do experimento. As condições ambientais foram controladas durante todo o período experimental, com temperatura variando entre 20 a 24°C, umidade 50 a 65% e ciclo de luz controlado, de 12 em 12 horas. Os isoladores recebiam 75 ciclos de trocas de ar por hora. O peso dos animais, assim como o consumo de água e ração, foi registrado 3 vezes por semana, durante todo o período do experimento. A manipulação desses animais foi feita exclusivamente por técnicos e pessoas autorizadas e, nesta fase, nenhum evento ambiental extraordinário foi notado.

4.4.3. Experimento I – Patogenesia e Imunologia

O objetivo do Experimento I foi observar alteração comportamental e/ou alterações em alguns órgãos quando animais saudáveis foram tratados com as soluções teste. Esta primeira etapa do Experimento I denominada de Patogenesia, transcorreu durante 21 dias. Além disso, os mesmos animais foram utilizados para o experimento denominado “imunologia” a partir do 21º dia de experimento, segundo a seguinte metodologia:

4.4.3.1. Protocolo de Patogenesia

Os animais do *set* P foram tratados durante 21 dias e os medicamentos avaliados foram Timulina 5CH, bioterápico inativado 30DH, bioterápico íntegro 30DH e água 30DH. Vale lembrar que o medicamento Timulina 5CH já foi estudado anteriormente em camundongos, sendo demonstrado seu efeito imunomodulador em diferentes situações experimentais (SATO *et al.*, 2012; BONAMIN *et al.*, 2013).

Os grupos foram divididos de acordo com as seguintes soluções-teste:

Grupo A – Tratados com Timulina 5CH;

Grupo B – Tratados com água 30DH;

Grupo C – Tratados com vírus H3N2 inativado 30DH;

Grupo D – Tratados com vírus H3N2 íntegro 30DH;

Grupo Controle – não receberam tratamento.

As soluções-teste foram administradas na água de bebida na concentração de 1% (V/V) e, para isso, 2,5 ml do medicamento foi colocado em 247,5 ml de água autoclavada em cada bebedouro e a distribuição dos medicamentos nos grupos foi conduzido em cego, sendo revelado somente após o término da análise estatística.

No 21º dia, os animais foram submetidos a 5 minutos de sessão no Campo Aberto (Figura 4) e, com este ensaio, foram observados: o número de cíbalas, poços de urinas, frequência de locomoção, de levantamento, limpeza da face (*grooming*) e o tempo em que o animal permanecia parado. Este experimento foi realizado sempre pela manhã e, a cada troca de animal, o campo aberto era limpo com solução hidroalcoólica 20%, para evitar qualquer alteração comportamental em função de estímulos olfativos. Cada animal foi filmado durante as sessões com uma câmera fotográfica (Panasonic Lumix SZ35) e as imagens foram analisadas posteriormente para a avaliação dos parâmetros. Todos os animais, após a sessão

de Campo Aberto, foram eutanasiados em câmara de CO₂ e submetidos à necropsia para a retirada e pesagem de baço e do conjunto: coração, pulmões e linfonodo mediastínico, usando balança semi-analítica. Fragmentos representativos destes órgãos foram fixados em formol 10% tamponado para processamento histológico convencional. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e observados em microscópio óptico para análise histopatológica e de histometria. As lâminas de coração, pulmão e linfonodo mediastínico foram analisadas de forma qualitativa. As lâminas de baço, coradas com HE, foram analisadas utilizando o software de análise de imagens Image Tool 3.0, sendo medidos, em pixels, o diâmetro dos folículos linfóides e dos respectivos centros germinativos e a relação entre ambos foi considerada para a análise estatística.



Figura 4: Representação do Campo Aberto utilizado nos experimentos com animais.

4.4.3.2. Protocolo de Imunidade

Os animais do grupo I também foram tratados durante 21 dias com os mesmos medicamentos e, após esse período de tratamento, foram desafiados, por via subcutânea, com 200 µl do antígeno viral hemaglutinina na concentração de 7 µg / 200 µl (cepa Wisconsin H3N2 35 µg / ampola) e acompanhados por mais 21 dias para avaliação do comportamento, pela técnica do Campo Aberto. Todos os animais, após a sessão de Campo Aberto, foram

eutanasiados em câmara de CO₂ e necropsiados conforme descrito no Protocolo de Patogenesia para as mesmas análises.

4.4.4. Experimento II – Avaliação imuno-histoquímica do baço e citometria de fluxo do lavado peritoneal dos camundongos

O objetivo deste experimento II foi observar alterações em alguns órgãos, bem como a produção de células do sistema imunológico dos animais tratados com as soluções teste e desafiados com o antígeno hemaglutinina de influenza. Neste experimento, avaliamos os bioterápicos com potências diferentes 12DH e 30DH, porém todos bioterápicos preparados a partir de vírus íntegros uma vez que o experimento I mostrou melhores resultados nos camundongos tratados com esse tipo de bioterápico.

Trinta camundongos S.P.F. (livre de patógenos específicos) com 28 dias de idade foram avaliados durante 42 dias. Foram estudados em seis grupos contendo 5 animais cada grupo, a saber: camundongos tratados pelo bioterápico íntegro 12DH; camundongos tratados pelo bioterápico íntegro 30DH; camundongos tratados por timulina 5CH e camundongos tratados com água dinamizada 30DH. A distribuição dos medicamentos nos grupos foi feita em cego, ou seja, o código de cada grupo foi elaborado por uma pessoa que não estava envolvida com o experimento, sendo revelado somente após o término da análise estatística. Assim sendo, os grupos ficaram da seguinte forma:

Grupo A – Tratados com Timulina 5 CH

Grupo B – Tratados com H3N2 íntegro 30 DH

Grupo C – Tratados com H3N2 íntegro 12 DH

Grupo D – Tratados com água 30 DH

O acompanhamento dos animais quanto ao consumo de água e ração e seus respectivos pesos foi conduzido de acordo com o protocolo descrito acima para o experimento I.

No 21º dia, os animais receberam o mesmo antígeno de hemaglutinina utilizado no experimento I e, no 42º dia, os animais de cada grupo foram submetidos à necrópsia com a retirada do baço, sendo este fixado em paraformaldeído a 8% para posterior análise imuno-histoquímica. Para esta análise, as amostras de baço emblocadas em parafina foram cortadas em cortes de 5 micra de espessura e montadas em lâminas previamente silanizadas. A desparafinização foi feita em dois banhos de xilol absoluto e outros dois banhos de álcool absoluto, sendo 3 minutos cada, com agitação. A recuperação antigênica foi feita por calor úmido a 80°C por 20 minutos, em panela elétrica (PANASONIC®), sendo os cortes imersos em tampão citrato (DAKO). Os cortes foram lavados em PBS, pH = 7,2 (SIGMA) durante 5 minutos com agitação, secos e os tecidos foram delimitados com um marcador hidrofóbico de lâmina (Pap-pen/ AbCAM). A atividade peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 5% em metanol, durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Após nova lavagem em PBS, para bloqueio dos sítios inespecíficos de adsorção de anticorpos, os cortes foram tratados com soro de cavalo normal 2,5% (VECTOR) durante vinte minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas com os respectivos anticorpos primários anti- CD3, anti-CD11b e anti-CD45RA (SEROTEC ®) marcadores, respectivamente, de linfócitos T, fagócitos em migração e linfócitos B. A incubação foi feita *overnight*, a 4 °C, em câmara úmida. Todas as diluições foram feitas usando diluente específico para imuno-histoquímica (DAKO).

No dia seguinte, os cortes foram novamente lavados em PBS e tratados com polímero conjugado ao anticorpo secundário (VECTOR) anti-IgG de rato, durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram revelados com DAB (DAKO) por alguns segundos,

até o aparecimento de cor marrom fraca, contra-corados com hematoxilina de Harris e montados em lâmina e lamínula. O controle negativo foi feito simultaneamente, pela adição de diluente puro em uma lâmina extra. As lâminas marcadas por imuno-histoquímica foram avaliadas pela distribuição dos fagócitos, linfócitos B e linfócitos T no tecido linfóide pela delimitação da área de positividade para cada marcador, em relação à área total do corte, medida em pixels, utilizando o programa Image Tool 3.0.

Adicionalmente, os animais de todos os grupos foram submetidos a lavagem peritoneal, tendo sido preparado um *pool* deste material para análise em citômetro de fluxo. Para este procedimento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e levados para capela de fluxo laminar onde tiveram seus peritôneos abertos cuidadosamente. Esta lavagem foi feita com injeção de 5 ml de meio RPMI e, após massagem do peritônio para desprendimento destas células, os lavados de cada grupo experimental foram colhidos com seringa e transferidos para o mesmo tubo Falcon. O material foi mantido em gelo durante todo o procedimento. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm sendo os precipitados incubados com 1 ml de tampão hemolítico (GIBCO®) em microtubos por 2 minutos, à temperatura ambiente. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 2000 rpm, as células foram ressuspensas em 5 ml de PBS, para contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, utilizando-se o método de exclusão por azul de tripam a 0,1%. Em seguida, foram incubadas com anticorpo anti-mouse CD16/CD32 (1:100) diluído em PBS-BSA 1%, para bloqueio de Fc gamma II e III, por 30 minutos, a 4 °C. Após nova lavagem em PBS e centrifugação, as alíquotas foram distribuídas em três tubos, sendo um incubado com PBS-BSA 1% (controle de células negativas, sem marcação), um tubo contendo solução a 1% de anticorpos anti-CD23 FITC, anti-CD5 PerCP, anti-CD19 APC e anti-CD11b PE (combo 1) e outro contendo anticorpos anti-CD4 PE, anti-CD8 AF 405, anti-CD19 PE Cy5.5 e anti-CD25 AF488 (combo 2). Todos os anticorpos foram fornecidos por INVITROGEN®. Os anticorpos

foram incubados por 30 minutos, a 4 °C. Após nova lavagem em PBS, as células foram ressuspensas em paraformaldeído 1%, para fixação e mantidas a 4 °C até a leitura em ATTUNE Acoustic Focusing Cytometer® (APPLIED BIOSYSTEM). O software Flow Jo 8.7 foi utilizado para a análise dos dados. Dez mil eventos foram adquiridos pelo sistema para cada amostra. A compensação do citômetro foi feita a partir de alíquotas marcadas com cada um dos anticorpos, individualmente.

A definição dos “*gates*” para quantificação das células foi feita com base no tamanho e granulidade das mesmas. Dois “*gates*” foram definidos em cada amostra: o das populações de linfócitos e de fagócitos. Com a fluorescência obtida com marcadores específicos, foi possível diferenciar as seguintes subpopulações de linfócitos: linfócitos B2, pela expressão de CD19 e CD23; linfócitos B1, pela expressão de CD19 associada à baixa expressão de CD23; linfócitos B-1a pela expressão de CD19+ e CD5+; linfócitos B-1b pela expressão de CD19+ e CD5-. No *gate* de macrófagos, foram identificadas as subpopulações de fagócitos derivados de B-1, pela expressão de CD19+ e CD11b+ e, também, de fagócitos maduros, pela expressão de CD19- e CD11b+. A porcentagem de cada subtipo celular, em cada amostra, foi calculada pelo programa Flow Jo 8.7 e a transposição de dados foi feita manualmente para o programa Excel. As análises estatísticas foram feitas em cego utilizando o teste *qui* quadrado.

4.5. METODOLOGIAS UTILIZADAS NO ESTUDO CLÍNICO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número 194/08 e o relatório final teve sua aprovação em junho de 2010 (ANEXO 3). Este ensaio consistiu em um estudo randomizado, triplo cego e placebo controlado. Foi conduzido na cidade de Petrópolis (Rio de Janeiro), no período de abril de 2009 a março de 2010 com o apoio do Instituto Roberto Costa e a parceria da

Secretaria de Saúde de Petrópolis. O objetivo deste ensaio clínico foi avaliar, de forma quantitativa, a eficácia de dois bioterápicos (InfluBio e IRA) em comparação ao placebo, para a prevenção dos sintomas da gripe. Para tanto, 600 crianças de 1 a 5 anos de idade foram randomicamente selecionadas pelo Programa de Saúde da Família da referida cidade. Antes do início desta pesquisa, os responsáveis pelas crianças assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO 4) autorizando a participação das mesmas.

4.5.1. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão criados para a seleção das crianças foram: crianças do sexo feminino ou masculino sem doença aparente, com idade compreendida entre 1 e 5 anos. Foram excluídas deste ensaio clínico: crianças que moravam em áreas geográficas de difícil monitoramento; crianças com histórico de asma, infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV); imunodeficientes; com diabetes tipo I; em tratamentos com corticoides; com anomalias congênitas, doenças hepáticas e histórico de pelo menos um episódio de infecção respiratória nos primeiros 3 dias do início da pesquisa.

4.5.2. Área de estudo

Os núcleos participantes da pesquisa foram: Equipe 1 - Menino Jesus de Praga; Equipe 2 - Lajinha; Equipe 3 - Vila Rica; Equipe 4 - Equipe 24 de maio; Equipe 5 - Equipe Bonfim; Equipe 6 - Equipe São João Batista; Equipe 7 - Equipe Meio da Serra; Equipe 8 - Equipe Bataillard; Equipe 9 – Equipe Primeiro de Maio; Equipe 10 - Equipe Carongola; Equipe 11. Equipe Estrada 1; Equipe 12 - Equipe Caxambu; Equipe 13 - Equipe São Sebastião II; Equipe 14 - Equipe São Sebastião I; Equipe 15 - Equipe Machado; Equipe 16 - Equipe Nova

Cascatinha; Equipe 17 - Equipe Moinho Preto; Equipe 18 - Equipe Boa Vista; Equipe 19 - Equipe Vila Saúde; Equipe 20 - Equipe Boa Esperança; Equipe 21 - Equipe Carangola 1. As soluções teste foram separadas por equipe, sendo que cada equipe recebeu 21 amostras, sendo 7 de cada grupo.

4.5.3. Delineamento da pesquisa

Os participantes foram randomizados através de uma lista gerada por um software Epi Info ver. 6.04d sendo essas 600 crianças divididas em 3 grupos, contendo 200 crianças cada: grupo de crianças que recebeu bioterápico íntegro 30DH (InfluBio), grupo de crianças que recebeu o medicamento IRA e grupo de crianças que recebeu solução placebo. A escolha pelo medicamento IRA se baseou em dados qualitativos obtidos na cidade de Petrópolis acerca do uso deste medicamento desde o ano de 2005 para o tratamento de infecções respiratórias agudas. O medicamento IRA é um bioterápico, do tipo complexo, obtido a partir da mistura dos microorganismos *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Influenzium*, todos na potência 30DH e foi preparado e fornecido pela farmácia do Instituto Roberto Costa. O bioterápico de influenza íntegro utilizado neste estudo foi preparado da mesma forma que o bioterápico utilizado nos estudos *in vitro* e pré-clínico, porém a cepa de influenza A H3N2 utilizada para este estudo clínico foi A/Victoria/3/75. Para diferenciar o bioterápico utilizado nos outros estudos, o utilizado para o presente ensaio clínico foi denominado de InfluBio. Para garantir a homogeneidade dos grupos de crianças, as três farmacêuticas homeopatas envolvidas na pesquisa separavam os medicamentos para cada criança de acordo com a lista randomizada. Durante o estudo, nem as famílias, nem os agentes de saúde e nem os médicos sabiam qual amostra estava sendo administrada para cada criança. Para isto, foram criados códigos (A, B e C) para identificar as soluções (Figura 5) e os mesmos foram mantidos com o coordenador da

pesquisa até a análise estatística final dos dados. Após a fase de randomização, a equipe do Programa de Saúde da Família, composta por 300 médicos e 400 agentes de saúde, recebeu o treinamento dado pelo coordenador desta pesquisa, Dr Carlos Lyrio. O contato inicial com as crianças selecionadas foi para obtenção dos dados antropométricos antes mesmo de receberem as respectivas soluções teste. Cada solução teste foi administrada duas vezes ao dia, por 30 dias, no mês de abril de 2009, por ser outono, estação que antecede o inverno, onde é grande a incidência de gripe em Petrópolis. A dosagem foi de 1 gota/ ano de idade e a amostra era previamente diluída em uma colher de sopa de água filtrada. O protocolo de administração foi o mesmo para cada criança e foi previamente estabelecido pelo coordenador do ensaio clínico.



Figura 5: Imagem das amostras rotuladas.

As crianças foram monitoradas pelos agentes de saúde utilizando-se de um questionário padronizado e os agentes avaliavam a necessidade ou não de haver um atendimento médico. As crianças foram avaliadas quanto aos sintomas desenvolvidos de acordo com classificação ICPC, que considera febre, coriza, tosse, dor de cabeça, mialgia e prostração como sintomas de gripe e infecções agudas do trato respiratório. Neste estudo não houve monitoramento com exames de laboratório.

Como relatado anteriormente, as soluções utilizadas foram bioterápico íntegro 30DH, IRA e placebo. Todas as amostras foram preparadas na farmácia do Instituto Roberto Costa, em Petrópolis, e o veículo de todas as soluções, inclusive o placebo, foi a solução

hidroalcoólica 30% (v/v), veículo este usado para a dispensação da maioria dos medicamentos homeopáticos.

4.5.4. Parâmetros avaliados

Desfecho primário: Foram comparados os números de episódios de gripe em um ano (2009 – 2010) e a duração destes episódios em dias entre o grupo de intervenção (bioterápico) e o controle (IRA). De acordo com os critérios de vigilância sindrômica, para caracterizar um episódio de gripe ou parecido com gripe, pelo menos dois de seis sintomas característicos devem estar presentes. Os seis sintomas são: febre (temperatura superior a 37,8 °C), coriza, prostração, mialgia, dor de cabeça e tosse. Foi verificada a severidade em três níveis, a saber: uso de medicamentos para alívio dos sintomas, necessidade de hospitalização e ausência nas atividades escolares.

Desfecho intermediário: Foram verificados os sintomas de gripe: febre (temperatura superior a 37,8 °C), coriza, prostração, mialgia, dor de cabeça e tosse.

Desfecho secundário: Efeitos adversos foram reportados aos agentes de saúde pelos pais através de questionários sem *checklist*.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata com exceção dos experimentos conduzidos com os animais, onde foi necessário fazer um *pool* das amostras para as análises. Os resultados foram analisados pelo método ANOVA (análise de variância), seguidos por testes estatísticos como Tukey e Dunnet. Para o Experimento II do estudo pré-

clínico, foi utilizado o teste *qui* quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Preparação e titulação da amostra viral

O título viral de ambas as cepas, após purificação, obtido por técnica de hemaglutinação foi de 10.240 UHA/ 25 µl. A produção dos bioterápicos, tanto íntegro quanto inativado, assim como a execução de todos os experimentos, partiram destas amostras virais.

6.2. Avaliação da integridade da partícula viral por microscopia eletrônica de transmissão

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicaram que, após a primeira diluição em água destilada estéril, seguida por 100 sucussões mecânicas (1DH), as partículas de vírus influenza se mantiveram íntegras (Figura 6A). Resultado diferente foi obtido após a primeira dinamização feita em solução hidroalcoólica 70%, a qual induziu lise completa das partículas virais, situação que garantiu a preparação do medicamento inativado (Figura 6B). As imagens obtidas por MET indicaram que nenhuma partícula se manteve íntegra quando a solução hidroalcoólica 70% foi utilizada como veículo (dados não mostrados).

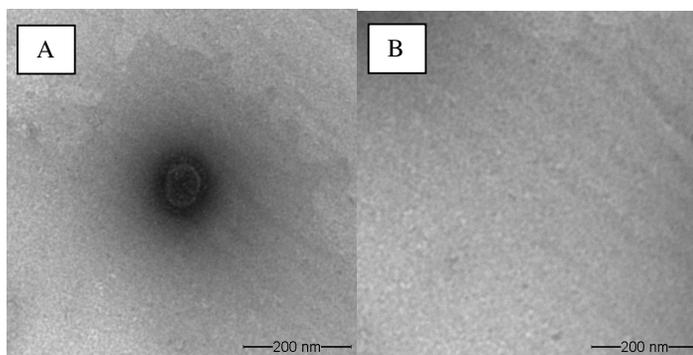


Figura 6A-B: Microfotografia eletrônica da solução de Bioterápico íntegro na potência de 1DH (A) e da solução de Bioterápico inativado na potência de 1DH (B). Aspecto ultraestrutural de uma partícula viral dinamizada em água (A) e ausência de partícula íntegra (B). Barra de escala: 200 nm.

6.3. RESULTADOS DOS ESTUDOS *IN VITRO*

6.3.1. Avaliação da atividade mitocondrial das células MDCK por MTT

Pelo ensaio de MTT foi verificada a atividade mitocondrial das células MDCK que receberam 6 (Figura 7) e 18 tratamentos (Figura 8), nas diferentes situações experimentais. Esta análise evidenciou que as células MDCK que receberam 6 tratamentos não tiveram suas taxas de respiração celular alteradas enquanto que as que receberam 18 tratamentos diferenciaram entre si, com diferença estatística ($p < 0,05$), entre as células que receberam o bioterápico íntegro na 30DH e as que receberam bioterápico inativado na mesma potência.

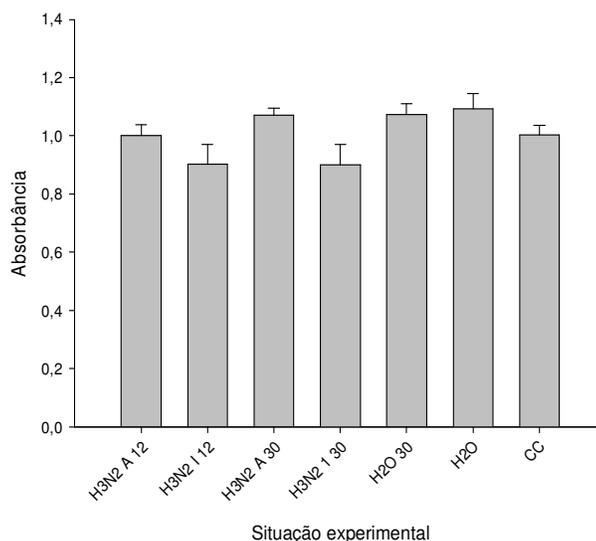


Figura 7: Avaliação da atividade mitocondrial de células MDCK por MTT. As células receberam 6 tratamentos com medicamentos na potência 30DH e 12DH e tiveram suas absorbâncias ($\lambda = 490$ nm) comparadas com os grupos controles. H3N2 A 12: células MDCK tratadas com o bioterápico íntegro na potência 12DH; H3N2 I 12: células MDCK tratadas com o bioterápico inativado na potência 12DH; H3N2 A 30: células MDCK tratadas com o bioterápico íntegro na potência 30DH; H3N2 I 30: células MDCK tratadas com o bioterápico inativado na potência 30DH; H2O 30: Células MDCK tratadas com água dinamizada 30 DH; H2O: células MDCK tratadas com água destilada estéril; CC: Controle de células. Foram feitos 3 experimentos independentes em quintuplicata. Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade mitocondrial quando as várias situações experimentais foram comparadas entre si ($p > 0,05$).

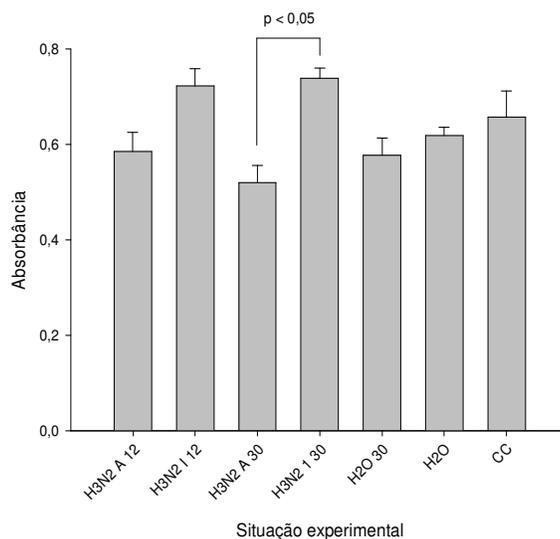


Figura 8: Avaliação da atividade mitocondrial de células MDCK por MTT. As células receberam 18 tratamentos com medicamentos na potência 30DH e 12DH e tiveram suas absorbâncias ($\lambda = 490$ nm) comparadas com os grupos controles. H3N2 A 12: células MDCK tratadas com o bioterápico íntegro na potência 12DH; H3N2 I 12: células MDCK tratadas com o bioterápico inativado na potência 12DH; H3N2 A 30: células MDCK tratadas com o bioterápico íntegro na potência 30DH; H3N2 I 30: células MDCK tratadas com o bioterápico inativado na potência 30DH; H2O 30: Células MDCK tratadas com água dinamizada 30 DH; H2O: células MDCK tratadas com água destilada estéril; CC: Controle de células. Foram feitos 3 experimentos independentes em

quintuplicata. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na atividade mitocondrial entre as células que receberam o bioterápico íntegro na potência 30DH quando comparadas às que receberam o bioterápico inativado na mesma potência.

6.3.2. Avaliação da atividade da enzima Fosfofrutocinase-1 (PFK-1) nas células MDCK

Pela Figura 9, pode-se observar a média da atividade da enzima PFK-1 nas diferentes situações experimentais e nos diferentes tratamentos. Como pode ser observado, nenhuma diferença estatística foi verificada na atividade enzimática após 6 tratamentos. Porém, houve um aumento na atividade da PFK nas células que receberam 18 tratamentos com as soluções ultradiluídas quando comparadas às células controle ($p < 0,05$). Vale ressaltar que não houve diferença estatística entre as células que receberam bioterápico inativado 12DH (I 12 18t) quando comparado ao controle de células (CC 18t). Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicata.

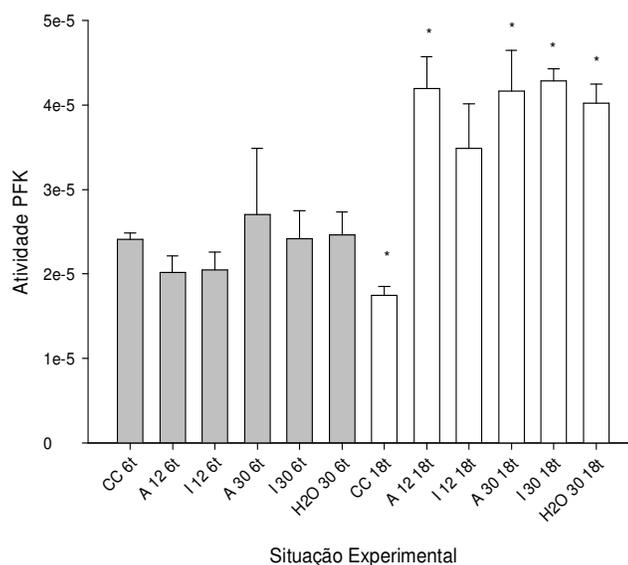


Figura 9: Atividade da enzima PFK-1 das células MDCK submetidas a 6 tratamentos (barras cinzas) e 18 tratamentos (barras brancas) nas diferentes situações experimentais. CC 6t: Células MDCK mantidas em meio de cultura durante os 6 tratamentos. A 12 6t: células MDCK que receberam 6 tratamentos com bioterápico íntegro 12 DH; I 12 6t: células MDCK que receberam 6 tratamentos com bioterápico inativado 12 DH; A 30 6t: células MDCK que receberam 6 tratamentos com bioterápico íntegro 30 DH; I 30 6t: células MDCK que receberam 6 tratamentos com bioterápico inativado 30 DH; H2O 30 6t: células MDCK que receberam 6 tratamentos com água 30 DH; CC 18t: Células MDCK mantidas em meio de cultura durante os 18 tratamentos. A 12 18t: células

MDCK que receberam 18 tratamentos com bioterápico íntegro 12 DH; I 12 18t: células MDCK que receberam 18 tratamentos com bioterápico inativado 12 DH; A 30 18t: células MDCK que receberam 18 tratamentos com bioterápico íntegro 30 DH; I 30 18t: células MDCK que receberam 18 tratamentos com bioterápico inativado 30 DH; H2O 30 18t: células MDCK que receberam 18 tratamentos com água 30 DH. Houve diferença estatística entre os grupos que receberam 18 tratamentos quando comparados ao controle de células (*p < 0,05)

6.3.3. Estudo da Função Respiratória: Oxigrafia de Alta Resolução

O efeito do tratamento das células MDCK com bioterápico íntegro 12 DH e 30 DH, água 30 DH e água destilada estéril no consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado através de oxigrafia de alta resolução (Figuras 10 e 11 / Tabelas 1 e 2). A princípio, foi avaliada a respiração de rotina (R_{R0}), em seguida foi adicionado oligomicina 2 $\mu\text{g/ml}$, um inibidor da ATP sintase, para avaliar a respiração dependente da síntese de ATP (R_{ATP}) e a permeabilidade da membrana interna mitocondrial à passagem de prótons (*Proton leak*/ R_L). A respiração acoplada à síntese de ATP foi calculada pela diferença entre a respiração basal e aquela dependente de oligomicina, enquanto que a respiração residual foi considerada como o *Proton leak*. A capacidade respiratória máxima (*Electron Transporter System*/ ETS) foi determinada pela titulação com concentrações do ionóforo FCCP que variaram de 0,2 - 1 μM o qual é capaz de tornar a membrana interna mitocondrial permeável a passagem de prótons, agindo como um desacoplador da fosforilação oxidativa. Nas Figuras 10 e 11 verificamos que a capacidade respiratória máxima foi alcançada com um consumo de oxigênio em cerca de 104 $\text{pmol O}_2 \cdot \text{milhão de células}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ e 120 $\text{pmol O}_2 \cdot \text{milhão de células}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ para as células que receberam 6 e 18 tratamentos, respectivamente. Por fim, a respiração mitocondrial foi totalmente inibida pela adição de KCN 1 mM, um inibidor da citocromo C oxidase (COX) e consequentemente do Complexo IV mitocondrial. O consumo residual de oxigênio resultante representa o consumo não mitocondrial de oxigênio (ROX).

Nas condições de 6 (Tabela 1) e 18 (Tabela 2) tratamentos não foram observadas alterações na respiração de rotina (R_{R0}) nem tampouco no *proton leak* (R_L), nas diferentes situações experimentais. No entanto, nos dois tempos de tratamento foi observado um

aumento da capacidade respiratória máxima (ETS), de até 40% aproximadamente, nas células tratadas com os bioterápicos e este aumento foi proporcional à potência e ao número de tratamentos nos quais as células foram submetidas. Não foram verificadas diferenças no consumo de oxigênio não mitocondrial (ROX) (Tabelas 1 e 2).

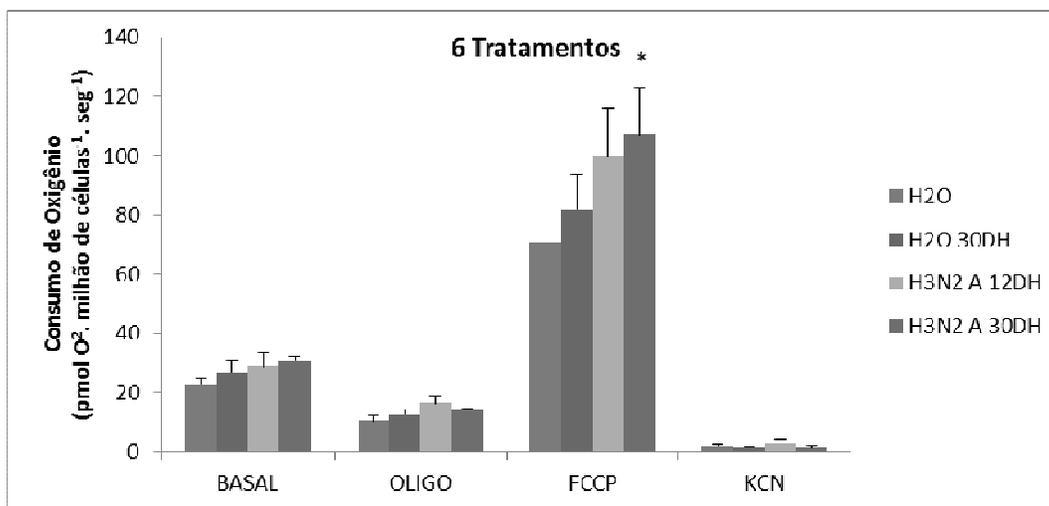


Figura 10: Avaliação do consumo de oxigênio em células MDCK submetidas a seis tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH, 30DH, água 30DH e água destilada estéril. Foram utilizados aproximadamente 4×10^5 células/ml, oligomicina $2 \mu\text{g/ml}$, FCCP $0,2 \mu\text{M}$ e KCN 1 mM . Foram realizados seis experimentos independentes em duplicada e consideradas significativamente diferentes as amostras com $*p < 0,05$.

Tabela 1: Efeito dos seis tratamentos nos parâmetros respiratórios das células MDCK. H₂O: células MDCK que receberam 6 tratamentos com água; H₂O 30DH: células MDCK que receberam 6 tratamentos com água 30DH; H₃N₂ A 12DH: células MDCK que receberam 6 tratamentos com o bioterápico íntegro 12DH; H₃N₂ A 30DH: células MDCK que receberam 6 tratamentos com bioterápico íntegro 30DH.

PARÂMETROS	Consumo de O ₂ pmol O ₂ · milhão de células ⁻¹ · seg ⁻¹			
	H ₂ O	H ₂ O 30DH	H ₃ N ₂ A 12DH	H ₃ N ₂ A 30DH
R _{RO}	22,79 ± 1,84	26,98 ± 3,84	28,78 ± 4,65	30,82 ± 1,22
R _L	10,24 ± 2,25	12,65 ± 1,69	16,48 ± 2,59	14,33 ± 0,48
ETS	70,88 ± 6,12	81,98 ± 11,67	99,58 ± 16,42	107,04 ± 15,87
ROX	1,88 ± 0,41	1,51 ± 0,08	2,83 ± 1,28	1,21 ± 0,72
R _{ATP}	12,57 ± 3,47	14,32 ± 1,23	12,29 ± 2,55	16,49 ± 1,46

Parâmetros: Respiração Basal (R_{RO}), *Proton-leak* (R_L), Sistema Transportador de elétrons (ETS), Consumo Residual de Oxigênio (ROX) e Respiração acoplada à síntese de ATP (R_{ATP}). Os valores representam a média ± erro padrão de seis experimentos independentes.

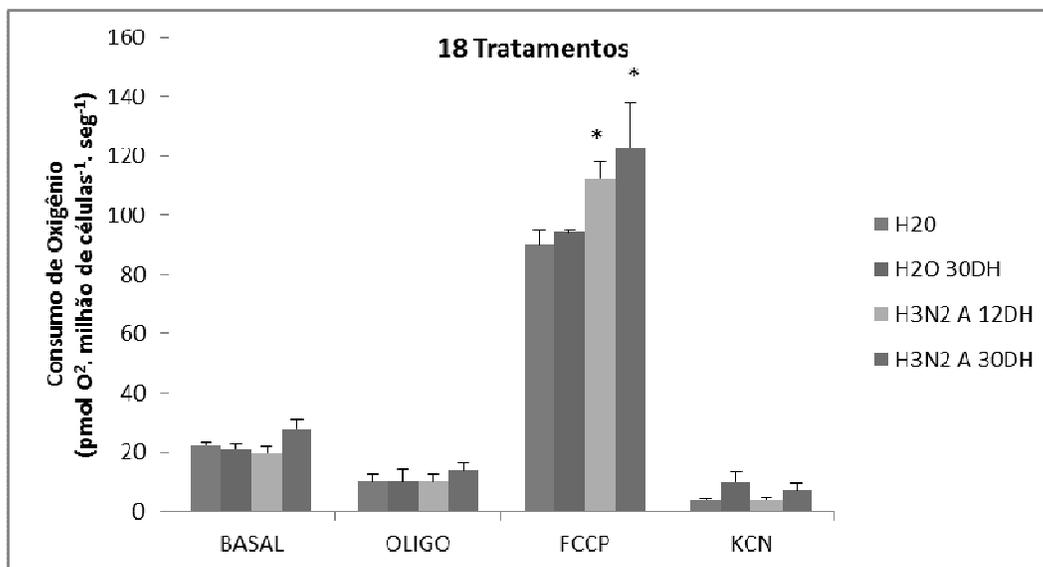


Figura 11: Avaliação do consumo de oxigênio em células MDCK submetidas a dezoito tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH, 30DH, água 30DH e água destilada estéril. Foram utilizados aproximadamente 4×10^5 células/ml, oligomicina $2 \mu\text{g/ml}$, FCCP $0,2 \mu\text{M}$ e KCN 1 mM . Foram realizados seis experimentos independentes em duplicada e consideradas significativamente diferentes as amostras com $*p < 0,05$.

Tabela 2: Efeito dos 18 tratamentos nos parâmetros respiratórios das células MDCK. H₂O: células MDCK que receberam 18 tratamentos com água; H₂O 30DH: células MDCK que receberam 18 tratamentos com água 30DH; H₃N₂ A 12DH: células MDCK que receberam 18 tratamentos com o bioterápico íntegro 12DH; H₃N₂ A 30DH: células MDCK que receberam 18 tratamentos com bioterápico íntegro 30DH.

PARÂMETROS	Consumo de O ₂ pmol O ₂ · milhão de células ⁻¹ · seg ⁻¹			
	H ₂ O	H ₂ O 30DH	H ₃ N ₂ A 12DH	H ₃ N ₂ A 30DH
R _{RO}	22,11 ± 1,13	20,85 ± 1,95	19,82 ± 2,14	27,81 ± 3,22
R _L	9,93 ± 2,77	9,95 ± 4,15	9,89 ± 2,63	13,82 ± 2,55
ETS	90,12 ± 4,64	94,28 ± 0,72	112,57 ± 5,56	122,62 ± 15,40
ROX	4,02 ± 0,57	9,75 ± 3,56	3,74 ± 1,14	7,05 ± 2,37
R _{ATP}	9,56 ± 3,73	7,29 ± 2,88	9,92 ± 1,74	13,99 ± 3,13

Parâmetros: Respiração Basal (R_{RO}), *Proton-leak* (R_L), Sistema Transportador de elétrons (ETS), Consumo Residual de Oxigênio (ROX) e Respiração acoplada à síntese de ATP (R_{ATP}). Os valores representam a média ± erro padrão de seis experimentos independentes

6.3.4. Avaliação da atividade de Citrato Sintase e Hidrólise de ATP

A enzima citrato sintase se localiza na matriz mitocondrial e catalisa a condensação do oxaloacetato e do grupo acetil da acetil coenzima-A (acetil CoA), na primeira fase do ciclo de Krebs. Nesta fase, o oxaloacetato reage com acetil CoA e água, produzindo uma molécula de

citrato e duas de CoA. Esta enzima é inibida por quantidades elevadas de ATP, acetil CoA e NADH quando o suprimento de energia celular é alto. Além disto, a citrato sintase é utilizada como marcador enzimático quantitativo da presença de mitocôndrias intactas (KUZNETSOV, 2010). Sendo assim, para verificar se o efeito do tratamento com bioterápicos no consumo de oxigênio se dá por um aumento da biogênese mitocondrial, foi avaliada a atividade desta enzima. O efeito do tratamento com os bioterápicos no metabolismo mitocondrial em células MDCK foi determinado através da hidrólise de ATP pela ATP sintase (Figura 12) e da atividade de citrato sintase (Figura 13). Na condição de 18 tratamentos com os bioterápicos íntegros nas potências 12 DH e 30 DH, foi verificado um aumento da atividade de citrato sintase, comparado aos grupos controle ($p < 0,05$, ANOVA/ Dunnet). A atividade da citrato sintase é classicamente correlacionada ao número de mitocôndrias e, desta forma, o aumento na atividade de citrato sintase nas células que receberam 18 tratamentos pode indicar um aumento na biossíntese mitocondrial. Para corroborar com este resultado foi avaliado também a atividade de hidrólise de ATP pela ATP sintase. Em ambas as condições experimentais (6 e 18 tratamentos) foi verificado um aumento na atividade de hidrólise de ATP (Figuras 12 e 13) nas células tratadas com bioterápico 30DH em comparação ao grupo controle (H₂O) ($p < 0,05$ ANOVA/ Dunnet).

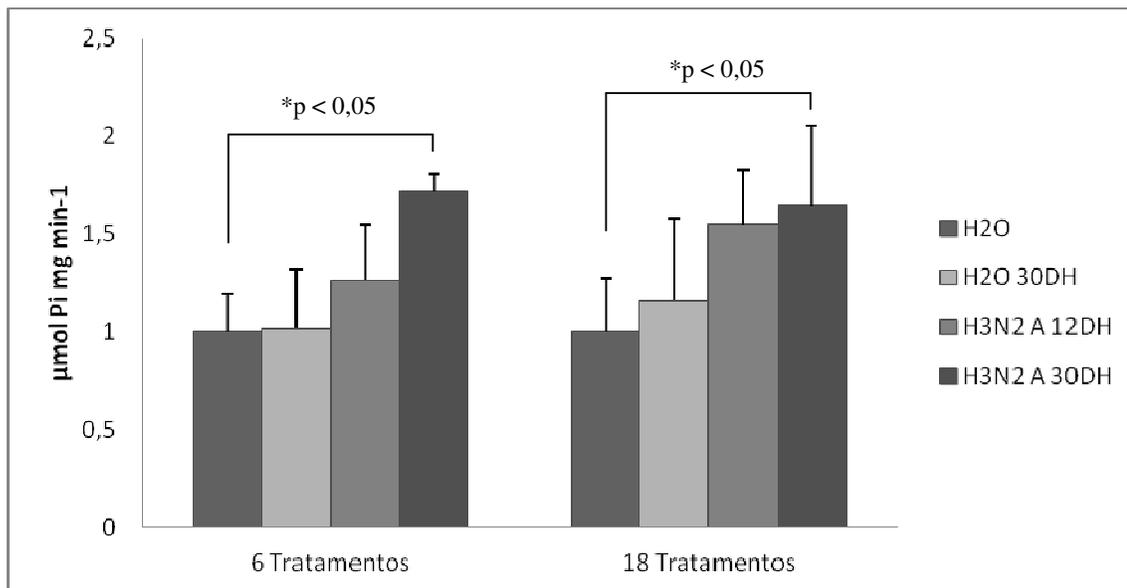


Figura 12: Avaliação da hidrólise de ATP em células MDCK submetidas a seis e dezoito tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH (H3N2 A 12DH), 30DH (h3N2 A 30DH), água 30DH e água destilada estéril (H2O). Foram realizados três experimentos independentes em duplicada e consideradas significativamente diferentes as amostras tratadas com bioterápico íntegro 30DH quando comparadas ao controle de células (H2O) (* $p < 0,05$).

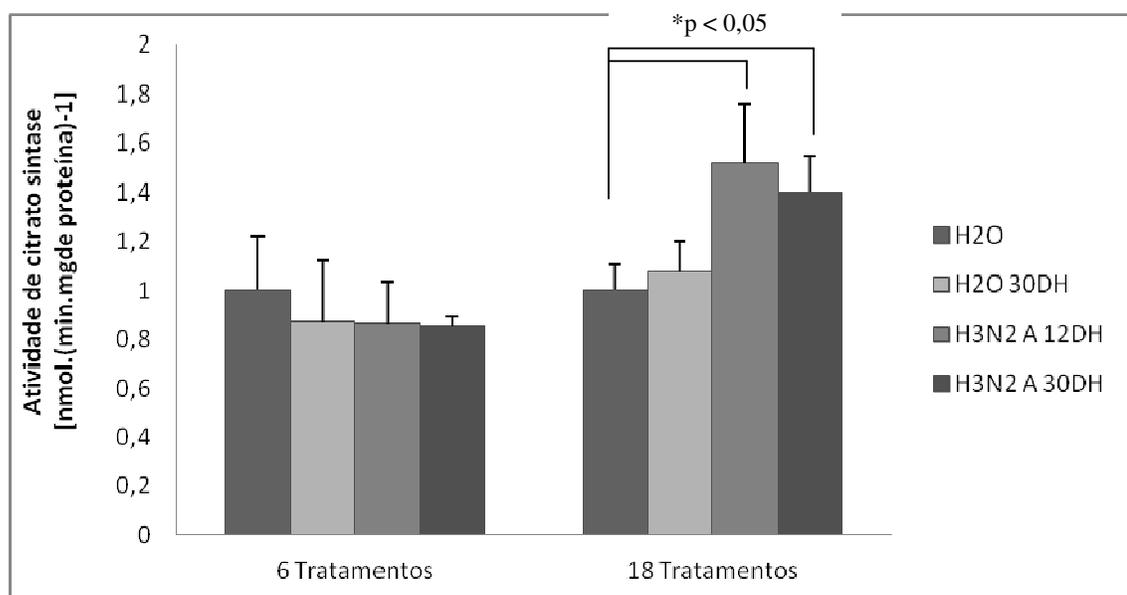


Figura 13: Avaliação da atividade da enzima citrato sintase em células MDCK submetidas a seis e dezoito tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH (H3N2 A 12DH), 30DH (H3N2 A 30DH), água 30DH e água destilada estéril (H2O). Foram realizados três experimentos independentes em duplicada e consideradas significativamente diferentes as amostras que receberam 18 tratamentos com os bioterápicos íntegro 12DH e 30DH, quando comparadas ao controle de células (H2O) (* $p < 0,05$).

6.3.5. Quantificação da atividade de lactato desidrogenase

Para avaliar o efeito do tratamento com bioterápicos íntegros na produção de lactato, as células MDCK foram incubadas com o medicamento por até 72 horas. Na condição de seis tratamentos não foi verificada diferença no fluxo de liberação de lactato; no entanto, na condição de 18 tratamentos, houve uma tendência a aumentar a liberação de lactato nas células tratadas com o bioterápico íntegro 30DH em comparação às células controle, enquanto que as células tratadas com o mesmo bioterápico na potência 12DH apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$ ANOVA/ Tukey) quando comparado ao mesmo controle de células (Figuras 14 e 15).

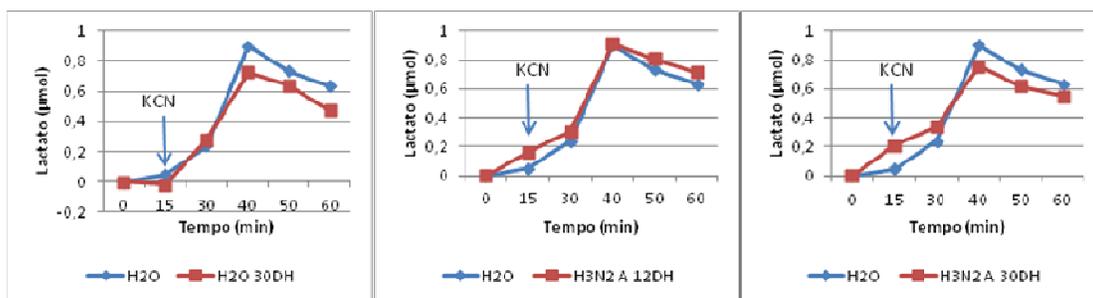


Figura 14: Avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase em células MDCK submetidas a seis tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH (H3N2 A 12DH), 30DH (H3N2 A 30DH) e água 30DH comparados ao controle de células que recebeu água destilada estéril (H2O). Foram realizados três experimentos independentes em duplicada.

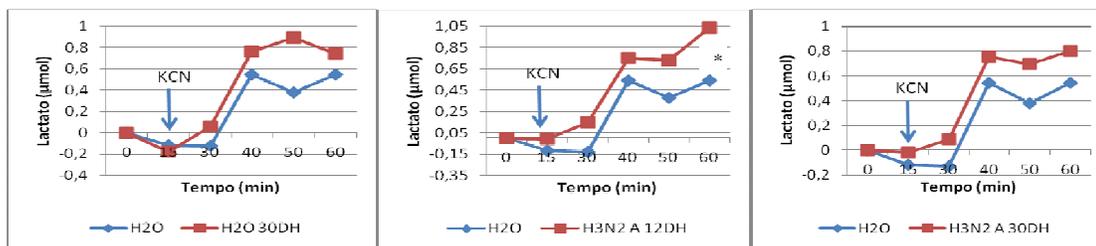


Figura 15: Avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase em células MDCK submetidas a dezoito tratamentos com bioterápicos íntegros 12DH (H3N2 A 12DH), 30DH (H3N2 A 30DH) e água 30DH comparados ao controle de células que recebeu água destilada estéril (H2O). Foram realizados três experimentos independentes em duplicada. Houve diferença estatística entre as células ($p < 0,05$ ANOVA/ Tukey), que receberam bioterápico íntegro 12DH em comparação ao controle de células e as células que receberam bioterápico íntegro 30DH mostraram uma tendência a aumentar a atividade da referida enzima.

6.3.6 Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos J774.G8

Para os experimentos de quantificação de citocinas, os macrófagos foram tratados a 10% v/v em relação ao meio com os bioterápicos íntegro, inativado e respectivos controles por 6 vezes, durante 48 horas. Vale lembrar que foi avaliada apenas a potência 30DH, ou seja, diluição que ultrapassa o número de Avogadro, cuja constante equivale a $6,02 \times 10^{23}$ /mol, uma vez que a diluição 12DH está significativamente abaixo desta constante, a mesma poderia permitir a existência de material viral o qual pode ser um contaminante a induzir resultados falso-positivos em relação à liberação de citocinas. Os sobrenadantes da cultura de células de macrófagos foram avaliados antes (pré) e após (pós) 24 horas da inoculação de 25 μ l do vírus influenza. Nas Figuras de 16 a 18, pode-se observar a produção das citocinas avaliadas. Dentre as citocinas pesquisadas, IFN, IL-10 e IL-6 não foram detectadas em nenhum dos sobrenadantes. Na Figura 16 podemos observar que antes da inoculação do vírus influenza, há pequena liberação de TNF- α e, após a infecção, esta liberação é aumentada de forma significativa ($p < 0,05$) nos macrófagos tratados pelo bioterápico manipulado com vírus influenza íntegro na potência 30DH (H3N2 A 30DH). As demais preparações, com exceção da água 30DH apresentaram uma tendência a aumentar após a infecção; portanto, este aumento não apresentou diferença estatística significativa quando avaliada a produção antes e após infecção em cada situação experimental.

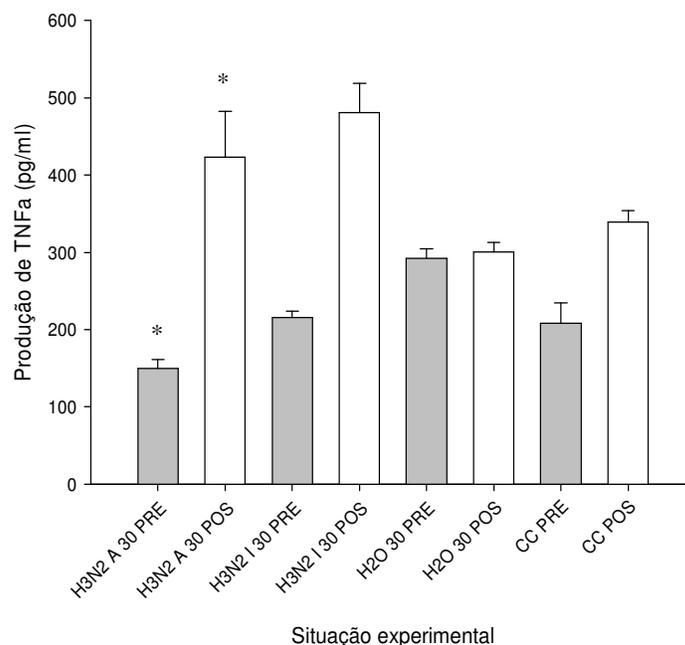


Figura 16: Produção de TNF- α pelos macrófagos J774G8 nas diferentes situações experimentais antes (barras cinzas) e após (barras brancas) infecção pelo vírus influenza. H3N2 A 30 PRE: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H3N2 A 30 POS: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH após a infecção pelo vírus influenza; H3N2 I 30 PRE: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H3N2 I 30 POS: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH após a infecção pelo vírus influenza; H2O 30 PRE: sobrenadante das células tratadas por água 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H2O 30 POS: sobrenadante das células tratadas por água 30DH após a infecção pelo vírus influenza; CC pre: sobrenadante das células sem tratamento antes da infecção pelo vírus influenza; CC pos: sobrenadante das células sem tratamento após a infecção pelo vírus influenza. Houve diferença estatística (* $p < 0,05$) entre a quantidade de TNF- α produzida pelas células tratadas pelo bioterápico íntegro quando comparados antes e após a infecção pelo vírus influenza.

Como pode ser observado nas Figuras 17 e 18, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na produção da citocina IL 12 e da quimiocina MCP-1. Segundo Sareneva (1998), os macrófagos não produzem IL-12 em resposta a infecção pelo vírus influenza A o que corrobora com nossos resultados (Figura 17) onde não houve diferença estatística entre a produção de IL-12 antes e após infecção pelo vírus influenza A (Figura 17).

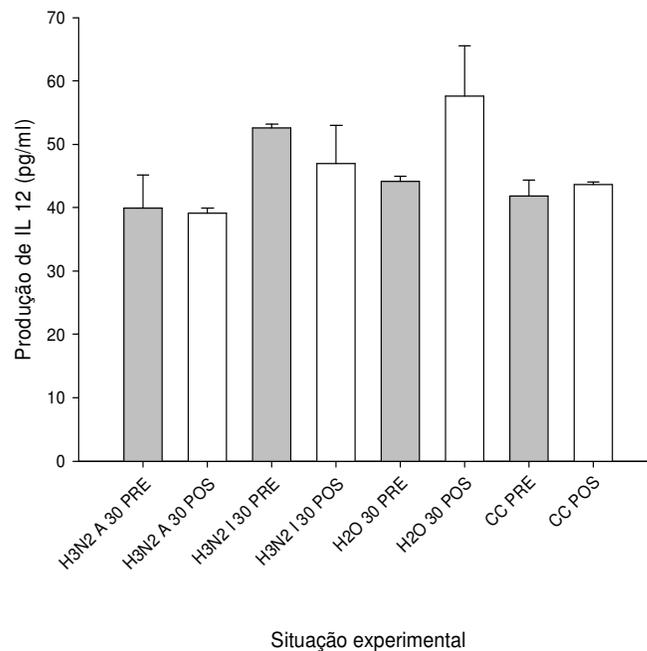


Figura 17: Produção de IL-12 pelos macrófagos J774G8 nas diferentes situações experimentais antes (barras cinzas) e após (barras brancas) infecção pelo vírus influenza. H3N2 A 30 PRE: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H3N2 A 30 POS: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH após a infecção pelo vírus influenza; H3N2 I 30 PRE: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H3N2 I 30 POS: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH após a infecção pelo vírus influenza; H2O 30 PRE: sobrenadante das células tratadas por água 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H2O 30 POS: sobrenadante das células tratadas por água 30DH após a infecção pelo vírus influenza; CC pre: sobrenadante das células sem tratamento antes da infecção pelo vírus influenza; CC pos: sobrenadante das células sem tratamento após a infecção pelo vírus influenza. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre a quantidade de IL-12 antes e após a infecção por influenza em todas as situações experimentais.

Na Figura 18, pode-se verificar a produção de MCP-1 que, após a infecção viral tem uma tendência a diminuir em todas as situações experimentais onde houve tratamento com as soluções ultradiluídas, diferente da situação observada no controle de células, que não recebeu qualquer tratamento, onde se observa uma tendência a aumentar a liberação desta quimiocina. Esta substância é secretada por macrófagos infectados por vírus influenza e tem a função de recrutar as células mononucleares do sangue para o local da infecção (JULKUNEN, 2001; SPRENGER, 1996).

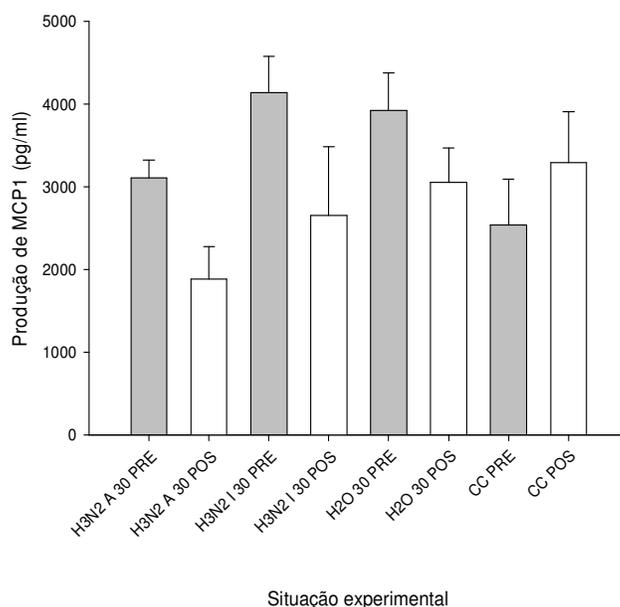


Figura 18: Produção de MCP-1 pelos macrófagos J774G8 nas diferentes situações experimentais antes (barras cinzas) e após (barras brancas) infecção pelo vírus influenza. H3N2 A 30 PRE: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H3N2 A 30 POS: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH após a infecção pelo vírus influenza; H3N2 I 30 PRE: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H3N2 I 30 POS: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH após a infecção pelo vírus influenza; H2O 30 PRE: sobrenadante das células tratadas por água 30DH antes da infecção pelo vírus influenza; H2O 30 POS: sobrenadante das células tratadas por água 30DH após a infecção pelo vírus influenza; CC pre: sobrenadante das células sem tratamento antes da infecção pelo vírus influenza; CC pos: sobrenadante das células sem tratamento após a infecção pelo vírus influenza. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre a quantidade de MCP-1 antes e após a infecção por influenza em todas as situações experimentais, porém, diferente do ocorrido no controle de células, o sobrenadante de todas as situações experimentais teve uma diminuição na produção da substância após a infecção por influenza.

6.3.7 Dosagem de óxido nítrico produzido pelos macrófagos RAW 264-7

O óxido nítrico (NO) é produzido por diversos tipos celulares do sistema imunológico. Nos macrófagos ativados é produzido pela isoforma da enzima óxido nítrico sintase que pode ser ativada por alguns fatores como LPS, TNF- α e IFN- α . Este experimento foi realizado com a utilização do LPS como ativador dos macrófagos RAW264-7 após 4 tratamentos com os diferentes bioterápicos e controles. A avaliação da concentração de nitrito no sobrenadante dos macrófagos foi processada após 24h da

inoculação do LPS e a leitura foi feita após reação com o Reagente de Griess. Como pode ser observado na Figura 19, os sobrenadantes dos macrófagos tratados pelos bioterápicos não apresentaram diferença na liberação de óxido nítrico quando comparados ao controle (CC). De maneira interessante, podemos observar que o tratamento com a água dinamizada (H2O 30DH) levou a uma diminuição, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), na produção de óxido nítrico quando comparado aos sobrenadantes das células controle (CC) e daquelas estimuladas com água não dinamizada (H2O).

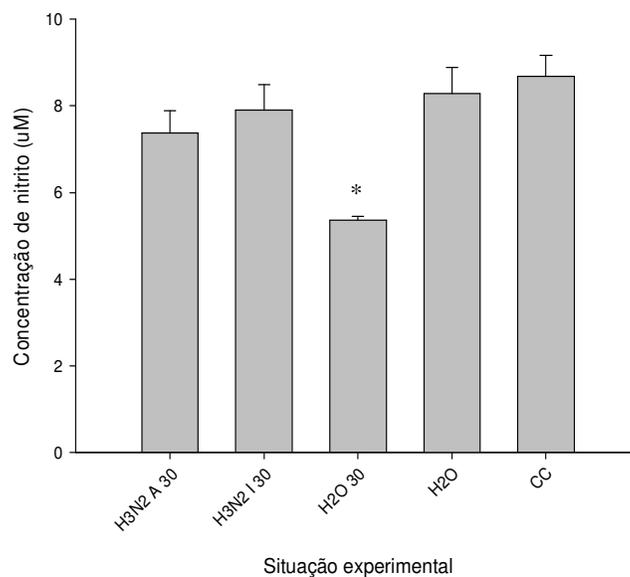


Figura 19: Produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos RAW-264-7 nas diferentes situações experimentais. H3N2 A 30: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH; H3N2 I 30: sobrenadante das células tratadas pelo bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH; H2O 30: sobrenadante das células tratadas por água 30DH; H2O: sobrenadante das células tratadas por água destilada estéril; CC: sobrenadante das células sem tratamento. Houve diferença estatística (* $p < 0,05$) entre a quantidade de NO liberada pelos macrófagos tratados por água 30DH quando comparados ao controle de células e às células tratadas com água destilada estéril.

6.3.8. Avaliação da atividade mitocondrial dos macrófagos RAW 264-7 por MTT

Pelo ensaio com MTT foi avaliada a atividade mitocondrial dos macrófagos RAW-264-7 após 4 tratamentos com as soluções ultradiluídas. A atividade mitocondrial dos macrófagos não foi alterada na presença das soluções ultradiluídas, como pode ser observado na Figura 20.

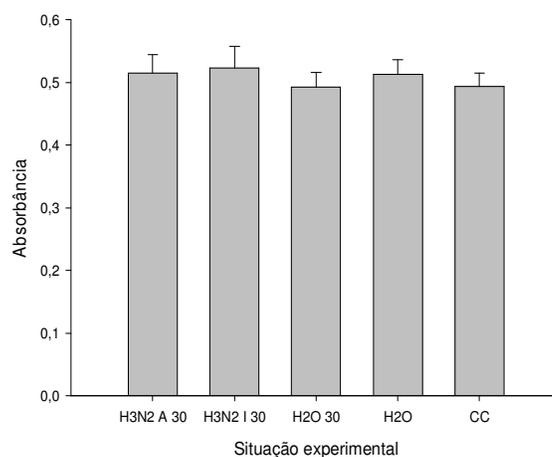


Figura 20: Avaliação da atividade mitocondria de macrófagos. H3N2 A 30: células após 4 tratamentos com bioterápico manipulado a partir do vírus influenza íntegro 30DH; H3N2 I 30: células após 4 tratamentos com bioterápico manipulado a partir do vírus influenza inativado 30DH; H2O 30: células tratadas por água 30DH; H2O: células tratadas por água destilada estéril; CC: células sem tratamento. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre a atividade mitocondrial nas diferentes situações experimentais.

6.4. RESULTADOS DO ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

6.4.1. Experimento I

6.4.1.1. Experimento I - Patogenesia

Os animais do grupo CP, desde o início dos experimentos, se mostraram debilitados. Por este motivo, os dados deste grupo não foram comparados aos dos outros.

Todos os animais foram pesados semanalmente por duas vezes e os dados da variação do peso (delta peso: peso do 21º dia menos o peso detectado no 1º dia de experimento) se encontram na Tabela 3. Como pode ser observado, os animais tratados por timulina (AP) e o controle foram os que ganharam mais peso. O grupo do bioterápico íntegro 30DH (DP) foi o que menos ganhou peso o que pode ser atribuído à patogenesia da gripe.

Tabela 3: Variação do peso, em gramas, de todos os animais dos grupos AP, BP, CP, DP, CtP. Os animais do grupo CP estavam debilitados desde o início dos experimentos.

GRUPOS					
Animal	AP	BP	CP	DP	CtP
1	9,96	6,26	-4,08	6,49	
2	6,87	-4,52	4,28	-1,34	4,79
3	7,22	3,89		3,19	8,17
4	8,37	-4,63	0,37	6,8	
5	5,2	9,44	0,98	0,49	
6	6,04	9,19	-1,33	-3,31	10,94
7	9,54	3,89	-0,16	5,33	
Média (±DP)	7,60 (± 1,77)	3,36 (± 5,85)	0,01 (± 2,75)	2,52 (± 3,98)	7,96 (±3,08)

Os órgãos retirados foram pesados e, posteriormente, foi realizado o peso médio do 1º conjunto (coração, pulmão e linfonodo mediastínico) e do baço. Foi calculado o peso relativo dos mesmos onde foi considerado o peso do órgão dividido pelo peso do respectivo animal. Não foi possível fazer a pesagem dos órgãos dos animais de número 1 de nenhum grupo. A Tabela 4 mostra os dados referentes ao peso relativo do 1º

conjunto e, a Tabela 5, do baço e, como pode ser observado, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao peso dos órgãos dos animais dos diferentes grupos.

Tabela 4: Peso relativo do 1º conjunto e média dos valores, em gramas.

GRUPOS					
Animal	AP	BP	CP	DP	CtP
1					
2	0,018272	0,01827	0,012937	0,016283	
3	0,012903	0,014545	+	0,017562	0,019886
4	0,016036	0,032475	+	0,012258	0,015857
5	0,01776	0,018976	0,038332	+	
6	0,01605	0,018781	0,016885	0,021467	
7	0,015448	0,01902	0,01872	0,011321	0,010692
Média (DP)	0,016078 (± 0,0019)	0,020345 (± 0,0061)	0,021718 (± 0,0113)	0,015778 (± 0,0041)	0,015478 (± 0,0046)

+ animais que foram a óbito durante o experimento. AP: camundongos que receberam Timulina 5CH, BP: camundongos que receberam água 30DH; CP: camundongos que receberam bioterápico inativado 30DH, DP: camundongos que receberam bioterápico íntegro 30DH; CtP: camundongos que receberam água (controle).

Tabela 5: Peso relativo do baço e média dos valores, em gramas.

GRUPOS					
Animal	AP	BP	CP	DP	CtP
1					
2	0,004568	0,010747	0,010062	0,007299	
3	0,004731	0,004727	+	0,005165	0,00625
4	0,003933	0,007966	+	0,004516	0,006277
5	0,004349	0,003916	0,006052	+	
6	0,004913	0,005601	0,011438	0,00477	
7	0,005493	0,00677	0,008237	0,005146	0,005031
Média DP	0,004665 (± 0,0005)	0,006621 (± 0,0024)	0,008947 (± 0,0023)	0,005379 (± 0,0011)	0,005853 (± 0,0007)

+ animais que foram a óbito durante o experimento. AP: camundongos que receberam Timulina 5CH, BP: camundongos que receberam água 30DH; CP: camundongos que receberam bioterápico inativado 30DH, DP: camundongos que receberam bioterápico íntegro 30DH; CtP: camundongos que receberam água (controle).

6.4.1.2. Experimento I - Imunologia

Os animais da fase “I” (imunologia) foram avaliados antes e após a inoculação do antígeno hemaglutinina de vírus influenza H3N2. Esta inoculação se deu 21 dias após o início do tratamento dos animais e, após a inoculação, os animais receberam mais 21 dias de tratamento, tempo médio necessário para a avaliação da resposta imunológica nos animais, perfazendo um total de 42 dias. Após este período, foram avaliados pelo Campo Aberto segundo metodologia já descrita. No dia seguinte, todos os animais foram necropsiados e tiveram seus órgãos coletados conforme descrito anteriormente.

Para facilitar a compreensão, os grupos foram classificados como AI pré; AI pós; BI pré; BI pós e assim sucessivamente, sendo determinado pelo termo “pré” a avaliação antes da inoculação do antígeno e, “pós”, após a inoculação do antígeno de hemaglutinina.

Na Figura 21, pode-se observar que todos os animais apresentaram perda de peso após a inoculação, de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,01$, ANOVA), quando comparado ao peso dos animais antes da inoculação. Porém, os animais do grupo D (animais que receberam bioterápico 30DH a partir de vírus íntegro) não apresentaram diferença estatisticamente significativa uma vez que, mesmo antes da inoculação, não tiveram ganho de peso significativo, como o apresentado pelos animais dos outros grupos.

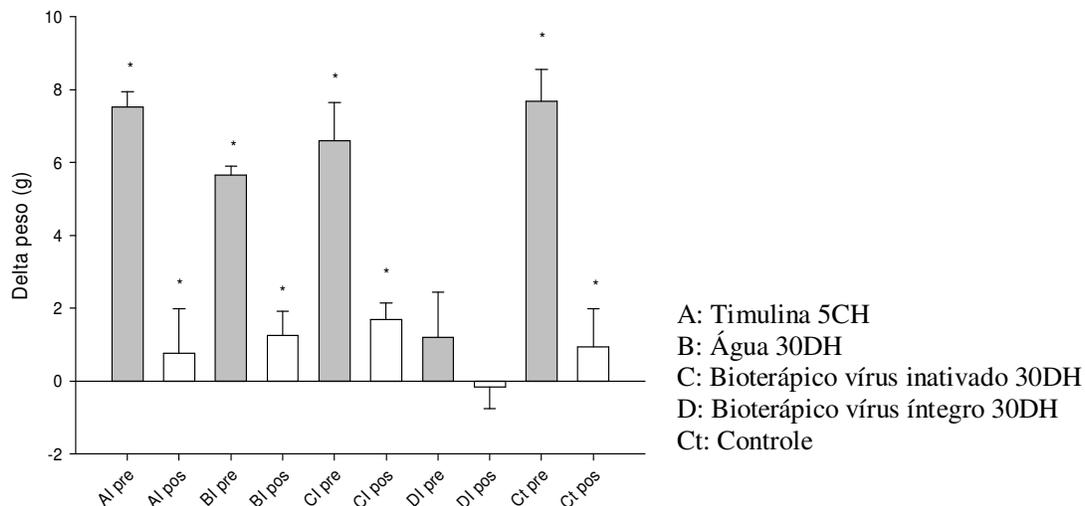


Figura 21: Delta peso, em gramas, dos camundongos nos diferentes grupos da fase “I”, antes (pré – barras cinzas) e após (pós - barras brancas) inoculação dos animais com hemaglutinina do vírus influenza. Todos os animais perderam peso após a inoculação do antígeno (* $p < 0,01$ ANOVA), diferente dos animais do grupo D, tratados pelo bioterápico íntegro 30DH, que não tiveram alteração de peso significativa (ANOVA, $p > 0,05$).

Conforme a Figura 22, pode-se observar que os animais de todos os grupos tiveram um consumo de água uniforme tanto antes quanto após a inoculação do antígeno, evidenciando que os animais consumiram quantidades semelhantes das soluções teste e evidencia que a inoculação do antígeno não alterou a sede dos animais.

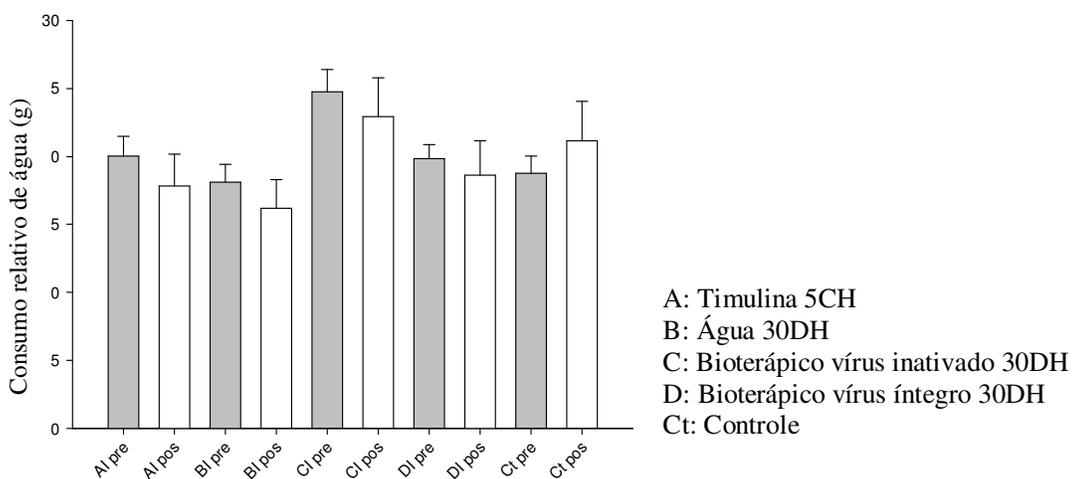


Figura 22: Consumo relativo de água, em gramas, nos diferentes grupos da fase “I”. Este consumo foi medido antes (pré – barras cinzas) e após (pós – barras brancas) a inoculação dos animais com hemaglutinina do vírus influenza. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$, ANOVA) entre os grupos.

Na Figura 23 pode-se observar que o consumo relativo de ração aumentou em todos os grupos após a inoculação do antígeno, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$, ANOVA). Este fato é interessante, pois, mesmo consumindo mais ração, os grupos apresentaram perda de peso, conforme apresentado na Figura 21.

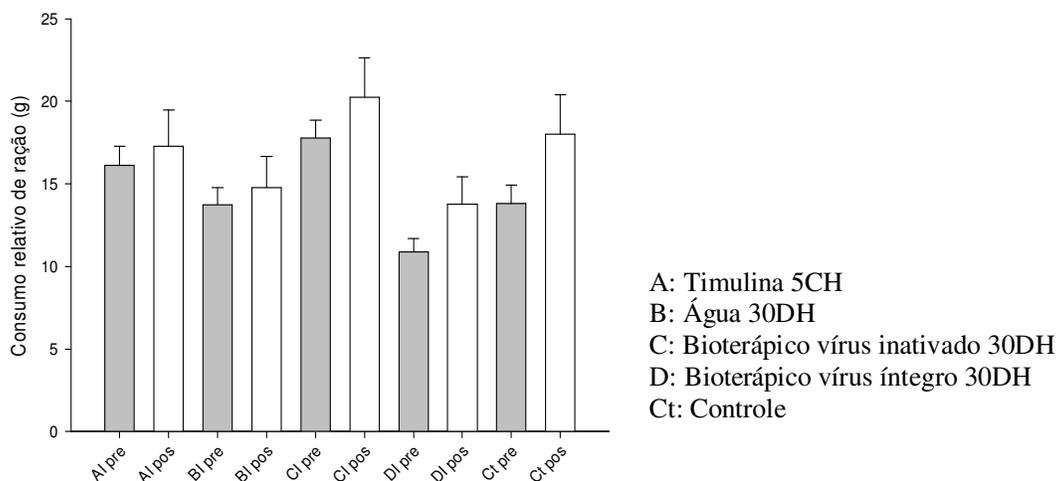


Figura 23: Consumo relativo de ração, em gramas, nos diferentes grupos da fase “I”. Este consumo foi medido antes (pré – barra cinza) e após (pós – barra branca) inoculação dos animais com hemaglutinina do vírus influenza. Todos os grupos, após a inoculação do antígeno, aumentaram o consumo de ração. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$ ANOVA).

Em relação ao tamanho do baço, pode-se observar que o baço dos animais DI (pós-inoculação do antígeno) teve o maior peso relativo quando comparado aos outros grupos (Figura 24), sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparada aos grupos AI e CI ($p < 0,05$; ANOVA).

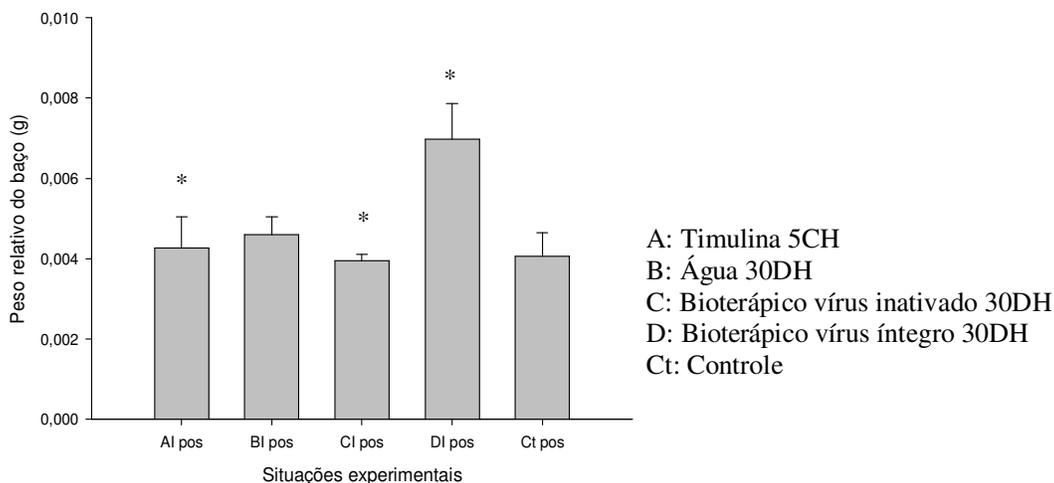


Figura 24: Peso relativo do baço, em gramas, nos diferentes grupos da fase “I” após (pós) a inoculação de hemaglutinina do vírus influenza. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AI pós e CI pós quando comparados ao grupo DI pós (* $p < 0,05$; ANOVA).

Em relação ao peso do primeiro conjunto (coração, pulmão e linfonodo mediastínico), foi verificado que não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA) (Figura 25). Vale observar que o peso do primeiro conjunto foi ligeiramente superior nos animais do grupo AI tratados com timulina 5CH. A avaliação histológica permitiu diagnosticar broncopneumonia em dois animais o que pode ter levado ao aumento do peso do primeiro conjunto (Figura 26).

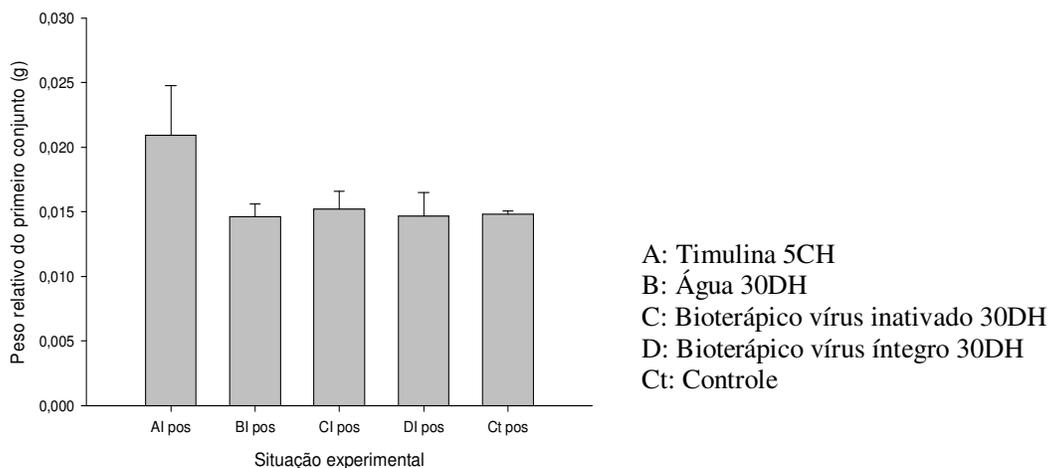


Figura 25: Peso relativo do primeiro conjunto (pulmão, coração e linfonodo mediastínico), em gramas, nos diferentes grupos da fase “I” após (pós) a inoculação de hemaglutinina do vírus influenza. Não houve

diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém o grupo AI apresentou discreto aumento no peso relativo destes órgãos.

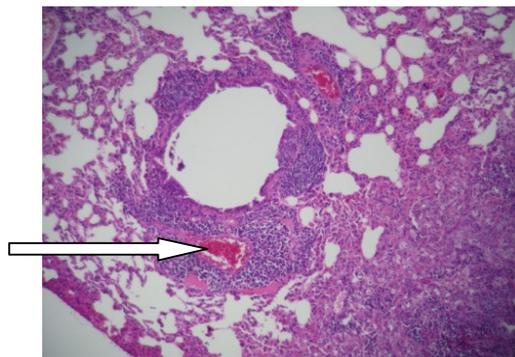


Figura 26: Fotomicrografia (HE) do pulmão do grupo AI que apresentou broncopneumonia (representada com a seta), o que levou a um aumento do peso relativo do primeiro conjunto. Objetiva 10x.

Por histometria do baço, foi possível verificar o diâmetro do centro germinativo, responsável por proliferação de células linfocitárias, sobretudo linfócitos B-2, e o diâmetro total do folículo, onde se concentra a polpa branca. Como pode ser observado na Figura 27, houve diferença estatística entre o tamanho do folículo dos animais que receberam bioterápico íntegro 30DH quando comparados aos animais controle ($p < 0,05$; ANOVA). O mesmo foi verificado na histometria do centro germinativo (Figura 28), porém o grupo que recebeu água dinamizada também apresentou aumento neste parâmetro quando comparado ao controle.

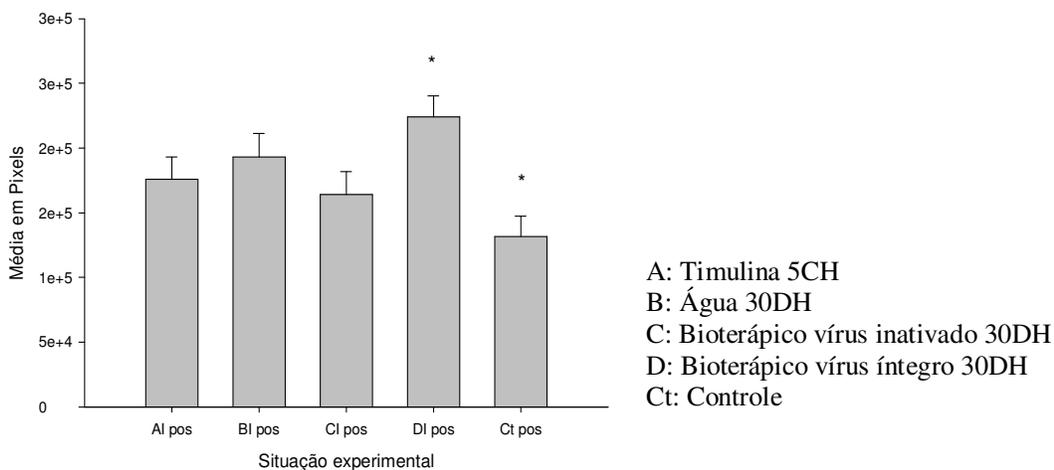


Figura 27: Histometria do folículo no baço dos diferentes grupos da fase “I” após (pós) a inoculação de hemaglutinina do vírus influenza. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos DI pos e Ct pos (* $p < 0,05$ ANOVA).

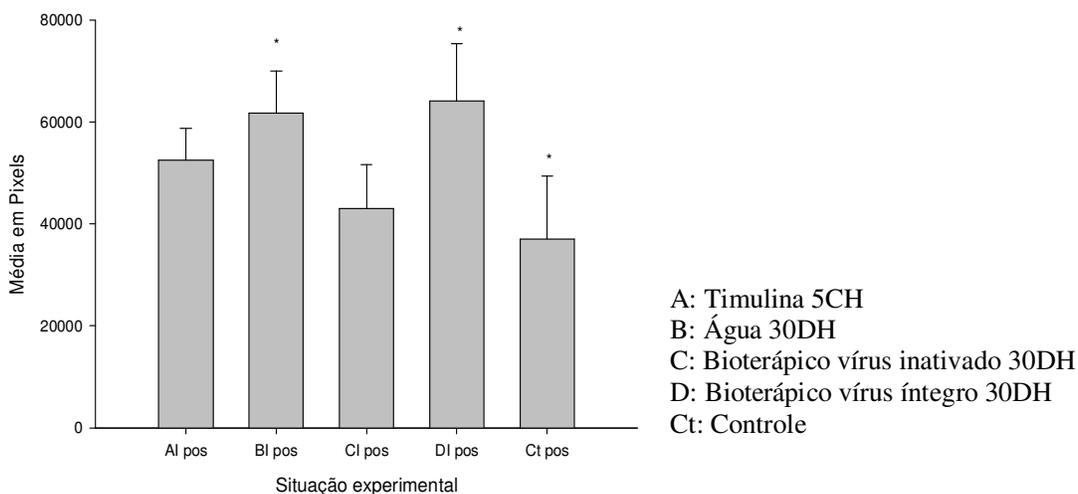


Figura 28: Histometria dos centros germinativos no baço dos diferentes grupos da fase “I” após (pós) a inoculação de hemaglutinina do vírus influenza. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos BI pos e DI pos quando comparados ao Ct pos (* $p < 0,05$ ANOVA).

Como pode ser observado, o bioterápico manipulado a partir do vírus íntegro foi o que obteve melhores resultados em termos de estimulação linfocitária. Sendo assim, um novo experimento foi conduzido para verificar, por citometria de fluxo, a

diferenciação e proliferação local (peritônio) de células de sistema imune nos camundongos tratados somente com o bioterápico do tipo íntegro, em duas potências, 12 DH e 30DH.

6.4.2 Experimento II – Avaliação por Citometria de Fluxo do lavado peritoneal dos camundongos

Camundongos SPF tratados com bioterápicos íntegros em duas diferentes potências, 12DH e 30DH, água dinamizada 30DH e timulina 5CH, foram observados durante 42 dias no total. No 21º dia, os animais receberam, através de inoculação subcutânea, o antígeno hemaglutinina de influenza H3N2. Após 21 dias de inoculação do antígeno, os mesmos foram necropsiados e o lavado peritoneal foi processado para avaliação por citometria de fluxo.

Em relação ao peso antes e após a inoculação do antígeno, pode-se verificar que todos os grupos apresentaram ganho de peso após a inoculação com antígeno do vírus influenza com exceção do grupo que recebeu bioterápico íntegro 30DH que teve uma tendência a perder peso após a inoculação (Figura 29).

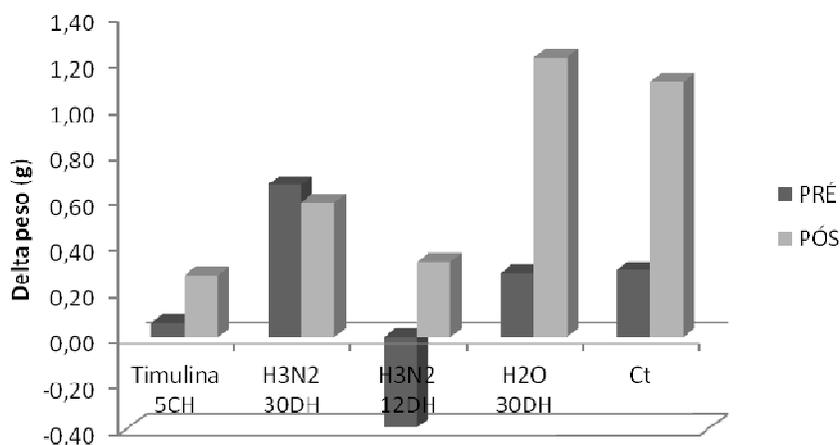


Figura 29: Delta peso, em gramas, dos camundongos nos diferentes grupos antes (pré – barra preta) e após (pós – barra cinza) inoculação dos animais com hemaglutinina do vírus influenza. Todos os animais ganharam peso após a inoculação, diferente dos animais do grupo bioterápico íntegro 30DH que tiveram uma tendência a perder peso.

Quando observado o peso relativo do baço dos animais dos diferentes grupos pode-se verificar que não houve diferença significativa entre os mesmos (Figura 30).

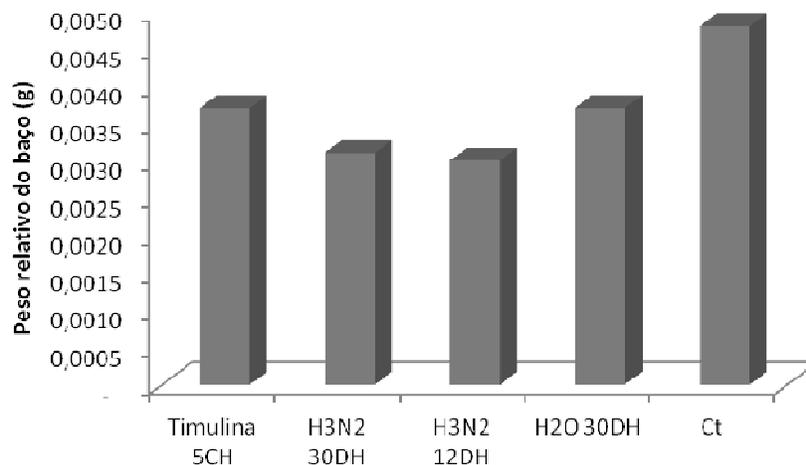


Figura 30: Peso relativo do baço, em gramas, nos diferentes grupos após a inoculação de hemaglutinina do vírus influenza ($p > 0,05$; ANOVA).

Na Figura 31, observa-se que todos os animais consumiram quantidades semelhantes de água e, conseqüentemente, das soluções teste uma vez que o consumo de água entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Vale lembrar que os medicamentos foram colocados na água de bebida na concentração de 1% (*ad libitum*). Da mesma forma que o perfil de consumo de ração também foi semelhante entre os grupos (Figura 32).

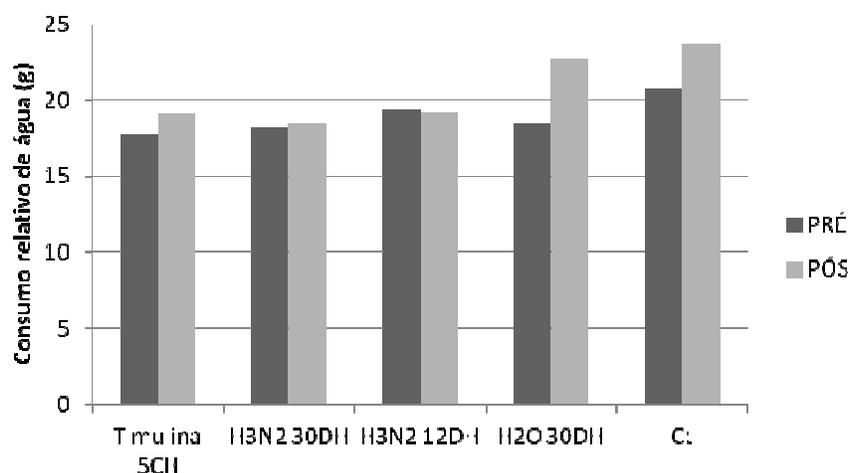


Figura 31: Consumo relativo de água, em gramas, nos diferentes grupos antes (pré – barra preta) e após (pós – barra cinza) inoculação dos animais com hemaglutinina do vírus influenza. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao consumo de água ($p > 0,05$; ANOVA).

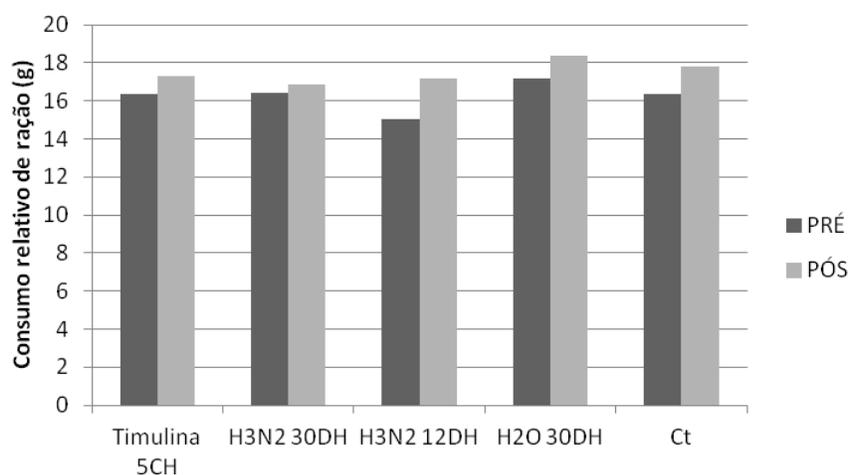


Figura 32: Consumo relativo de ração, em gramas, nos diferentes grupos antes (pré – barra preta) e após (pós – barra cinza) inoculação dos animais com hemaglutinina do vírus influenza. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, em relação ao consumo de ração ($p > 0,05$; ANOVA).

Em relação à imuno-histoquímica, houve um aumento significativo quanto ao número de macrófagos CD11b+ encontrados no baço entre o grupo tratado com Timulina 5CH e o grupo controle (Figura 33). Também ocorreu aumento de Linfócitos T CD3+ no grupo tratado com H3N2 12DH em relação aos controles (Figura 34). As células marcadas com CD45 não apresentaram resultados com diferença estatística ($p > 0,05$; ANOVA).

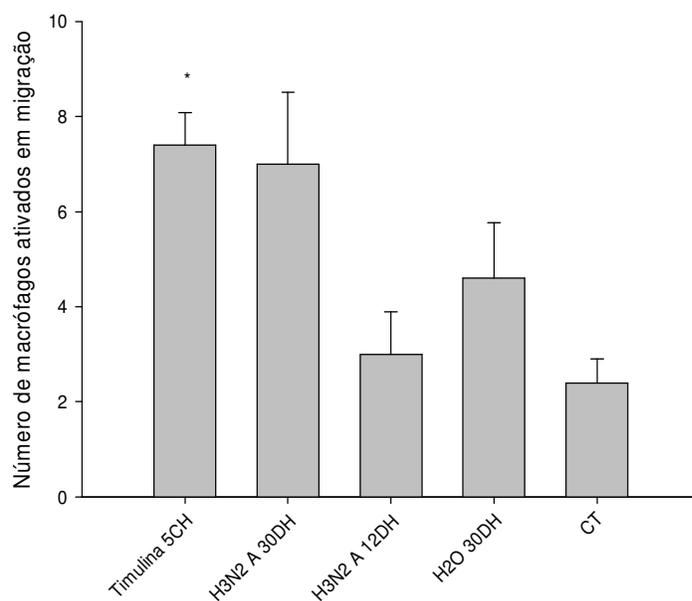


Figura 33: Área positiva para macrófagos CD11b+ (imuno-histoquímica) em relação à área total do corte de baço nos diferentes grupos. Houve um aumento no número de macrófagos com diferença estatística no grupo Timulina em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$. ANOVA, Tuckey-Krammer).

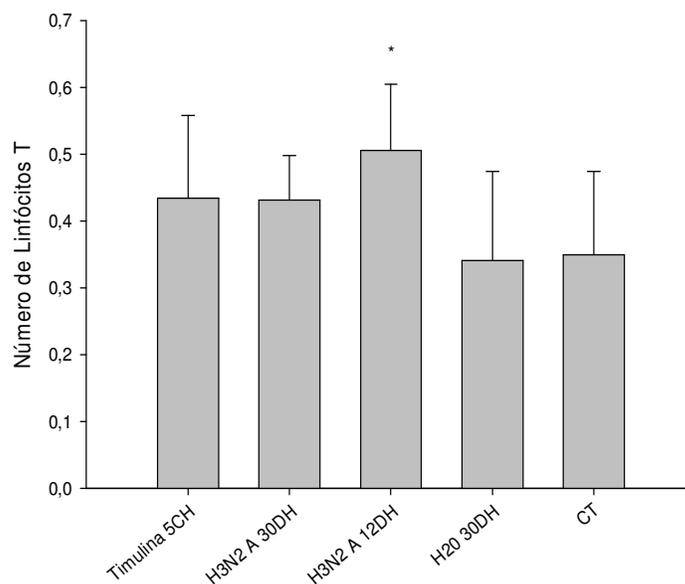


Figura 34: Área positiva para linfócitos T CD3+ (imuno-histoquímica) em relação à área total do corte de baço nos diferentes grupos. Houve um aumento no número de linfócitos com diferença estatística no grupo H3N2 A 12DH em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$. ANOVA, Tuckey-Krammer).

O lavado peritoneal, depois de processado, foi levado para análise em citômetro de fluxo. O dado de proporção, segundo morfologia, mostrou que houve uma proporção relativamente igual de linfócitos e macrófagos originadas de camundongos tratados com timulina 5CH e bioterápico íntegro 30DH enquanto que nos outros grupos pode ser observado um aumento de macrófagos em relação aos linfócitos (Figuras 35 e 36).

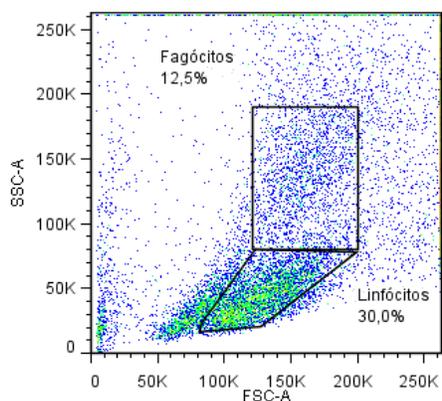


Figura 35: Diagrama de pontos representando a percentagem, distribuição e seleção de população de linfócitos e fagócitos totais por citometria de fluxo do lavado peritoneal de camundongo controle não inoculado. Gates de linfócitos e fagócitos são identificados com base no tamanho da célula (eixo y) e granulosidade (eixo x). Gráfico obtido pelo *software* Flow Jo 8.7.

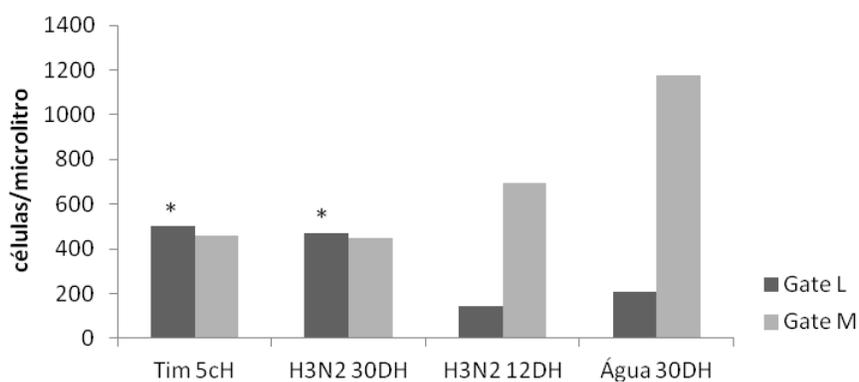


Figura 36: Relação macrófagos/linfócitos (segundo morfologia, ver Figura 35) quantificadas por citômetro de fluxo, presentes no peritônio dos camundongos tratados nas diferentes situações experimentais. Linfócitos (barra preta); Macrófagos (barra cinza). Houve diferença estatística entre os grupos que receberam Timulina e H3N2 30DH quando comparado ao controle H2O 30DH (* $p < 0,05$; teste *qui quadrado*).

O termo PDM está relacionado aos fagócitos maduros (CD19- CD11b+) enquanto que o termo PDB1 significa fagócitos derivados de células B1 (CD19+ CD11b+). Pode-se observar na Figura 37 que os animais tratados com timulina 5CH e com os bioterápicos 12DH e 30DH apresentaram menos macrófagos maduros ($p < 0,05$) quando comparados aos animais controle que receberam água dinamizada 30DH ($p < 0,05$; teste qui quadrado).

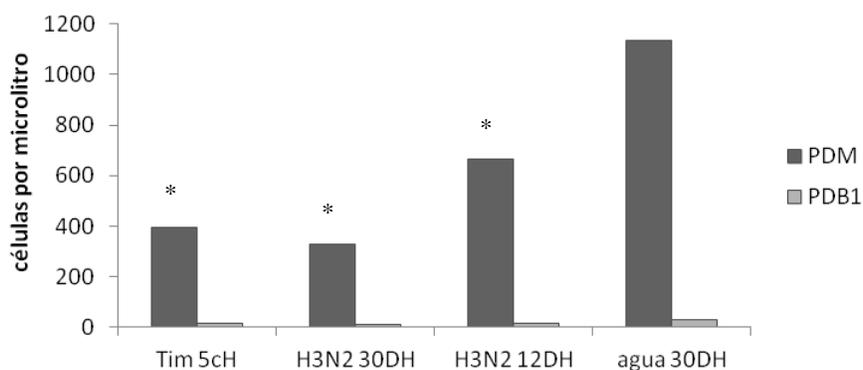


Figura 37: Proporção entre macrófagos maduros/macrófagos derivados de células B1 quantificadas por citômetro de fluxo, presentes no peritônio dos camundongos tratados nas diferentes situações experimentais. PDM (barra preta); PDB1 (barra cinza). Grupos de animais tratados com Timulina 5CH e com os bioterápicos 12DH e 30DH possuem menos macrófagos maduros ($p < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo controle de água dinamizada 30DH ($*p < 0,05$; teste qui quadrado).

A relação entre linfócitos B e outros linfócitos no peritônio pode ser verificada na Figura 38 com um aumento de células B e não-B no lavado peritoneal dos camundongos que receberam Timulina 5CH e bioterápico íntegro 30DH ($p < 0,05$; teste qui quadrado) em relação ao controle (água 30DH).

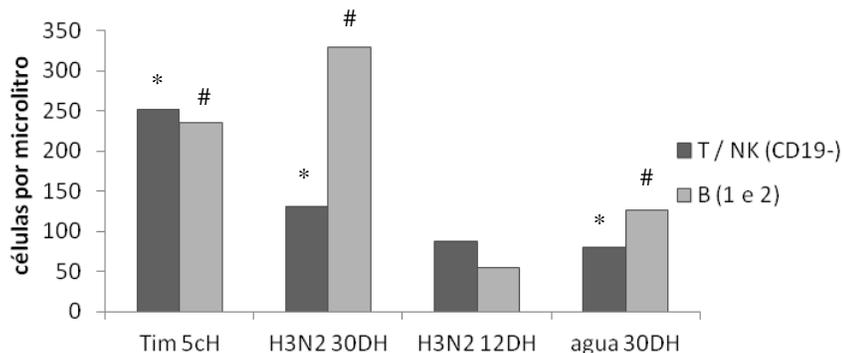


Figura 38: Proporção entre células B (B) e outros linfócitos (T/NK) quantificadas por citômetro de fluxo, presentes no peritônio dos camundongos tratados nas diferentes situações experimentais. Houve um aumento de células B e não-B no lavado peritoneal dos camundongos que receberam Timulina 5CH e bioterápico íntegro 30DH (*# $p < 0,05$; teste qui quadrado) em relação ao controle (água 30DH).

Em relação a proporção de B1a/B1b (Figura 39), pode-se observar um número maior de células B1b nos camundongos que receberam Timulina 5CH e bioterápico íntegro 30DH quando comparados aos demais grupos (* $p < 0,05$; teste qui quadrado).

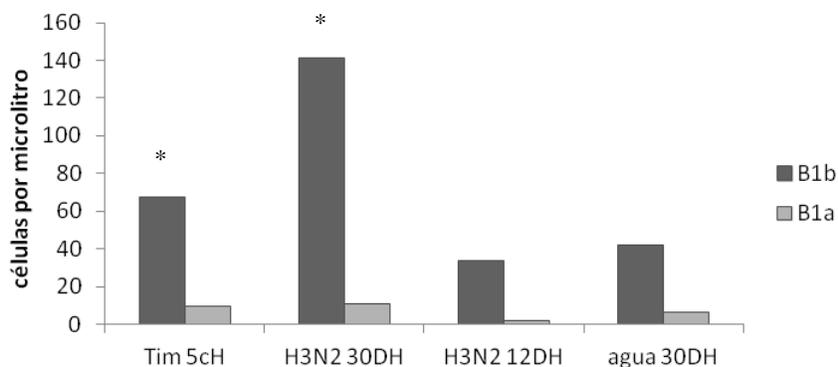


Figura 39: Proporção de células B1a/B1b quantificadas por Citômetro de fluxo, presentes no peritônio dos camundongos tratados nas diferentes situações experimentais. Houve maior número de células B1b nos camundongos que receberam Timulina e H3N2 30DH quando comparados aos demais grupos (* $p < 0,05$; teste qui quadrado).

A Figura 40 é um diagrama de pontos representando a percentagem, distribuição e seleção de sub-populações de linfócitos e fagócitos. A Figura 41 mostra a proporção entre essas células, sendo observado que a quantidade de células B2 em relação à B1 nos camundongos tratados por Timulina 5CH e bioterápico íntegro 30DH teve uma redução estatisticamente significativa quando comparadas ao controle H2O 30DH (* $p < 0,05$; teste *qui quadrado*).

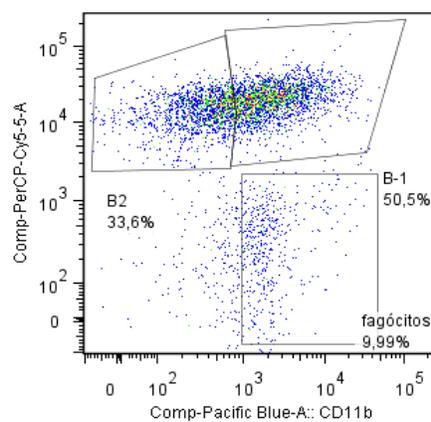


Figura 40: Diagrama de pontos representando a percentagem, distribuição e seleção de sub-populações linfócitos e fagócitos por citometria de fluxo do lavado peritoneal obtido de camundongo controle, não inoculado. Representação de células B1 (CD19+ CD23-), B2 (CD19+ CD23+) e fagócitos (CD19- CD11b+). Gráfico obtido pelo *software* Flow Jo 8.7.

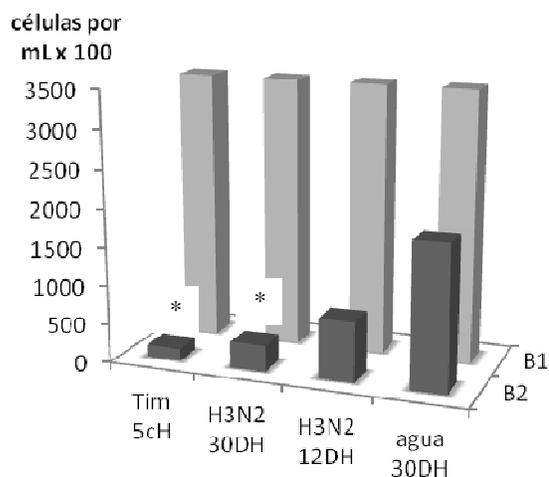


Figura 41: Proporção de células B1/B2 quantificadas por citômetro de fluxo, presentes no peritônio dos camundongos tratados nas diferentes situações experimentais. Houve uma diminuição nas células B2 nos camundongos tratados pela Timulina e H3N2 30DH quando comparado ao controle água 30DH (* $p < 0,05$; teste *qui quadrado*).

Em relação a proporção de CD4/CD8 (Figuras 42 e 43), observa-se maior quantidade de CD4 nos grupos tratados com Timulina 5CH e com o bioterápico íntegro 30DH quando comparados ao controle H2O 30DH, onde se verifica um perfil que tende a ser o inverso do primeiro ($p < 0,05$; *qui quadrado*).

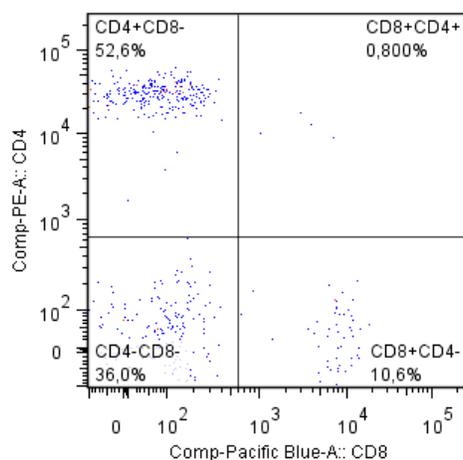


Figura 42: Diagrama representando a distribuição e seleção de subpopulações de células T pelo citômetro de fluxo do lavado peritoneal de camundongo controle não inoculado. O diagrama foi extraído do *gate* de linfócitos. Há predominância das células CD4+. Gráfico obtido pelo *software* Flow Jo 8.7.

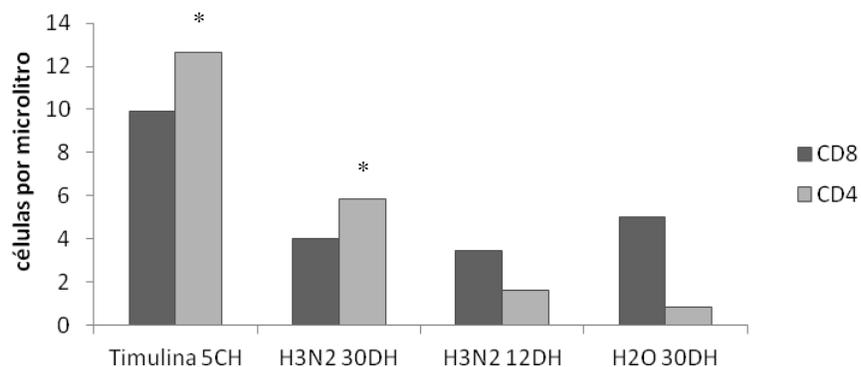


Figura 43: Proporção de células CD4/CD8 quantificadas por citômetro de fluxo, presentes no peritônio dos camundongos tratados nas diferentes situações experimentais. Observa-se maior quantidade de CD4 nos grupos tratados com Timulina 5CH e com o bioterápico íntegro 30DH quando comparados ao controle H2O 30DH (* $p < 0,05$; teste *qui* quadrado).

6.5. RESULTADOS DO ESTUDO CLÍNICO

Das 600 crianças selecionadas para o estudo, 445 (74,17%) crianças finalizaram o mesmo e 155 (25,83%) crianças foram classificadas como desistentes uma vez que, por diferentes motivos, saíram durante o período da pesquisa. As principais razões para esta desistência foram a mudança de endereço ou a adesão a um plano de saúde particular (Figura 44). É importante mencionar que nenhuma criança veio a óbito durante o estudo.

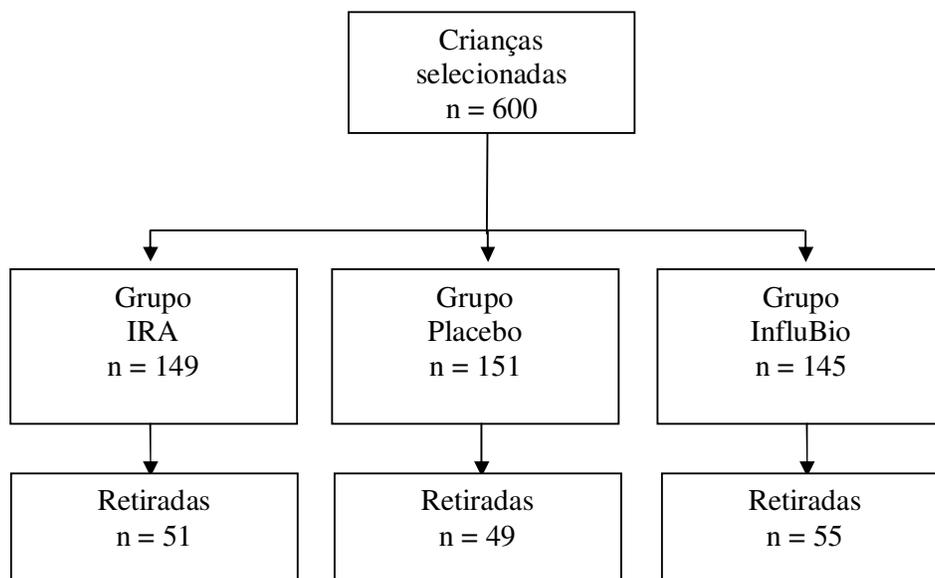


Figura 44: Fluxograma das crianças incluídas no estudo.

A média de idade das crianças que participaram até o final do estudo, foi de 2 a 3 anos de idade e a média do índice de massa corporal (IMC) foi de aproximadamente 16 kg/m^2 . A razão entre crianças do sexo masculino e feminino foi similar. Quando a raça e área da residência foram observadas, foi verificado que a maioria das crianças foi classificada como branca e parda, com moradias em áreas urbanas. Foi observado que, no ano anterior, a maioria das crianças tinha apresentado pelo menos um episódio de gripe ou infecção respiratória aguda (Tabela 6).

Tabela 6: Características clínicas e demográficas dos pacientes e demográficas, expressas em média \pm desvio padrão ou percentagem (número).

Características	IRA (n=149)	Placebo (n=151)	InfluBio (n=145)
Média de idade (anos)	2,4 \pm 1,2	2,4 \pm 1,1	2,6 \pm 1,1
Média do IMC (Kg/m ²)	16,3 \pm 2,4	16,3 \pm 2,6	16,2 \pm 1,6
Sexo (%; n)			
Feminino	42,3 (63)	48,3 (73)	42,8 (62)
Masculino	56,4 (84)	49,0 (74)	57,2 (83)
Perda	1,3 (2)	2,6 (4)	0
Raça (%; n)			
Amarela	7 (1)	0	0
Branca	51,7 (77)	49,0 (74)	52,4 (76)
Negra	12,1 (18)	13,9 (21)	10,3 (15)
Parda	25,5 (38)	26,5 (40)	29,0 (42)
Perda	10,1 (15)	10,6 (16)	8,3 (12)
Area da residência (%; n)			
Rural	6 (9)	4 (6)	8,3 (12)
Urbana	77,9 (116)	80,1 (121)	77,9 (113)
Rural/Urbana	8,1 (12)	7,9 (12)	6,9 (10)
Perda	8,1 (12)	7,9 (12)	6,9 (10)
Episódios de gripe/ Infecção respiratória aguda* (%; n)			
0	8,9 (11)	12,8 (16)	16,4 (20)
1	35 (43)	37,6 (47)	38,5 (47)
2	22,8 (28)	20,8 (24)	19,7 (24)
3	17,1 (21)	13,6 (17)	9,8 (12)
≥ 4	16,3 (20)	15,2 (19)	15,6 (19)

*Número de episódios de gripe/ infecção respiratória aguda detectados durante o ano anterior ao do estudo clínico (2008).

Os voluntários tratados com medicamentos homeopáticos apresentaram uma menor incidência de episódios de gripe/ infecção respiratória aguda do que os que foram tratados com placebo. O grupo placebo apresentou gripe/ infecção respiratória aguda (mediana; intervalo interquartil) três vezes superior (0; 0-3) aos grupos que receberam medicamentos homeopáticos (0; 0-1) ($p < 0.001$), considerando o limite superior interquartil (percentil 75) (Tabela 7). Essas diferenças, mesmo que pequenas, levaram a uma diferença estatisticamente significativa quando os grupos tratados por medicamentos homeopáticos foram comparados ao grupo placebo.

Tabela 7: Mediana (intervalo interquartil) de episódios de gripe/ infecção respiratória aguda, referindo ao grupo de intervenção de medicamentos homeopáticos (Tukey's Hinges) e tempo em meses (mediana, intervalo interquartil) antes do aparecimento dos sintomas de gripe ou infecção respiratória aguda (média ponderada).

Intervenção	Número de episódios de gripe/ Infecção respiratória aguda	Tempo em meses antes dos primeiros sintomas
	Mediana (Intervalo Interquartil: 25% - 75%)	Mediana (Intervalo Interquartil: 25% - 75%)
IRA	0 (0 - 1)	1.00 (0.00 – 1.00)
Placebo	0 (0 - 3)	3.03 (2.03 – 3.03)
Bioterápico	0 (0 -1)	1.00 (0.00 – 1.00)

Adicionalmente, nenhuma diferença estatística foi detectada entre os medicamentos homeopáticos quando comparados entre si ($p = 0,99$) (Tabela 8). Entretanto, quando o número de episódios de gripe/ infecção respiratória aguda foi comparado entre os grupos de intervenção, uma diferença estatisticamente significativa foi detectada nas crianças que receberam placebo (Tabela 8), usando análise de variância (Post Hoc Tests).

Tabela 8: Número de episódios de gripe/ infecção respiratória aguda comparado entre os grupos de intervenção.

Grupo de intervenção	Comparado a	p (Tukey)
IRA (0; 0-1)	Placebo (0; 0 – 3)	<0.001
Bioterápico (0; 0-1)	Placebo (0; 0-3)	<0.001
IRA (0; 0-1)	Bioterápico (0; 0-1)	0.99

Considerando o tempo em meses antes da ocorrência dos primeiros sintomas de gripe ou da infecção respiratória aguda (Tabela 7), a maioria das crianças que recebeu IRA ou o bioterápico apresentou apenas um único episódio ou sintomas de gripe/ infecção respiratória aguda no primeiro mês após a administração da amostra (maio 2009). Entretanto, crianças que receberam o placebo apresentaram um aumento dos sintomas de gripe/ infecção respiratória aguda a partir do segundo (junho 2009) ou terceiro mês (julho 2009) após a administração da amostra.

Crianças que apresentaram sintomas de gripe ou infecção respiratória aguda eram sempre direcionadas ao médico mais próximo ou recebiam atendimento do próprio coordenador da pesquisa, no Instituto Roberto Costa. As crianças não foram, em momento algum, submetidas à exames de laboratório e os sintomas eram sempre relatados aos agentes de saúde pelas famílias. Para evitar qualquer interferência na coleta de dados, os sintomas eram relatados sem a presença de um *checklist*, considerando os sintomas da classificação ICPC. É importante ressaltar que nenhum desconforto ou morte induzidos pelo uso das soluções teste foram relatadas pelas famílias durante o período deste estudo clínico. O relatório deste ensaio clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRJ e encontra-se anexado a esta tese (ANEXO 3).

7. DISCUSSÃO

A homeopatia é um dos métodos de medicina complementar mais utilizado no mundo e seu uso vem sendo estimulado pela OMS de forma integrada com os tratamentos clássicos. No Brasil, a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde” (BRASIL, 2006), foi instaurada com o intuito de incentivar e apoiar projetos de assistência, ensino e pesquisas homeopáticas nas várias esferas nacionais.

O Brasil possui grande número de trabalhos científicos e de relatos clínicos significativos com o uso de diversas preparações homeopáticas, incluindo os bioterápicos (SIQUEIRA *et al.*, 2013; BONAMIN *et al.*, 2013; ALEIXO, *et al.*, 2012; SATO, 2012; FERRAZ, *et al.*, 2011; 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.*, 2008, b; ALEIXO *et al.*, 2008; FONTES, 2005; CAVALCANTI *et al.*, 2003).

A homeopatia por ser uma forma de tratamento segura e economicamente viável vem tomando lugar de destaque para estudos, principalmente, para infecções nas quais há grande resistência dos microrganismos devido a grande mutação. No caso do vírus influenza, além de algumas cepas resistentes aos tratamentos antivirais, os medicamentos clássicos são extremamente tóxicos e devem ser usados com cautela principalmente em gestantes e crianças (RASMUSSEN *et al.*, 2011). Como os medicamentos homeopáticos são seguros para qualquer paciente e idade, houve um estímulo para continuarmos as pesquisas *in vitro* concluídas em 2009 (SIQUEIRA, 2009) dando sequência às pesquisas através de protocolos pré-clínico e clínico, além da investigação mais detalhada através de estudos *in vitro*.

Desta forma, nesta tese de doutorado foram avaliados os efeitos de bioterápicos de vírus influenza A H3N2 (A/Aichi/2/68 e A/Vitctoria/3/75) íntegro e inativado em duas potências, 12DH e 30DH. Estas preparações foram submetidas à farmacotécnica homeopática descrita na Farmacopeia Homeopática Brasileira (BRASIL, 2011), sendo diluída e dinamizada até as potências 12DH e 30DH.

O potencial antiviral dos bioterápicos foi avaliado frente à linhagem de células de rim canino, Mardin-Darby canine kidney (MDCK), as quais são classicamente descritas na literatura como modelos 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 das linhagens J774G8 e RAW 264-7, sendo a produção de citocinas e óxido nítrico liberados por estas células, estimuladas ou não pelos bioterápicos, quantificadas através de ELISA e citometria de fluxo.

Para o estudo pré-clínico foram realizados dois *sets* de experimentos nos quais foram utilizados camundongos machos balb-c tratados e desafiados com antígeno hemaglutinina de influenza. Estes animais foram avaliados quanto ao comportamento e à produção de células do sistema imunológico. Nestes experimentos foram comparados tanto a resposta dos animais aos bioterápicos íntegro quanto ao inativado, assim como foi feita a avaliação quanto às diferentes potências e ao medicamento timulina 5CH.

Outros experimentos conduzidos nesta tese foram feitos através de estudo clínico triplo cego, randomizado, placebo controlado onde foram avaliadas 600 crianças pertencentes ao Programa de Saúde da Família da cidade de Petrópolis/RJ. Para este estudo, somente o bioterápico íntegro na potência 30DH foi avaliado uma vez que foi o bioterápico com os melhores resultados durante todo o estudo desenvolvido.

Siqueira (2009) já havia demonstrado 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. Porém, foi necessário comparar os efeitos deste bioterápico manipulado em água com aquele manipulado em solução hidroalcoólica 70%, denominado bioterápico do tipo inativado. Para isso, utilizamos solução hidroalcoólica 70% como veículo garantindo a lise total das partículas virais observadas por MET. Após esta primeira dinamização em solução hidroalcoólica 70%, as potências seguintes foram feitas em água destilada estéril conforme o procedimento realizado para o bioterápico íntegro.

A escolha da água como solvente destes bioterápicos 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 (BONAMIN *et al.*, 2013; SATO, 2012; 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 (SIQUEIRA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2008; AQUINO *et al.*, 2008;

VARRICCHIO *et al.*, 2008). Por isto, os resultados experimentais desenvolvidos foram sempre comparados àqueles obtidos pela água destilada e pela água dinamizada.

A ausência de partículas infectivas na potência 30DH foi previamente comprovada por espectroscopia UV-vis, que não foi capaz de detectar proteínas e/ou material genético de origem viral no bioterápico (SIQUEIRA, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Este ensaio, realizado 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 (SIQUEIRA, 2009). Desta forma, o uso deste bioterápico na potência de 30DH não apresenta qualquer risco de infecção. Outra potência utilizada nesta tese foi a 12 DH, potência esta com possível presença de partículas virais uma vez que ainda não ultrapassou o número de avogadro, conforme descrito anteriormente. Por este motivo, esta potência foi utilizada somente nos experimentos *in vitro* e pré-clínico para avaliação de sua resposta biológica.

A concentração do bioterápico em relação ao meio de cultura de escolha para os estudos *in vitro* foi a de 10% uma vez que, durante a dissertação de mestrado, estudos comprovaram que esta concentração era segura, ou seja, não citotóxica para utilizar nos experimentos *in vitro* (SIQUEIRA, 2009). Durante a presente tese, as células foram tratadas por 6 ou 18 vezes, diferente dos estudos conduzidos durante o mestrado onde o tratamento foi realizado por tempo, ou seja, 10 (6 tratamentos) ou 30 dias (18 tratamentos). Este foi um ponto interessante a ser considerado, pois o número de tratamentos foi o mesmo, porém com duração em dias diferentes. Os seis tratamentos eram realizados em 48 horas, enquanto que os 18 tratamentos eram conduzidos durante quatro dias. A comparação dos resultados obtidos em 2009 com os atuais nos permite concluir que as células respondem de forma diferente à esses estímulos, que serão discutidos a seguir. Resultados semelhantes têm sido obtidos em nosso laboratório com

bioterápicos de *Candida albicans* preparados pela metodologia Roberto Costa (COSTA *et al.*, 2008; HOMSANI *et al.*, 2012) indicando que a forma de tratamento das células modifica a resposta biológica, com respostas diferenciadas à medida que se aumenta o tempo de contato das células com os medicamentos homeopáticos. Isso nos faz pensar que a maquinaria celular necessita de um tempo adequado para “processar” a informação fornecida pelos medicamento, como explicado pela “Teoria dos Significados Corporais” descrita originalmente por Bastide (BASTIDE & LAGACHE, 1997).

A discussão desta tese foi preparada considerando os resultados de cada etapa do projeto (*in vitro*, pré-clínica e clínica), sendo os resultados conectados e discutidos ao longo desta seção.

O ensaio de MTT avalia a atividade mitocondrial de células viáveis, através da enzima succinato desidrogenase, que transforma o sal tetrazolium, de cor amarela, 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. Esta análise por MTT evidenciou que as células MDCK que receberam seis tratamentos não tiveram suas taxas de respiração celular alteradas, enquanto que as que receberam 18 tratamentos apresentaram uma diferença estatística ($p < 0,05$), entre as células que receberam o bioterápico íntegro na 30DH e as que receberam bioterápico inativado na mesma potência, mostrando, desta forma, que as células respondem de forma diferente ao tempo de tratamento e aos tipos de bioterápicos. Para aumentar a compreensão desses resultados alguns estudos bioquímicos foram realizados e serão discutidos à frente.

O primeiro estudo bioquímico conduzido avaliou a atividade da enzima Fosfofrutoquinase 1 (PFK-1), enzima importante da via glicolítica. Quando sua atividade está diminuída, ocorre um acúmulo de glicose 6-fosfato que pode ser desviada para a via das pentoses-fosfato que originam componentes de biomoléculas muito importantes, como ATP, RNA e DNA (STRYER, 1996). O aumento na atividade desta enzima indica que a taxa glicolítica está maior (STRYER, 1996). Desta forma, a avaliação da atividade da enzima PFK-1 é importante para o presente estudo em função das alterações na viabilidade detectadas após 18 tratamentos. Através da análise espectrofotométrica da atividade da PFK-1 do homogeneizado celular nas diferentes situações experimentais, foi verificado um aumento na atividade desta enzima nas células que receberam 18 tratamentos, sendo este aumento estatisticamente significativo, entre as células que receberam os bioterápicos, tanto íntegro quanto inativado, e o controle de células (Figura 9). Vale lembrar que a potência 12DH do bioterápico inativado não induziu diferença estatística; porém as células tratadas com o mesmo apresentaram uma tendência a aumentar a atividade desta enzima. É importante ressaltar que este mesmo experimento foi conduzido durante a dissertação de mestrado (2009) e o resultado foi o inverso, ou seja, houve uma diminuição da atividade da PFK-1, provavelmente devido a diferença no esquema de tratamento das células MDCK. Neste estudo de 2009 as células foram tratadas com a mesma concentração e volume de medicamento, entretanto as doses foram espaçadas num período de 30 dias. Em contrapartida, no presente estudo, modificamos o esquema de tratamento, reduzindo-o de 30 dias para 4 dias, ou seja, as células MDCK receberam a mesma quantidade de medicamento mas tiveram um tempo significativamente menor para “processar” toda esta informação fornecida pelos bioterápicos. Verificamos que as células, mesmo não sendo infectadas pelo vírus influenza, neste caso, responderam de forma semelhante a

uma infecção uma vez que alguns estudos mostram que o metabolismo das células pode ser afetado pela infecção viral (EL-BACHA *et al.*, 2007; RITTER, 2010). As transformações que ocorrem nas células MDCK, após a infecção, já são bem descritas e incluem um aumento no metabolismo glicolítico e alterações morfológicas semelhantes às detectadas neste estudo (Figuras 10 - 15). Outros vírus induzem alterações metabólicas semelhantes nas células hospedeiras, a saber: vírus da rubéola, citomegalovírus, vírus mayaro, vírus da dengue, dentre outros (EL-BACHA *et al.*, 2007; RITTER, 2010).

Em relação à infecção pelo vírus influenza, estudos demonstram um aumento nas taxas de glicólise e uma ativação da via das pentoses-fosfato durante os estágios iniciais da infecção (RITTER, 2010). Estudos mostraram que ocorre um aumento na captação de glicose, assim como na liberação de lactato em células infectadas indicando uma alteração na atividade glicolítica. RITTER (2010) verificou que durante as primeiras 10 horas pós-infecção a liberação dos diferentes metabólitos da glicólise se mantém constante, tanto nas células infectadas, quanto nas não infectadas. Nas células infectadas, após 10 horas da infecção, verifica-se um aumento linear na concentração dos metabólitos por, aproximadamente, 24 horas pós-infecção. Após esse período, a concentração diminui, porém se mantém maior do que nas células que não foram infectadas. Quando avaliados os metabólitos do ciclo de Krebs, novamente, após 10 horas da infecção, a concentração de citrato aumenta nas células infectadas (RITTER, 2010).

Seguindo esta linha de raciocínio, estudos que avaliaram a respiração mitocondrial, produção de lactato, atividade da enzima citrato sintase e hidrólise de ATP foram conduzidos nas células MDCK tratadas com os bioterápicos e não infectadas. Nestes experimentos somente os bioterápicos íntegros nas potências 12DH e

30DH foram avaliados. Os experimentos conduzidos em cego indicaram que as células tratadas com o bioterápico íntegro 30DH respondem de forma semelhante a uma célula infectada, ou seja, ocorrem algumas alterações bioquímicas clássicas de infecção viral.

Através do estudo da função respiratória realizado por oxigrafia de alta resolução o consumo de oxigênio mitocondrial das células que receberam 6 e 18 tratamentos com bioterápico íntegro 30DH foi avaliado e verificamos um aumento na capacidade respiratória máxima quando as células controle foram comparadas aquelas que receberam somente água destilada estéril. As células que receberam 18 tratamentos com o bioterápico na potência 12DH também apresentaram um aumento na capacidade respiratória máxima. A respiração basal e o consumo de oxigênio não mitocondrial não foram alterados com os diferentes tratamentos quando comparados ao controle (Figuras 10 e 11).

El-Bacha e colaboradores (2007) avaliaram o efeito do vírus da dengue sobre a função respiratória de células HepG2 e verificaram que este vírus também é capaz de aumentar o consumo de oxigênio celular de maneira semelhante ao que foi detectado no presente estudo quando células MDCK foram tratadas pelos bioterápicos íntegros. Porém, outras alterações como aumento da respiração basal e da respiração independente de oligomicina foram detectadas por El-Bacha diferentemente do que foi observado no presente estudo. Desta forma, podemos inferir que o tratamento por bioterápico íntegro altera algumas propriedades da respiração mitocondrial mesmo em células não infectadas, mimetizando o comportamento de células infectadas por vírus.

Estes dados acerca da respiração mitocondrial nos motivaram a realizar outras análises a fim de verificar se o aumento do consumo de oxigênio foi decorrente de um estímulo à biogênese mitocondrial. Para isto, foi avaliada a atividade da enzima citrato sintase que é um marcador enzimático quantitativo da presença de mitocôndrias intactas

(KUZNETSOV, 2010). Na condição de 18 tratamentos com bioterápicos 12 DH e 30 DH, foi verificado um aumento da atividade de citrato sintase, comparado ao grupo controle, indicando um aumento na biossíntese mitocondrial das células tratadas. Para corroborar com este resultado foi avaliada também a hidrólise de ATP pela ATP sintase, uma vez que a hidrólise de ATP sensível a azida só é feita pela ATP sintase, localizada nas mitocôndrias. Em ambas as condições experimentais (6 e 18 tratamentos) foi verificado um aumento na atividade de hidrólise de ATP na células tratadas com bioterápico 30DH em comparação ao grupo controle. Estes resultados indicam que o tratamento com os bioterápicos, principalmente na potência 30DH, induzem um aumento significativo na biogênese mitocondrial nas células MDCK.

Outro experimento conduzido foi para verificar a produção de lactato pelas células MDCK que receberam tratamento. Após 20 minutos de experimento, foi adicionado KCN, um inibidor do complexo IV do sistema de transporte de elétron, o que induz a célula a utilizar somente a glicólise para a produção de ATP, mecanismo denominado de *shift* metabólico. Nesta condição, como é esperado, a formação de lactato é estimulada, mimetizando o efeito Pasteur (MERLO-PICH *et al.*, 2004). Desta forma, o aumento da taxa de liberação de lactato nas células tratadas com os bioterápicos indica um aumento do metabolismo oxidativo que se reflete em uma maior compensação pela glicólise, verificada pelo aumento da liberação de lactato, quando a fosforilação oxidativa é inibida por KCN (Figuras 14 e 15). Estes resultados complementados com todos os resultados obtidos através de análise bioquímica nos levam a concluir que os bioterápicos íntegros alteram a bioquímica celular independente da potência avaliada e que, na maioria dos casos, esta alteração é proporcional à potência e ao tempo de tratamento.

Alguns trabalhos científicos têm registrado a eficácia dos medicamentos homeopáticos frente à células do sistema imunológico (KUCZERA, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2006; DANNINGER *et al.*, 2000). Além disso, resultados experimentais obtidos com o bioterápico de *Tripanossoma cruzi* (ALEIXO *et al.*, 2012; 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 dos bioterápicos, íntegro e inativado, na potência 30DH sobre a produção de citocinas pelos macrófagos da linhagem J774G8 foi avaliado assim como a produção de óxido nítrico pelos macrófagos RAW264-7. Para tanto, os macrófagos J774G8 receberam 6 tratamentos com os bioterápico íntegro 30DH e inativado 30DH, previamente à inoculação do vírus influenza A. Como controle as células foram também tratadas com água 30 DH e água destilada estéril. As citocinas avaliadas, por citometria de fluxo, foram interleucina-10 (IL 10), interleucina-12 (IL 12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e a quimiocina MCP1. Foi observado um aumento na produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) pelos macrófagos J774.G8 sugerindo um efeito do bioterápico íntegro 30DH sobre estes macrófagos, corroborando com resultado semelhante previamente encontrado (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Entretanto, quando avaliadas as demais citocinas presentes nos sobrenadantes antes e após a infecção, nenhuma diferença estatística foi observada. A quimiocina MCP1 é secretada por macrófagos infectados por vírus influenza e tem como função de recrutar

células mononucleares do sangue para o local da infecção (JULKUNEN, 2001; SPRENGER, 1996). Sendo assim, era esperado que os macrófagos produzissem mais desta substância após a infecção pelo vírus influenza; porém, o que foi observado foi uma tendência a diminuir esta substância no sobrenadante dos macrófagos que receberam tratamento com os bioterápicos (Figura 18).

A produção de óxido nítrico (NO) é um indicativo da ativação de macrófagos e alguns estudos mostram o efeito de medicamentos homeopáticos estimulando a produção de NO (MOREIRA *et al.*, 2012; BURBANO *et al.*, 2009; CESAR *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em nossos experimentos, os tratamentos com os diferentes bioterápicos não resultaram num aumento da produção de NO quando comparados ao controle de células (Figura 19). Da mesma forma, não foram detectadas alterações na atividade mitocondrial pelo experimento com MTT (Figura 20). Estes experimentos nos levam a concluir que, nas situações experimentais testadas, os macrófagos não foram estimulados pelos vários tratamentos utilizados, exceto no que diz respeito à resposta detectada pela água dinamizada. Verificamos que os macrófagos RAW 264-7 produziram menores quantidades de nitrito quando estimulados pela água dinamizada (Figura 19). Este dado pode ser atribuído ao chamado “efeito solvente” o qual foi detectado neste trabalho e vem sido relatado por outros autores em experimentos homeopáticos (CAPIEAUX *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2008; AQUINO *et al.*, 2008; VARRICCHIO *et al.*, 2008).

Para complementar os estudos *in vitro*, estudos pré-clínicos foram conduzidos para avaliar tanto o efeito patogênico dos bioterápicos quanto o efeito destes sobre células do sistema imunológico. No primeiro *set* de experimento, foi comparado o bioterápico íntegro com o inativado na mesma potência 30DH, enquanto que no segundo *set* de experimentos, a comparação foi entre as potências 12DH e 30DH do

bioterápico do tipo íntegro, uma vez que este foi o que apresentou melhores resultados no primeiro *set* de experimentos.

O efeito patogenético é tradicionalmente definido como todas as alterações clínicas e laboratoriais que são relatadas por voluntários durante um ensaio patogenético (DANTAS, 1996). No presente trabalho, houve uma tentativa de registrar esses efeitos patogenéticos nos animais, porém sem resultados significativos, quando a avaliação foi feita com a utilização do campo aberto, peso dos animais e peso dos órgãos, levando-se em consideração o primeiro *set* de experimentos. Vale lembrar que os camundongos receberam somente os bioterápicos e não foram desafiados com o vírus influenza, nesta situação, denominada de Protocolo de Patogenesia (P).

O estudo patogenético em animais é tão complexo quanto em humanos uma vez que alguns aspectos são subjetivos, o que, muitas vezes, é mascarado no modelo animal. Além disso, alguns estudos (DANTAS, 2007; COELHO, 2006) mostram a necessidade de se fazer o estudo de 30 a 35 dias e o estudo conduzido foi durante 21 dias, tempo que não deve ter sido suficiente para os animais apresentarem os sintomas patogenéticos. Coelho (2006) relatou a mesma dificuldade em demonstrar os efeitos patogenéticos de preparações homeopáticas de *Dolichos pruriens* em ratos.

No mesmo protocolo de patogenesia, foi conduzido o estudo de histometria do baço, o qual não apresentou diferença estatística entre os grupos, fato este que já era esperado uma vez que este grupo não foi desafiado com o antígeno de influenza.

Quando os animais foram desafiados com o antígeno de influenza (Protocolo Imunidade) e avaliados, pode ser verificado que, novamente, não houve diferença estatística entre os dados obtidos com o estudo do campo aberto; porém, houve uma redução de peso dos animais após receberem o antígeno, especialmente no grupo dos animais que recebeu o bioterápico íntegro 30DH. Este dado pode ser resultado da

infecção viral demonstrada previamente por LIN (2012) em camundongos infectados. Por outro lado, pode ser um reflexo de uma simples redução no consumo de ração; entretanto, não houve diferença estatística relacionada a este fato. Como os melhores resultados para o primeiro *set* de experimentos foi obtido com o grupo de animais que receberam bioterápico íntegro 30DH, o segundo *set* de experimentos foi feito para avaliar as interferências das potências nas respostas dos camundongos, com o mesmo tipo de bioterápico.

Como controle positivo dos experimentos, um grupo recebeu timulina 5CH, medicamento homeopático que já vem sendo estudado e com comprovado efeito sobre o sistema imunológico (BONAMIN, 2013; SATO, 2011). Dados obtidos com a histometria do folículo e do centro germinativo revelaram um aumento do centro germinativo nos animais tratados com timulina, água 30DH e bioterápico íntegro 30DH. O peso do baço também foi maior no grupo que recebeu o bioterápico íntegro 30DH quando comparado aos outros grupos. Além disso, os resultados de imunohistoquímica apresentaram um aumento no número de macrófagos nos baços dos animais tratados com timulina quando comparados ao grupo controle, assim como houve um aumento no número de células T no grupo tratado com o bioterápico íntegro 12DH quando comparado ao grupo controle (Figura 34).

No segundo *set* de experimentos foi utilizado o método de citometria de fluxo para avaliar a resposta imunológica dos camundongos frente aos bioterápicos. A primeira análise foi feita com o objetivo de identificar a população de linfócitos e macrófagos nos diferentes grupos. Os grupos que receberam timulina e bioterápico íntegro 30DH apresentaram proporções semelhantes destes dois tipos celulares, diferente do que foi encontrado nos outros grupos, uma vez que, a população de macrófagos era maior quando comparada a população de linfócitos (Figura 36).

Houve um aumento de células B e não-B (*Natural Killer*) no lavado peritoneal dos camundongos que receberam Timulina 5CH e bioterápico íntegro 30DH quando comparados ao grupo controle. Essas células NK são estimuladas pelas células apresentadoras de antígeno e são responsáveis por matar as células infectadas com vírus enquanto que os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos (ABBAS, 2009).

As células B1 se diferem das células B2 uma vez que esta última participa da resposta adaptativa, enquanto as células B1 são responsáveis pela resposta imune inata e respondem a uma variedade de antígenos T independentes. As células B1 constituem a principal população das cavidades pleural e peritoneal e estão em menor quantidade no baço e ausentes nos linfonodos; as células B2 estão distribuídas pelo organismo, sendo predominantes no sangue, baço e linfonodos. Quando verificadas essas populações, pode-se observar que tanto o grupo tratado com timulina quanto o que recebeu bioterápico íntegro 30DH tiveram uma redução no número de células B2 e um aumento no número de células B1 em relação ao controle (Figura 41).

A atividade imunorregulatória mediada por células T foi observada nos camundongos tratados com os bioterápicos íntegros 12DH e 30DH. Dados obtidos pelo citômetro de fluxo revelaram um aumento nas células CD4+ nos animais tratados com timulina e bioterápico íntegro 30DH. Esta observação nos permite inferir que esses tratamentos podem modular o processo de apresentação de antígeno. A comprovação desta hipótese depende de mais estudos; porém a diferenciação de células B1 em fagócitos já foi anteriormente demonstrada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ALMEIDA *et al.*, 2001; POPI *et al.*, 2008; POPI *et al.*, 2012). Estes fagócitos derivados de B1 são capazes de matar microrganismos ou atuar como células apresentadoras de antígeno

(MOHAN *et al*, 2006), reforçando a hipótese de que o tratamento homeopático é capaz de atuar sobre a resposta imunológica do hospedeiro.

A resposta celular mediada por linfócitos T com participação de fagócitos (resposta imune inata) é uma resposta antiviral típica. As células T podem exercer suas funções através da citotoxicidade mediada por células CD8+ ou por secretar citocinas que ativarão os macrófagos para destruírem os agentes intracelulares (BOT, 1997). Este é um importante parâmetro a ser observado uma vez que a atividade de linfócitos T é amplamente utilizada para medir a eficácia de diferentes tipos de vacinas, em particular a vacina para influenza (ULMER, 1998; RIMMELZWAAN, 1997; BENDER, 1990; TORRES, 1988).

Bender (1990) mediu a atividade de linfócitos T citotóxicos (CTL) em camundongos balb-c infectados com vírus influenza e/ou vacinados com vacinas inativadas. Este estudo mostrou um aumento na eficácia da resposta imunológica associada a um aumento da atividade de CTL quando animais jovens foram vacinados num primeiro momento e revacinados quando adultos. Ulmer (1998) verificou um aumento na resposta linfo-proliferativa Th1 no baço após reestimulação com antígenos virais bem como um aumento na secreção de citocinas.

Embora o presente estudo não tenha se voltado para a avaliação dos efeitos pós-vacinação, verificou-se que o uso do bioterápico preparado a partir do vírus íntegro, bem como de timulina 5CH em camundongos desafiados antigenicamente pode simular esses efeitos, dando substrato experimental para uma discussão sobre a plausibilidade da sua utilização em situações clínicas de interesse epidemiológico.

A terceira fase da tese foi um estudo triplo cego, randomizado, placebo controlado. Este estudo foi o primeiro a avaliar a prevenção e eficácia clínica de dois medicamentos homeopáticos, o bioterápico íntegro 30DH e o IRA, comparados ao

placebo. Como resultado importante salientamos o efeito profilático dos bioterápicos uma vez que o número de sintomas de infecção respiratória aguda e gripe foram menores em voluntários que receberam os medicamentos homeopáticos quando comparados ao grupo placebo (Tabela 8).

O presente estudo indica que a ocorrência de sintomas respiratórios nas crianças que receberam placebo apareceu mais tarde do que nas crianças que receberam os medicamentos homeopáticos. Este resultado sugere que o uso de medicamentos homeopáticos pode ter levado ao aparecimento de sintomas patogênicos, detectados no primeiro mês após a administração dos medicamentos, corroborando com os resultados descritos anteriormente por outros autores (DANTAS, 2007; DOMINICI *et al.*, 2006).

Muitos medicamentos antivirais são normalmente prescritos para o tratamento de gripe e sintomas respiratórios agudos. Jackson e colaboradores (2011) fizeram uma revisão sistemática para avaliação do potencial profilático de antivirais alopáticos em diferentes pacientes. Apesar dos autores registrarem resultados positivos obtidos neste levantamento, eles sugerem a necessidade de estudos posteriores para populações específicas mais susceptíveis como em idosos e crianças (JACKSON *et al.*, 2011). Shun-Shin verificou a existência de um efeito profilático pós-exposição quando inibidores da neuraminidase foram utilizados em pacientes pediátricos. Entretanto, é importante avaliar os riscos e o possível aparecimento de cepas virais resistentes (Shun-Shin *et al.*, 2009). Além disso, alguns estudos indicam que estes medicamentos tradicionais são responsáveis por uma série de efeitos adversos como dores de cabeça, eventos gastrointestinais, náusea, vômitos e outros (PETERS *et al.*, 2001; WELLIVER *et al.*, 2001; HAYDEN *et al.*, 1999). Estes aspectos nos motivaram a investigar o potencial profilático de medicamentos homeopáticos através deste estudo clínico.

O presente estudo indicou que as crianças participantes da pesquisa possuíam características sócio-demográficas e clínicas semelhantes, sugerindo que a randomização foi feita de forma correta (Tabela 6). Além disso, todas as crianças apresentaram um perfil saudável e o número de crianças que abandonaram o estudo foi homogêneo nos três grupos (Figura 44).

A literatura mostra que sintomas isolados de gripe / infecção respiratória aguda são muito comuns em crianças. Este é um fator importante uma vez que estes pacientes ficam suscetíveis à hospitalização, visitas médicas e até mesmo ao uso de antibióticos (IZURIETA *et al.*, 2000; NEUZIL *et al.*, 2000). Estudos mostraram que a gripe na infância tem um grande impacto econômico para as famílias uma vez que aumenta a ausência na escola, leva a ausência dos pais no trabalho e induz o adoecimento entre familiares devido a transmissão da infecção (HURWITZ *et al.*, 2000; NEUZIL *et al.*, 2002; ESPOSITO, 2011).

Petrópolis, a cidade de escolha para este estudo clínico, é uma cidade fria e úmida o que favorece o aparecimento dos sintomas da gripe e infecção respiratória aguda. Além desses aspectos climáticos, as crianças que participaram do estudo pertenciam a famílias de baixo poder aquisitivo e eram todas atendidas pelo sistema público de saúde, adicionando um importante aspecto econômico ao estudo. Apesar de no Brasil não haver um estudo que mostre o custo de uma infecção desta para uma família, Esposito e colaboradores (2011) verificaram, na Itália, que este custo pode chegar a aproximadamente € 132 / dia / criança. Este é um ponto importante a ser considerado devido a realidade econômica das famílias atendidas pelo SUS no Brasil. As soluções homeopáticas testadas neste estudo são economicamente viáveis quando comparadas à terapêutica tradicional usada para a gripe e sintomas respiratórios. Este aspecto aumenta a importância deste estudo clínico, considerando que 10 ml do

medicamento custa aproximadamente R\$ 3,50, o suficiente para o tratamento durante um mês.

No ano anterior a este estudo clínico, o Sistema de Epidemiologia de Influenza (Sivep_Gripe/Brazil) registrou que 9,5% do total de demanda hospitalar foi com a gripe. Destas, 43,3% eram de crianças de 0 – 4 anos; 22,9% de crianças de 5 a 14 anos e 10,9% eram de pessoas de 15 a 24 anos (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_influenza.pdf, acesso em 11/04/2013). Estes dados reforçam a importância do estudo uma vez que há uma grande suscetibilidade das crianças a este tipo de infecção e a necessidade de desenvolver novos medicamentos como a homeopatia, com potencial profilático e ausência de eventos adversos.

A baixa incidência de eventos adversos em homeopatia já foi demonstrada anteriormente (ROSSI *et al.*, 2009; SHAFEI *et al.*, 2012; NAYAK *et al.*, 2012). Neste estudo, os efeitos adversos dos medicamentos foram coletados através de questionário sem *checklist* para não influenciar nas respostas dos responsáveis. Este processo pode ter contribuído para a ausência de relatos sobre os efeitos adversos.

É importante ressaltar que as crianças que usaram os medicamentos homeopáticos apresentaram sintomas um mês após o uso, ou seja, em maio, semelhante ao que é observado nas pessoas que fazem uso de vacina tradicional, sintomas provavelmente, devido à ativação do sistema imunológico. Em contraste, crianças que receberam placebo, apresentaram esses sintomas três meses após iniciado o tratamento, ou seja, aproximadamente em julho, quando a incidência de gripe em Petrópolis é alta devido à chegada do inverno. Outro fato importante é que as crianças que receberam os medicamentos homeopáticos apresentaram, em geral, somente um único episódio de gripe, enquanto que as crianças que receberam placebo tiveram, pelo menos, três

episódios. Estes resultados indicam que os medicamentos testados foram superiores ao placebo, sugerindo um efeito profilático contra a gripe (Tabela 7).

Apesar das dificuldades encontradas durante o estudo, o monitoramento das crianças foi crucial para a análise dos dados. Algumas outras limitações incluem o grande número de pessoas e profissionais envolvidos neste estudo clínico. Estas limitações podem ter contribuído para o número de desistências (25,83%). Estas perdas, entretanto, ficaram distribuídas de forma homogênea entre os grupos, mostrando, novamente, a eficácia no processo de randomização (Figura 44). É importante ressaltar que não houve nenhum caso de morte de crianças participantes do estudo.

A presente tese de doutorado trouxe importantes avanços acerca dos efeitos *in vitro*, pré-clínico e clínico induzidos por bioterápicos, do tipo nosódio vivo e inativado, de influenza A em diferentes potências, 12DH e 30DH. Novos estudos utilizando outros medicamentos homeopáticos devem ser estimulados a fim de avaliar o potencial terapêutico homeopático.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta tese nos permitiram concluir que:

- O bioterápico de origem viral (H3N2) pode ser manipulado em água mantendo, assim, a integridade viral;
- O uso de solução hidroalcoólica 70% como solvente do bioterápico H3N2 lisa completamente as partículas virais a partir da primeira diluição (1DH);
- As modificações celulares e bioquímicas induzidas *in vitro* pelos bioterápicos de vírus influenza variam em função do tipo de bioterápico (íntegro ou inativado) assim como do protocolo de tratamento utilizado;
- Os bioterápicos íntegros (12DH e 30DH) promovem um aumento da capacidade respiratória máxima das células MDCK, sem modificar a respiração basal e o consumo de oxigênio não mitocondrial;
- Os bioterápicos íntegros (12DH e 30DH) aumentam a atividade da enzima citrato sintase e a hidrólise de ATP das células MDCK, provavelmente devido a um aumento da biogênese mitocondrial;
- O bioterápico íntegro 30DH induz alterações bioquímicas típicas da infecção viral em células MDCK;
- O tratamento com os bioterápicos íntegro e inativado (30DH) não foi capaz de alterar a liberação de óxido nítrico de macrófagos RAW 264-7;
- O tratamento com o bioterápico íntegro (30DH) induziu maior liberação de citocina TNF- α no sobrenadante de macrófagos J774G8;
- Os bioterápicos íntegro e inativado (30DH) não induziram resposta patogénica nos camundongos Balb-c após 21 dias de tratamento;

- O pré-tratamento por 21 dias com o bioterápico íntegro (30DH) seguido da inoculação do antígeno de influenza A, induziram alterações morfológicas no baço dos camundongos Balb-c, acrescidas de significativas modificações das células envolvidas com a resposta imunológica dos animais tratados;
- Os bioterápicos íntegro 30DH e IRA apresentaram efeito profilático significativo em relação ao placebo contra os sintomas da gripe e da infecção respiratória aguda quando crianças de 1 a 5 anos de idade foram avaliadas.

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.

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AKIRA, S., TAKEDA, K., KAISHO, T, Toll like receptors: critical proteins linking innate and acquire immunity. **Nat. Immunol.** v. 2, p. 675 – 680, 2001.

ALEIXO, D. L. ; FERRAZ, F. N.; FERREIRA, E.C., *et al.*, Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. **BMC Research Notes**, v. 5, p. 352-367, 2012.

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, S. R.; AROREIRA, L. S.; FRYMULLER, E.; *et al.*, Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **International Immunology**. v. 13, p. 1193-1201, 2001.

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 glycolitic 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.

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.

BASTIDE, M., LAGACHE A. Communication process: a new paradigm applied to high-dilution effects on the living body. **Alther Ther Health Med.**; v.3(4), p. 35-9. 1997.

BENDER B. S. Enhancement of anti-influenza cytotoxic t-lymphocyte activity in senescent mice by vaccination early in life. **Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.** v.55, p. 1-7, 1990.

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.

BONAMIN, L. V., SATO, C. , ZALLA NETO, R., *et al.*, Immunomodulation of Homeopathic Thymulin 5CH in a BCG-induced granuloma model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2013, p. ID 686018, 2013.

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

BOT. A. Induction of humoral and cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. **International Immunology**. 9(11), p. 1641-1650, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**. 3 ed., 2011
Disponível em
<<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15457&word>>, acesso em
10/04/13

_____. 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/ResumoExecutivoMedNatPratCompl1402052.pdf>>. Acesso em 10/04/13.

_____. 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 1977. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15457&word=>. Acesso em: março de 2013.

_____. 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 2013.

_____. RESOLUÇÃO - RDC Nº 52, DE 28 DE SETEMBRO DE 2012. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0052_28_09_2012.html, a-
cesso em 10/04/2013.

_____. Histórico atual sobre influenza. Disponível em
:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_influenza.pdf,
acesso em 11/04/2013

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

BURBANO, R.R., LEAL, M.F., COSTA, J.B. *et al.*, Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. **Homeopathy**, v. 98, p. 45-48, 2009.

CAPIEAUX, E., ALSALEH, G., BORDE, C. et al., Evaluation of biological activities of highly diluted nucleotide sequences by using cellular models. **Int J High Dilution Res.**, v.11, p. 194-195, 2012

CASTRO, D. *et al.* Uso do nosódio meningococcinum como preventivo contra a meningite meningocócica. **Simília**, 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.

CESAR, B., ABUD, A.R, de OLIVEIRA, C.C, *et al.* Treatment with at homeopathic complex medication modulates mononuclear bone marrow cell differentiation. **Evidenced Complementary Alternative Medicine**, 2011: 212459. 2011.

COELHO C.P. Therapeutic and pathogenetic animal models for *Dolichos pruriens*. **Homeopathy**, v.95, p.136-143, 2006.

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

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: 10/04/2013.

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.

COUCEIRO, J.N.S.S. *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.

DANTAS F. How can we get more reliable information from homeopathic pathogenetic trials?. **British Homeopathic Journal**, 85, P.230-236, 1996.

DANTAS, F., FISHER, P., WALACH, H, et al., “A systematic review of the quality of homeopathic pathogenetic trials published from 1945 to 1995”, **Homeopathy**, v. 96, p. 4-16, 2007.

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.

DAWOOD, F.S., IULIANO, A.D., REED, C. *et al.* Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*, v.12. p. 687-95, 2012.

DOMINGUES, C.M.A.S., OLIVEIRA, W.K. Uptake of pandemic influenza (H1N1)-2009 vaccines in Brazil, 2010. **Vaccine**, v.30, p.4744-4751, 2012.

DOMINICI, G. BELLAVITE, P., DI STANISLAO, *et al.*, “Double-blind, placebo-controlled homeopathic pathogenetic trials: Symptom collection and analysis”, **Homeopathy**, v. 95, p. 123-130, 2006.

EL-BACHA, T., MIDDLEJ, V., PERERIRA-DA-SILVA, A.P. *et al.*, Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p.1158–1166, 2007.

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

ESPOSITO, S., PRINCIPI, N., Different influenza vaccine formulations and adjuvants for childhood influenza Vaccination, **Vaccine**, v. 29, p. 7535–7541, 2011.

FERRAZ, F.N., SIMONI, G.K., NASCIMENTO, A. *et al.*, Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy**, v. 100, p. 237-243, 2011.

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

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

GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respiration Physiology**, v. 128 (3), p. 277-297, 2011.

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

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

HANCIOGLU, B., SWIGON, D., CLERMONT, G. A dynamical model of human immune response to influenza A virus infection. **Journal of Theoretical Biology**. v.246, p.70-86, 2007.

HAYDEN, F.G., ATMAR, R.L., SCHILILING, M., *et al.*, Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza, **New England Journal of Medicine**, v.341(18), p.1336-43, 1999.

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

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

HURWITZ, E.S., HABER, M., CHANG, A., *et al.*, Studies of the 1996–97 inactivated influenza vaccine among children attending day care, **Journal of Infection Disease**, v. 182, p.1218–21, 2000.

IZURIETA, H.S., THOMPSON, W.W., KRAMARZ, P., *et al.*, Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children, **New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 232–9, 2000.

JACKSON, R. J., COOPER, P. TAPPENDEN, *et al.* “Oseltamivir, zanamivir and amantadina in the prevention of influenza: A systematic review”, **Journal of Infection**, v. 62, p. 14-25, 2011.

JOHANSSON, B.E., BUCHER, D.J., KILBOURME, E.D. Purified influenza virus hemmagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. **J. virol.** v.63, p.1239-1246, 1989.

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

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.

KUCZERA, D. Avaliação da ação antitumoral do complexo natural altamente diluído M1 em células de melanoma humano 1205LU. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2013.

KUZNETSOV, A.V.; LASSNIG, B., GNAIGER, E. Laboratory Protocol Citrate Synthase Mitochondrial Marker Enzyme. **Mitochondrial Physiology Network** 08.14: 1-0, 2010.

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.

LIN Y. Genetic and pathobiologic characterization of H3N2 canine influenza viruses isolated in the Jiangsu Province of China in 2009–2010. **Veterinary Microbiology**, v.158, p.247-258, 2012.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**.v.193(1) p.265-75, 1951.

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.

MERLO-PICH, M., DELEONARDI, G., BIONDI, A. and LENA Z, G. Methods to detect mitochondrial function. **Exper. Gerontol**. v. 39, p.277–281, 2004.

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

MICHAELIS, M, DOERR, H.W., CINATL, J. Jr. Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door. **Med Microbiol Immunol.**, v. 198(3):175-83, 2009.

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.

MOHAN, C.; MOREL, L.; YANG, P. WAKELAND, E. K. Accumulation of splenic B-1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice. **Arthritis Rheum.**, v. 41(9). p. 1652-1662, 2006.

MOREIRA, C.O.C., COSTA, J.F.F.B., LEAL, M.F. *et al.*, Lymphocyte proliferation stimulated by activated *Cebus apella* macrophages treated with a complex homeopathic immune response modifiers. **Homeopathy**, v.101 (1), P. 74-79, 2012.

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.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. **Guillain-Barré Syndrome Information**. Disponível em: <<http://www.ninds.nih.gov/disorders/gbs/gbs.htm>>. Acesso em: abril de 2013.

NATIONAL REYE'S SYNDROME FOUNDATION. **Reye's Syndrome**. Disponível em : < <http://www.reyessyndrome.org>>. Acesso em: abril de 2013.

NAYAK, C., SINGH, V., OBERAI, P., *et al.*, Homeopathy in chronic sinusitis: a prospective multi-centric observational study, **Homeopathy**, v. 101, p. 84-91, 2012.

NEUZIL, K.M., MELLEN, B.G., WRIGHT, P.F., *et al.*, The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children, **New England Journal of Medicine**, v. 342, p.225–31, 2000.

OLIVEIRA, S.M., OLIVEIRA, C.C., ABUD, A.P.R. *et al.*, Mercurius solubilis: actions on macrophages. **Homeopathy**, v. 100, p. 228-236, 2011.

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: abril de 2013.

_____. **Avian influenza**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>,>. Acesso em: abril de 2013.

_____. Influenza na China. Disponível em:
http://www.who.int/csr/don/2013_04_09/en/index.html, acesso em 27/04/2013).

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

PEREIRA-DA-SILVA, A.P., EL-BACHA, T, KYAN, N. *et al.*, Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. **Biochemical Journal**. v. 417, p. 717-26, 2009.

PERKER, J., COULAMY, A. Enquête sur les habitudes de prescription des médecins homéopathes au sujet d'un 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.

PETERS, P.H.,GRAVENSTEIN, S., NORWOOD,P., *et al.* Long-term use of oseltamivir for the prophylaxis of influenza in a vaccinated frail older population, **Journal of American Geriatric Society**, v. 49(8), p.1025-31, 2001.

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.

POPI, A.; ZAMBONI, D. S.; MORTARA, R. A.; MARIANO, M. Microbicidal property of B1 cell derived mononuclear phagocyte. **Immunobiology**, v. 214, p. 664-673, 2008.

POPI, A. F.; OSUGUI, L.; PEREZ, K. R.; LONGO-MAUGÉRI., MARIANO, M. Could a B-1 cell derived phagocyte “be one” of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? **Plos One**, v. 7, 11 p, 2012.

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

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.

RASMUSSEN, R.A., KISSIN, D.M., YEHUNG, L.F. *et al.*, Preparing for influenza after 2009 H1N1: special considerations for pregnant women and newborns. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. June, p. S13-S20, 2011.

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.

RIMMELZWAAN G. F. Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: comparison of conventional and iscom vaccines. **Journal of General Virology**, v.78, p. 757-765, 1997.

RITTER, J.B.; WAHL, A.S.; FREUND, S. *et al.* Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling. **BM C System Biology**, v.4, p.61, 2010.

ROSSI, E., ENDRIZZI, C., PANOZZO, M.A., *et al.*, Homeopathy in the public health system: a seven-year observational study at Lucca Hospital (Italy), **Homeopathy**, v. 98, p.142–148, 2009.

SATO, C., V.G. LISTAR, AND L.V. BONAMIN, Development of broiler chickens after treatment with thymulin 5cH: a zoo technical approach. **Homeopathy**, 2012. **101**(1): p. 68-73.

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.

SHAFEI, H.F., ABDELDAYEN, S.M., MOHAMED, N.H. Mohamed, Individualized homeopathy in a group of Egyptian asthmatic children, **Homeopathy**, v. 101, p. 224-230, 2012.

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 Homaopática**, v. 4(13), p. 43-47, 2005.

SIQUEIRA, C.M., COSTA, B., AMORIM, A.M. *et al.* H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines. **Homeopathy**, v. 102, p. 31-40, 2013.

SIQUEIRA, C.M. 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.

SPRENGER, H., MEYER, R.G., KAUFMANN, A *et al.*, Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. **J. Exp. Med.** v.184, p. 1191-1196, 1996.

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

TAMURA, S., KURATA, T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. **J. Infect. Dis**, v. 57, p. 236-247, 2004.

TAMURA, S., TANIMOTO, T., KURATA, T. Mechanisms of broad cross protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. **Jpn. J. Infect. Dis.** v. 58, p.195-207, 2005.

TSCHERNE, D.M., GARCIA-SASTRE, A. Virulence determinants of pandemic influenza viruses. **The Journal of Clinical Investigation.** V.121, p.6-13, 2011.

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

ULMER J. B. Protective CD4+ and CD8+T Cells against Influenza Virus Induced by Vaccination with Nucleoprotein DNA. **Journal of virology.** v.72(7), p 5648-5653, 1998.

TORRES J. V. Cytotoxic T lymphocyte recognition sites on influenza virus hemagglutinin. **Immunology Letters/Elsevier Science Publishers.** v.19, p. 49-54, 1988.

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.

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

WELLIVER, R., MONTO, A.S., CAREWICZ, O., *et al.* Effectiveness of oseltamivir in preventing influenza in household contacts: a randomized controlled trial, **Journal of the American Medical Association**, v. 285(6), p. 748-754, 2001.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Prezada Professora Carla Horlandino Quaresma

A Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: “**Avaliação in vivo dos efeitos sobre a reposta imune de um bioterápico para influenza**”, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência **DFBCICB 037**.

Atenciosamente;


Marcelo M. Morales
Presidente CEUA

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Prezada Professora Carla Horlandino Quaresma

A Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: “**Avaliação in vivo dos efeitos sobre a reposta imune de um bioterápico para influenza**”, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência **DFBCICB 040**.

Atenciosamente;


Marcelo M. Morales
Presidente CEUA

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO - nº 730/10

Rio de Janeiro, 16 de setembro de 2010.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dr. Carlos José Hoelz Magalhães Lyrio

Assunto: Parecer sobre Relatório Anual referente ao período de Jun/2009 à Jun/2010.

Referência: Projeto nº 194/08 – CEP

Título: “Estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado para avaliação da eficácia clínica de bioterápicos na prevenção da gripe e de infecções respiratórias agudas.”

Sr.(a) Pesquisador(a),

Informo a V. S.a., que em reunião deste CEP realizada em 09/09/2010, foi apreciado e considerado “**APROVADO**”, o parecer sobre Relatório Anual referente ao período de Jun/2009 à Jun/2010, referente ao Projeto de Pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof.^a. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado para avaliação da eficácia clínica de bioterápicos na prevenção da gripe e de infecções respiratórias agudas.

Essas informações lhe estão sendo fornecidas para convidar seu(ua) filho(a) a participar voluntariamente neste estudo que visa verificar a eficácia clínica de bioterápicos para a prevenção da gripe e de infecções respiratórias agudas em crianças.

PROCEDIMENTOS: Neste estudo clínico serão selecionados seiscentos indivíduos todos cadastrados no Instituto Roberto Costa e pertencentes ao Programa de Saúde da Família, da cidade de Petrópolis, RJ (PSF/Petrópolis). A seleção e a distribuição dos indivíduos participantes desta pesquisa serão feitas ao acaso, sendo esses indivíduos divididos em três grupos, onde cada grupo de 200 crianças com idade compreendida entre 1 e 5 anos, receberá 1 gota por idade, 1 vez ao dia, das seguintes soluções: Solução placebo; Bioterápico IRA 30DH; Bioterápico INFLUENZINUM RC 30DH. Os participantes e seus respectivos responsáveis serão acompanhados por Agentes de Saúde do PSF/Petrópolis durante toda a pesquisa. Entretanto, como o estudo será do tipo duplo-cego, com o objetivo de se excluir qualquer influência pessoal sobre os resultados da pesquisa, somente o Pesquisador Responsável terá acesso à composição de cada um dos grupos envolvidos na pesquisa. As soluções serão identificadas como soluções A, B, C e nem as famílias dos indivíduos e nem os Agentes do PSF saberão que soluções estarão sendo dadas. A administração das soluções será feita uma vez ao dia, durante 30 dias, somente no mês de março de 2009. Os responsáveis pelas crianças serão previamente entrevistados e estes dados, devidamente catalogados, estarão sob a guarda sigilosa do Dr. Carlos Lyrio, Médico Homeopata e Pesquisador Responsável, e o próprio dará todas as orientações necessárias aos responsáveis das crianças tirando todas as dúvidas que porventura existirem, antes, durante e ao final da pesquisa. As soluções serão fornecidas gratuitamente não havendo nenhum tipo de despesa aos participantes. Os indivíduos serão orientados quanto ao uso destas soluções, que deverão ser previamente diluídas em uma colher de sopa de água filtrada. As famílias envolvidas com a pesquisa serão acompanhadas por Agentes do Programa de Saúde de Petrópolis assim como por médicos envolvidos com a pesquisa, durante o mês de março para orientação e acompanhamento do uso das soluções. Este acompanhamento será estendido por mais 11 meses, uma vez que a pesquisa será conduzida por 12 meses.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não haverá nenhum tipo de desconforto ou risco, não havendo, portanto, nenhum dano pessoal decorrentes dos procedimentos descritos acima.

BENEFÍCIOS: Caso os resultados obtidos nesta pesquisa indiquem que estes medicamentos homeopáticos são benéficos a prevenção da gripe e de infecções respiratórias agudas em crianças, os mesmos passarão a ser distribuídos de maneira gratuita, a todas as crianças, com faixa etária entre 1 e 5 anos, do município de Petrópolis.

USO DO PLACEBO: neste estudo faremos uso de placebo que será uma solução de álcool a 30% que é o veículo dos bioterápicos. Atualmente, não existe nenhum tipo de medicamento disponível no Sistema Único de Saúde para a prevenção de doenças, como gripe e infecções respiratórias agudas em crianças. Desta forma, os indivíduos que receberão o placebo, não teriam outra opção terapêutica profilática a ser utilizada para essas doenças específicas. Além disso, se houver o aparecimento de sintomas relacionados à gripe ou as infecções respiratórias nos

indivíduos que estiverem fazendo uso do placebo, os mesmos receberão imediatamente tratamento adequado para o tratamento destas doenças. Este tratamento será disponibilizado pelo ambulatório do Instituto Roberto Costa que possui infra-estrutura assim como estoque de medicamentos específicos para ambos os problemas relacionados acima.

LIBERDADE PARA SE RECUSAR A PARTICIPAR OU RETIRAR SEU CONSENTIMENTO: Caso seu(ua) filho(a) ou você como responsável queira recusar-se a participar da pesquisa ou desistir de colaborar em qualquer momento, poderá fazê-lo sem que isso venha causar qualquer tipo de problema ou afetar o atendimento que recebe atualmente no Instituto Roberto Costa e/ou no Programa da Saúde da Família de Petrópolis.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Os resultados da avaliação do prontuário e do questionário do seu(ua) filho(a), serão competência apenas do pesquisador responsável pelo projeto, Dr. Carlos Lyrio. Não será permitido acesso a terceiros, sendo garantida proteção contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização do(a) seu(ua) filho(a). As informações que fornecerá serão completamente sigilosas e nenhum dos participantes será identificado quando os resultados do trabalho forem apresentados. Centenas de pessoas estarão também participando da pesquisa e seus dados serão combinados com as dos outros participantes, sendo analisados pela equipe envolvida com o projeto, que está comprometida em utilizar os dados coletados neste estudo somente para esta pesquisa.

DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO: É seu direito manter-se atualizado sobre o andamento desta pesquisa e ao final de 12 meses, estes resultados estarão sendo publicados. Você na qualidade de responsável legal do indivíduo envolvido em um dos grupos de estudos terá livre acesso aos dados obtidos.

INDENIZAÇÃO, RESSARCIMENTO DE DESPESAS E COMPENSAÇÕES: A participação do seu (a) filho(a) é completamente voluntária e não haverá nenhum tipo de indenização, ressarcimento de despesas e compensações no decorrer desta pesquisa. O Instituto Roberto Costa estará sempre disponível a atender o seu(a) filho(a) durante toda o período da pesquisa.

COMPROMISSO DO PESQUISADOR: o pesquisador responsável, assim como toda a sua equipe, selecionada para a execução deste trabalho, garantem que os dados obtidos apenas serão utilizados para fins de pesquisa, não havendo nenhum outro tipo de uso dos dados que serão coletados.

GARANTIA DE ACESSO: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis por esta pesquisa, nos endereços e telefones abaixo:

Dr. Carlos Jose Hoelz Magalhaes Lyrio

Endereço profissional INSTITUTO ROBERTO COSTA, Departamento Acadêmico. Rua Alfredo Pachá,100, Centro. 25685-210 – Petrópolis, RJ. Telefones: (24) 22468836 Fax: (24) 22468837. Cel: 24 9903-9501. Endereço eletrônico carloslyrio@robertocosta.org.br

Dr. Haroldo José de Matos

Endereço profissional Universidade Estácio de Sá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua do Raichuelo, 43, Centro. 20560-001 - Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (21) 25876478. Cel: 21 8755-9124. Endereço eletrônico: hmatos@uerj.br

Dr. Carla Holandino Quaresma

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco B, sub-solo, sala 011. Faculdade de Farmácia, UFRJ. CEP: 21941-902. Telefones: (21) 2280-1784, R: 255. Cel:

(21) 99084370. Endereço Residencial: Rua Desembargador Isidro, 155 apto. 402, Tijuca. Tel: (21) 2238-8043. CEP: 20521-160. Endereço eletrônico: cholandino@yahoo.com

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – sala 01 D – 46 – primeiro andar, telefone: (21) 2562-2480 – email: ccp@hucff.ufrj.br

TERMO DE CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o Dr. _____ sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, e a ausência de desconfortos ou riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta Instituição.

Nome do Paciente

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo paciente

Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador

Em caso de responsável analfabeto, semi-analfabeto ou portador de deficiência auditiva ou visual:

Data ____/____/____

Assinatura do representante legal