
UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITOS DA TIMULINA 5cH NA LESÃO GRANULOMATOSA
INDUZIDA POR BCG: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS B-1**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Medicina Veterinária da
Universidade Paulista – UNIP, para obtenção
do título de mestre em Imunopatologia
Veterinária, sob orientação da Profa. Dra.
Leoni Villano Bonamin**

Cesar Sato

**São Paulo
2011**

Aos meus pais, que sempre me apoiaram na decisão de retomar os estudos depois de tanto tempo, pela educação e formação que me proporcionaram com tanto suor e sacrifício, pelo exemplo de retidão e caráter nos rumos a serem tomados na vida.

À Marisa, minha companheira, parceira, conselheira e sobretudo amiga nas horas de alegria e de tristeza.

À minha filha Fernanda, razão da minha vida e de todo o meu esforço.

À Leoni, minha professora, orientadora, amiga.....

Nunca se esqueçam

Amo vocês demais

Agradecimentos

Um agradecimento especial à minha orientadora Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin. Nossa parceria foi bem sucedida Leoni, porque nela existem alguns componentes fundamentais: cumplicidade, respeito mútuo, trabalho árduo, mas principalmente confiança. Esta é a palavra chave. Muitas vezes me senti “atirado aos leões” por você. Agora entendo perfeitamente o que você fazia e ainda faz por mim –“vai lá naquele congresso no meu lugar dar tal palestra”-, ou –“escreve o capítulo deste livro”- ou –“ a próxima palestra é em inglês, você monta?”- ou ainda – “aceite o cargo de diretor de estudos, mesmo sem ter experiência... você pode... você consegue”. O que é isso senão confiança na minha capacidade? Pode ter certeza de que é recíproco!!! Hoje vejo que tudo isso fazia parte da sua orientação neste mestrado, me preparando profissional e academicamente para os futuros desafios que tenho pela frente... Por onde você passa Leoni, não deixa somente alunos bem preparados. Você deixa fãs e como já disse uma vez, sou o presidente do seu fã clube.... seus outros alunos que dividam a diretoria!!!

Aos professores da pós graduação, com quem muito aprendi. Um agradecimento especial à Profa. Dra. Ana Flávia Popi, minha coorientadora, por sua colaboração imprescindível neste trabalho e à Profa. Dra. Selene Dall' Acqua por sua constante atenção e incentivo ainda que pelo Facebook.

Aos meus colegas de pós graduação, principalmente à Andréia Joaquim, pela amizade, incentivo, carinho e pelos seus cativantes papos “furados” na hora do almoço.

Aos funcionários do laboratório, Cleide, Suzana e Wilton, sempre prontos para me ajudar em qualquer tarefa. Um agradecimento especial à Michelle pela ajuda nos experimentos com os camundongos e ao Paulo pela sempre eficiente confecção das lâminas. À Lika, minha “lavadora” oficial de peritôneos e sua ajuda com a burocracia FAPESP.

Aos amigos do Instituto Royal, Aline, Simone, Rafa, Márcia, Yudi, Claudemir, Marcelo, Grazi, Simone Jesus e Renato por terem me acolhido de forma tão legal. É muito bom fazer parte dessa família. Um agradecimento especial à Carol, minha companheira de trabalho, professora, instrutora, com quem aprendi e aprendo muito até hoje. Como você sempre diz Carol –“É nós!!!”.

Aos meus queridos pais, pelo apoio incondicional e irrestrito em todas as difíceis decisões que tive de tomar para chegar até aqui.

À minha esposa Marisa, por ter me agüentado todos esses anos desde a graduação até agora... só nós mesmos para saber o quão árduo foi este caminho...te amo!!!

À minha amada filha Fernanda, que chegou para dar um novo significado à minha vida.... você é tudo para mim!!!

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Lista de figuras

FIGURA 1: ESCORES DE INFECÇÃO INTRACELULAR EM MACRÓFAGOS	19
FIGURA 2: FOTOMICROGRAFIA DE BAÇO COM MACRÓFAGOS PIGMENTADOS.....	19
FIGURA 3: FOTOMICROGRAFIA DE BAÇO E SEUS FOLÍCULOS LINFOIDES.....	19
FIGURA 4: RELAÇÃO MACRÓFAGO/LINFÓCITO AOS 21 DIAS	24
FIGURA 5: RELAÇÃO B-1 CDP/MONÓCITO CDP AOS 21 DIAS	25
FIGURA 6: RELAÇÃO B-1/OUTROS LINFÓCITOS AOS 21 DIAS	26
FIGURA 7: RELAÇÃO B-1a/B-1b AOS 21 DIAS	29
FIGURA 8: MEDIDA DA ÁREA FOLICULAR ESPLÊNICA.....	30
FIGURA 9: CONTAGEM DE MACRÓFAGOS PIGMENTADOS NO BAÇO.....	30
FIGURA 10: AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA EVOLUÇÃO GRANULOMATOSA.....	31
FIGURA 11: ESCORES DE INFECÇÃO POR BCG INTRACITOPLASMÁTICO.....	31

Lista de Quadros

QUADRO 1: DIFERENÇAS ENTRE CÉLULAS B-1a E B-1b.....	13
QUADRO 2: DIFERENÇAS ENTRE CÉLULAS B-1 E B-2	13
QUADRO 3: ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE Zn NAS SOLUÇÕES EXPERIMENTAIS	32
QUADRO 4: pH DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NOS TRATAMENTOS	33
QUADRO 5: ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE Ca, Mg e Mn.....	33

Lista de Abreviaturas

µl: microlitro
a.C: antes de Cristo
ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
Ala: Alanina
APC: Allophycocyanin
Asn: Asparagina
BCG: bacilo de Calmette Guérin
Bcl-2: gene B-cell lymphoma 2
C57BL/6: linhagem de camundongos C57 Black/6
Ca: cálcio
CD: cluster of differentiation
CDP: cell derived phagocytes
CEDEME: Centro de Desenvolvimento para Modelos Experimentais
cH: centesimal Hanemaniana
CO2: gás carbônico
DNA: ácido desoxi ribonucléico
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
Fc: Fragment crystallizable
FITC: Fluorescein isothiocyanate
Gln: Glutamina
Glp: Glucagon lyke peptide
Gly: Glicina
gp43: glicoproteína 43
H2O2: peróxido de hidrogênio
HE: Hematoxilina-Eosina
His: Histidina
IgE: imunoglobulina E
IgG: Imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
IL-1: interleucina 1
IL-6: interleucina 6
L: litro
Leu: Leucina
LH: hormônio Luteinizante
LPS: lipopolisacaride
Lys: Lisina
metFTS: methionine Thymic serum factor
Mg: magnésio
mg: miligrama
mL: mililitro

Mn: manganês

mol: molar

NGF: nerve growth factor

NH₂: radical metil

NK: natural killer

NZB: linhagem de camundongos New Zeland Black

OH: radical hidroxil

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Phosphate Buffered Saline

PE: Phycoeritrin

PerCP: Peridinin Chlorophyl Protein

PGE₂: Prostaglandina E₂

pH: concentração de íons Hidronium(H₃O⁺)

PMN: polimorfonuclear

RPM: rotações por minuto

RPMI: *Royal Park Memorial Institute* (meio de cultura RPMI-1640)

Ser: Serina

SPF: Specific pathogen free

SUS: Sistema Único de Saúde

Th1: T helper cells 1

Th2: T helper cells 2

TNF: tumor necrosis factor

Trp: Triptofano

UFC: unidade formadora de colônia

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

UNIP: Universidade Paulista

X: vezes

X²: Qui quadrado

Zn: Zinco

Resumo

Em estudos anteriores, constatou-se que a timulina (hormônio tímico), quando preparada homeopaticamente na potência 5cH, tem a propriedade de melhorar a performance produtiva em um galpão de frangos de corte infectados por reovírus, e modular o desenvolvimento do tumor de Ehrlich e de lesões inflamatórias granulomatosas em camundongos, por meio de mecanismos imunomediados. O presente trabalho teve como finalidade estudar amiúde os mecanismos imunomoduladores da timulina 5cH no modelo experimental granulomatoso induzido por BCG em camundongos, com especial enfoque para células B-1 e para a participação do zinco no processo imunomodulatório. Para isso, três grupos de camundongos Balb/c, SPF, machos (grupo A tratado com Timulina 5cH, grupo B tratado com Timulina 5cH + Chelex e grupo C controle tratados com o veículo) foram inoculados com BCG no coxim plantar esquerdo, e tanto o granuloma subcutâneo quanto o baço foram colhidos para avaliação histomorfométrica dos macrófagos presentes, por meio de fixação, inclusão em parafina e coloração por HE, Azul da Prússia e Ziehl-Neelsen. A citometria de fluxo foi utilizada para caracterizar e quantificar as células presentes no peritônio do camundongo. Nesse caso, foi feita a quantificação de células positivas para CD11b (fagócitos ativados, células B-1), CD19 (células B-1 e B-2), CD23 (negativo nas células B-1, positivo nas células B2) e CD5 (células B-1a), presentes no lavado peritoneal. A análise estatística foi feita utilizando o teste de Kruskal – Wallis/Dunn para avaliações não paramétricas, e o teste Anova/Tuckey-Kramer para as paramétricas. O método do X^2 foi utilizado para avaliação da contagem celular em citometria de fluxo. Os valores de $p=0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados mostraram que a timulina 5cH induziu aumento do edema na lesão 7 e 21 dias após a inoculação do BCG e aumento da área folicular do baço. A citometria demonstra progressivo aumento de células derivadas de monócitos e diminuição de fagócitos derivados de B-1 na cavidade peritoneal em função do tempo; entretanto, camundongos tratados com timulina 5cH apresentam clara persistência de fagócitos derivados de B-1 no peritônio aos 21 dias. Ao mesmo tempo, o escore de macrófagos infectados no granuloma diminui significativamente, indicando remissão da infecção. Dessa forma, conclui-se que a timulina 5cH modula o processo granulomatoso induzido por BCG, por meio de mecanismos imunopatológicos relacionados com a diferenciação de células B-1 em fagócitos na cavidade peritoneal do camundongo. O tratamento da amostra com Chelex permite descartar a hipótese de efeito inespecífico da Timulina 5cH por contaminação de Zn em concentrações imunomoduladoras.

Palavras Chave: Timulina 5cH, granuloma, células B-1.

Abstract

In previous studies, we found that thymulin (a thymic hormone), when prepared in homeopathic 5cH, has the property to improve the productive performance of broiler chickens infected with reovirus, as well as modulate the development of Ehrlich tumor and granulomatous inflammatory lesions in mice by immune-mediated mechanisms. The aim of the present work was to study the immunomodulatory mechanisms of thymulin 5cH in granulomatous experimental model induced by BCG in mice, with special focus on B-1 cells and the involvement of zinc in immune-modulatory process. Three groups of male BALB / C, SPF mice, (group A treated with thymulin 5CH, group B treated with Chelex+ thymulin 5ch + and group C control treated with vehicle) were inoculated with BCG in the left footpad and both, subcutaneous granuloma and spleen were harvested for histomorphometry of present macrophages, by fixation, paraffin embedding and staining with HE, Methylen blue and Ziehl-Neelsen. Flow cytometry was used to characterize and quantify cells in the mice peritoneum. In this case, the quantification of positive cells for CD11 (activated phagocytes, B-1 cells), CD19 (B-1 and B-2 cells), CD23 (negative B-1 cells, positive B2 cells) and CD5 (B-1a cells), present in the peritoneal cavity. Statistical analysis was performed using Kruskal - Wallis / Dunn for nonparametric evaluations and ANOVA / Tuckey-Krammer for the parametric ones. The X^2 method was used to evaluate the cell count in flow cytometry. P-values = 0.05 were considered statistically significant. The results showed that thymulin 5cH induced increased edema lesion 7 and 21 days after inoculation with BCG and also increased the spleen follicular area. Cytometry demonstrated a progressive increase in cells derived from monocytes and decreased phagocytes derived from B-1 in peritoneal cavity in function of time, but mice treated with thymulin 5cH have a clear persistence of phagocytes derived from B-1 in the peritoneum at day 21. In the same time, the score of granuloma macrophages decreases significantly, indicating remission of infection. Thus, we conclude that thymulin 5CH modulates the BCG-induced granulomatous process, through immunopathological mechanisms related to differentiation of B-1 cells in phagocytes in the peritoneal cavity of mice. The Chelex treatment sample permit reject the hypothesis of unspecific contamination of Zn effect in Thymulin 5cH, under immunomodulatory concentrations.

Key Words: Thymulin 5cH, granuloma, B-1 cells.

Sumário

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE QUADROS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	5
2.1. HOMEOPATIA	5
2.1.1. PRINCÍPIO DA CURA PELA SIMILITUDE	5
2.1.2. EXPERIMENTAÇÃO NO HOMEM SÃO	6
2.1.3. MEDICAMENTO DINAMIZADO	6
2.1.4. NOVAS PERSPECTIVAS	7
2.2. TIMULINA	8
2.3. INFLAMAÇÃO GRANULOMATOSA.....	11
2.4. CÉLULAS B-1.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. OBJETIVO GERAL.....	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 ANIMAIS	16
4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E PREPARO DO MEDICAMENTO.....	16
4.3. TRATAMENTO.....	17
4.4. INOCULAÇÃO DO BCG E OBSERVAÇÃO DAS LESÕES.....	17
4.5. AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA CÉLULA B-1.....	20
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4.7. BIOÉTICA E CONFLITO DE INTERESSES.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1. RELAÇÃO MACRÓFAGOS/LINFÓCITOS NO PERITÔNIO	22
5.2.RELAÇÃO MACRÓFAGO DERIVADO DE MONÓCITO/FAGÓCITO DERIVADO DE B1 NO PERITÔNIO.....	22
5.3. RELAÇÃO B1/OUTROS LINFÓCITOS NO PERITÔNIO	22
5.4. RELAÇÃO B1-a/B1-b NO PERITÔNIO	27
5.5. DIÂMETRO FOLICULAR ESPLÊNICO	27
5.6. HEMOSIDEROSE ESPLÊNICA	27
5.7. ESPESSURA DA PATA	27
5.8. ESCORES DE INFECÇÃO POR BCG INTRACITOPLASMÁTICO	28
5.9. ANÁLISE DOZN NAS AMOSTRAS UTILIZADAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS	32
5.10. pH DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS	32
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	62

1. Introdução

A homeopatia tem por base princípios distintos da medicina convencional, pois aplica o princípio de cura pela similitude descrito primariamente por Hipócrates, no século V a.C., valendo-se de substâncias previamente experimentadas em indivíduos sadios e em doses infinitesimais (TEIXEIRA, 2004). A maioria dos tratamentos homeopáticos utiliza medicamentos altamente diluídos, muitos deles acima do número de Avogadro (probabilidade tendendo a zero de se encontrar alguma molécula), o que gera muita controvérsia até hoje. Porém, os efeitos biológicos obtidos em modelos experimentais são evidentes e não podem ser negligenciados. Experimentos utilizando moléculas endógenas ultradiluídas, isoterápicos (diluições homeopáticas da mesma substância causadora das alterações orgânicas), modelos animais que desafiam o princípio de similitude (homeopatia *stricto sensu*) e as propriedades físicas das altas diluições têm sido realizados nos últimos anos, dando substrato sólido para revisões sistemáticas sobre o tema (BASTIDE, 2006; COELHO *et al.*, 2006; CHAPLIN, 2007; REY, 1998, 2000, 2003, 2007; ZACHARIAS, 2008; MIRANDA, 2008; BONAMIN *et al.*, 2008, 2009; BONAMIN & ENDLER, 2010; ENDLER *et al.*, 2010; KAWAKAMI *et al.*, 2010). Ainda no campo da eficácia homeopática, WASSENHOVEN (2007) e RUTTEN (2007) propõem uma abordagem da verificação clínica dos sintomas homeopáticos baseada na estatística Bayesiana, com resultados interessantes.

Apesar disso, a simples demonstração dos efeitos biológicos das ultradiluições representa apenas um primeiro passo para elucidação desses mecanismos, ainda tão incompreendidos (BONAMIN, 2007, 2009). Recentemente, MONTAGNIER e colaboradores (2009a, 2009b) descreveram nova propriedade do DNA em produzir ondas eletromagnéticas quando em altas diluições aquosas. Embora preliminar, a nova óptica abre um distinto campo de estudo para ultradiluições, mesmo que ainda não explique o fenômeno homeopático de similitude.

Muitos modelos experimentais sobre altas diluições têm sido desenvolvidos utilizando moléculas endógenas de importância para o sistema imune (BASTIDE, 2006). YOUNG e colaboradores (1993, 1996, 1997) concluíram que o tratamento de embriões de galinha com altas diluições de bursina (peptídeo

produzido pela bursa de Fabrícus e fundamental para a maturação de linfócitos B nas aves) restaurava a resposta linfocitária B de aves bursectomizadas *in ovo*, e modulava os níveis de corticosterona e ACTH plasmáticos, o que indica papel importante na harmonia da rede neuro-imuno-endócrina. Experimentos utilizando tiroxina em solução altamente diluída e sucussionada mostram modificações significativas na metamorfose e no desenvolvimento de girinos (ENDLER *et al.*, 1994, 1995, 2003; WEBER *et al.*, 2008). Em modelo semelhante, GUEDES (2003) confirma os dados iniciais descritos por Endler. Entre esses estudos, os mais conhecidos são aqueles nos quais se utilizou histamina ultradiluída para inibição de degranulação e modulação de basófilos em experimentos multicêntricos, os quais demonstraram a reprodutibilidade dos efeitos das ultradiluições, mesmo em laboratórios totalmente independentes (BELON *et al.*, 1999, 2004; BROWN & ENNIS, 2001; SAINTE-LAUDY, 2000, Lorenz *et al.*, 2003; SAINTE-LAUDY *et al.*, 2005, 2009; CHIRUMBOLO *et al.*, 2009).

A timulina é outra molécula endógena muito estudada em experimentos com altas diluições nas décadas de 80 e 90 (BASTIDE *et al.*, 1985,1987; DOUCET-JABOEUF *et al.*, 1984; DAURAT *et al.*, 1988; GUENNOUM *et al.*, 1997). Nesses estudos, observou-se que a timulina em altas diluições apresentava evidente efeito imunomodulador, com variações em função da sazonalidade e das condições imunológicas individuais prévias. Em camundongos C57BL/6-hígidos, a timulina ultradiluída (10^{-11} mg/animal) reduziu a resposta imune celular. Em camundongos NZB, os quais desenvolvem lúpus espontaneamente, a mesma concentração de timulina reduziu a resposta imune humoral timo-dependente e a hiper-resposta dos linfócitos a agentes mitogênicos. Assim, a discrasia imunitária que se manifesta nessa linhagem foi corrigida (BASTIDE *et al.*, 1987).

Estudos recentes desenvolvidos pelo grupo de Bonamin da Universidade Paulista observaram que a administração de timulina preparada homeopaticamente na potência 5cH (quinta diluição Hahnemaniana) e adicionada à água de bebida, diminuiu de forma estatisticamente significativa os efeitos mielo-supressores da ciclofosfamida em camundongos portadores do tumor de Ehrlich, e aumentou 27 vezes a área de metaplasia óssea do tumor implantado na pata dos animais (TOLEDO, 2005).

Recentemente, em trabalho experimental na área de pecuária orgânica, a Timulina 5cH administrada via água de bebida a frangos de corte melhorou

significativamente os índices zootécnicos em relação ao grupo controle, potencializou a resposta linfóide esplênica e reduziu a incidência de artrite viral na semana pré-abate, demonstrando a plausibilidade do uso da Timulina 5cH como ferramenta zootécnica (SATO, 2008).

É importante considerar que o uso de medicamentos homeopáticos adicionados à água de bebida ou à comida representa potencial recurso zootécnico-sanitário, com grande vantagem prática para o tratamento de grandes plantéis, dada a facilidade de administração, a ausência de resíduos químicos nos produtos derivados (carne, leite, ovos), que é a base da pecuária orgânica. Vários são os trabalhos publicados que propõem tais métodos (FILLIAT, 2002; GUAJARDO-BERNAL *et al.*, 1996; VARSHNEY, 2004; WILLIAMSON *et al.*, 1991; SOTO *et al.*, 2008, 2009; VALENTIN-ZABOTT *et al.*, 2008; VARGAS & RIBEIRO, 2009).

Outro experimento utilizando a timulina na potência 5cH via água de bebida demonstrou que camundongos inoculados na pata com onco-BCG oral (10^6 UFC) apresentaram aumento estatisticamente significativo no desenvolvimento do granuloma subcutâneo quando comparados aos animais do grupo controle. A análise histopatológica qualitativa do material revelou maior celularidade nos granulomas de animais tratados com timulina, sobretudo no que se refere aos fagócitos recém-migrados, enquanto os animais do grupo controle apresentaram menor celularidade, com predomínio de células epitelioides e maior incidência de focos de degeneração celular, portanto, menor *turn-over* celular em relação ao grupo tratado com timulina. Da mesma forma, a reatividade do linfonodo poplíteo (responsável pela drenagem do tecido subcutâneo da pata inoculada) se apresentou significativamente maior nos animais tratados, após avaliação histométrica quantitativa (ZALLA-NETO, 2007).

Segundo EPSTEIN (1983), existem várias definições para o termo granuloma, combinando derivações etiológicas, mecânicas e anatômicas. Apesar disso, algumas convergências universais são aceitas: (1) granuloma é reação inflamatória crônica focal; (2) é caracterizada por uma coleção de células da série mononuclear fagocitária, com ou sem a presença de outros tipos celulares; (3) a coleção de células mononucleares é compacta e organizada e (4) células epitelioides definem a lesão granulomatosa típica (LENZI *et al.*, 1998).

As classificações de granulomas seguem critérios anatômicos, morfológicos, etiológicos ou patogênicos. Podem ser difusos ou focais, conforme a distribuição tecidual agredida; simples ou compostos, quando formados apenas por macrófagos ou quando estes estão associados a células gigantes; complexos, quando um granuloma composto está associado aos fenômenos de defesa imunitária do hospedeiro; imunitários ou não imunitários, quando existe ou não manutenção da estrutura granulomatosa a partir de elementos de defesa imune, e supurativos ou não supurativos, quando existe ou não pus associado (GUIDUGLI-NETO, 1997).

RUSO e MARIANO (2010), em projeto desenvolvido recentemente, demonstram que a célula B1 é essencial à formação do granuloma induzido por BCG em camundongos. O granuloma induzido por BCG segue o padrão imunitário e é modelo experimental bem estabelecido para o estudo da estrutura granulomatosa, pois representa lesões similares produzidas pelo próprio *Mycobacterium* e outros agentes, em situações de campo. Além disso, é processo patológico altamente sensível à imunomodulação, o que o torna modelo ideal para o estudo da timulina.

O presente projeto, portanto, tem como finalidade estudar os mecanismos imunomoduladores de ultradiluições de timulina, a partir do modelo granulomatoso induzido por BCG em camundongos com especial enfoque na participação de células B1.

2. Revisão da Literatura

2.1. Homeopatia

2.1.1. Princípio da cura pela similitude

O princípio da cura pela similitude é o principal pilar da medicina homeopática e tem por objetivo desencadear resposta orgânica contra os sintomas da doença manifestada, utilizando substâncias que, ao serem experimentadas em pessoas saudáveis, promovem o surgimento de sintomas semelhantes aos encontrados em pessoas enfermas. O emprego da homeostase interna como reação curativa foi sistematizado em 1796, por Samuel Hahnemann (LUZ, 1996), cuja fundamentação científica tem sido corroborada em vários experimentos controlados (BELON *et al.*, 1999, 2004; SAINTE-LAUDY & BELON, 2005, 2009; CHIRUMBOLO *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2008; BONAMIN & ENDLER, 2010).

Recentemente, tem-se observado que o princípio de similitude pode ser identificado também no uso de drogas modernas (MOUSA *et al.*, 1993; BEVING *et al.*, 1994; ANDRIOLI *et al.*, 1996, 1997; TEIXEIRA, 1998, 1999). Entretanto, uma metanálise de ensaios sobre os efeitos protetores das diluições agitadas em série na toxicologia experimental foi conduzida por LINDE e colaboradores (1994), mostrando que apenas 11% dos experimentos reuniam critérios de qualidade aliados a efeitos significativamente positivos. Tal abordagem sofreu críticas por parte da comunidade homeopática, pois alguns critérios de excelência em pesquisa clínica não são adequados a altas diluições, como o método *wash-out*, por exemplo. Em 2005, artigo publicado na revista *Lancet* foi amplamente divulgado na mídia, com conclusões totalmente equivocadas, em função de graves erros conceituais, embora a metodologia utilizada fosse aparentemente correta (SHANG *et al.*, 2005). Essa falta de critérios conceituais específicos na experimentação com ultradiluições levou diversos autores a propor novas metodologias de avaliação (BASTIDE, 2006; BONAMIN, 2004, 2007, 2009; BONAMIN *et al.*, 2008, 2010; WASSENHOVEN, 2007;

RUTTEN, 2007), na tentativa de incrementar a produção científica homeopática qualificada.

2.1.2. Experimentação no homem são

Conhecida como experimentação patogenética homeopática, é método investigativo proposto por Hahnemann para conhecer as propriedades curativas das substâncias quando empregadas segundo o princípio de similitude em doses ponderais ou infinitesimais em organismos sãos. Os ensaios patogenéticos homeopáticos (randomizados, placebo-controlados, com duplo cruzamento) demonstram o despertar de sintomas em indivíduos sadios, com atividades similares entre as doses ponderais e infinitesimais do mesmo fármaco (DOUTREMEPUICH *et al.*, 1990, 1994; AGUEJOUF *et al.*, 1998, 2000; FISHER & DANTAS, 2001). No intuito de qualificar esses estudos, extremamente subjetivos, DANTAS (1996) propõe a sistematização de protocolos, por causa da dificuldade metodológica inerente a esses ensaios. Por outro lado, a carência de modelos animais que facilitem a demonstração de efeitos patogenéticos é outro entrave na demonstração objetiva desse fenômeno. Em 2006, COELHO e colaboradores tiveram insucesso na tentativa de se obter um modelo de patogenesia em ratos. Mais recentemente, SIQUEIRA *et al.* (2010) também não obtiveram sucesso em observar efeitos patogenéticos em camundongos.

2.1.3. Medicamento dinamizado

Hahnemann propôs um método farmacotécnico para preparar os medicamentos homeopáticos, conhecido como “dinamização”, em que as substâncias são diluídas e agitadas sucessivamente. A farmacotécnica preconizada pela Farmacopéia Homeopática Brasileira considera o método clássico desenvolvido por Hahnemann: diluição seriada centesimal, seguida de cem sucussões. A primeira diluição é chamada de 1cH (Centesimal Hahnemaneana), a segunda é 2cH - e assim por diante - e recebem o nome de “potências homeopáticas”. Importante ressaltar que o termo “potência” não significa intensidade de ação, pois as diluições homeopáticas não obedecem à curva dose-efeito clássica (CARMINE, 1996; CRISTEA

et al., 1997). Preparações acima da potência 12cH, cujo ponto de partida é uma solução a 1 mol/L, são diluições acima do número de Avogadro e geram controvérsia até hoje quanto à eficácia clínica (BASTIDE, 2006; ENDLER *et al.*, 2010). Mas a maior polêmica em relação à pesquisa com ultradiluições ocorreu em 1988, quando DAVENAS e colaboradores, pertencentes ao grupo de Jacques Benveniste, publicaram no periódico *Nature* dados sobre a degranulação de basófilos *in vitro* induzida por preparações ultradiluídas de anti-IgE. Esse experimento foi duramente criticado após sua publicação por suas considerações teóricas, metodologia inadequada e dificuldade de reprodução dos resultados (MADDOX *et al.*, 1988).

Entretanto, outros experimentos (SAINTE-LAUDY, 1987; SAINTE-LAUDY & BELON, 1996, 1997), incluindo estudos multicêntricos (BELON *et al.*, 1999; BELON *et al.*, 2004), com a participação de diversos laboratórios europeus e sob a chefia de pesquisadores ortodoxos, encontraram resultados positivos reprodutíveis, desde que os basófilos fossem tratados com histamina ultradiluída ao invés de anti IgE ultradiluído (SAINTE-LAUDY, 2000, SAINTE-LAUDY & BELON, 2005, 2009; BROWN & ENNIS, 2001; CHIRUMBOLO *et al.*, 2009; ENDLER *et al.*, 2010). Esse pequeno detalhe serve de ponto de partida para a correta caracterização fenomenológica da atividade biológica de substâncias ultradiluídas, etapa fundamental para que se compreendam os mecanismos envolvidos (BONAMIN, 2007, 2009; BONAMIN *et al.*, 2008; BONAMIN & ENDLER, 2010).

2.1.4. Novas perspectivas

Recentemente, o grupo de LUC MONTAGNIER propôs a demonstração de uma nova propriedade do DNA: a capacidade de sequências de DNA de algumas bactérias produzirem ondas eletromagnéticas em altas diluições aquosas (MONTAGNIER *et al.*, 2009a, 2009b). Parece ser fenômeno disparado por um ambiente eletromagnético de ondas de baixíssima frequência, em que o DNA genômico da maioria das bactérias patogênicas conteria sequências capazes de gerar esses sinais. Mesmo que preliminares e ainda carentes de explicações metodológicas detalhadas, tais estudos abrem caminhos ao desenvolvimento de sistemas altamente sensíveis de detecção para infecções bacterianas crônicas em humanos e animais. Ainda nessa perspectiva, o ano de 2010 abriu mais um leque de

novas observações. FRENKEL e colaboradores (2010) descrevem a ação de preparações homeopáticas no controle de células de tumor de mama *in vitro*.

Em três revisões sistemáticas, observa-se que os estudos experimentais desenvolvidos nos últimos 10 anos apontam para a convergência e a reprodutibilidade de resultados, consolidando a hipótese de ação moduladora das altas diluições, em contraposição à ação efetora de substâncias farmacologicamente ativas, usadas em doses ponderais (BONAMIN *et al.*, 2008; BONAMIM & ENDLER, 2010; ENDLER *et al.*, 2010). Modelos matemáticos também são propostos para sistematizar o estudo de tais ações moduladoras (RUIZ-VEGA & ESTEVES-SALGADO, 2008).

2.2. Timulina

A timulina é um nonapeptídeo zinco-dependente (Glp – Ala – Lys – Ser – Gln – Gly – Gly – Ser –Asn - OH) produzido pelas células epiteliais do timo e de fundamental importância à maturação de linfócitos T (BROWN, 2000). Por esse motivo, o zinco é essencial ao desenvolvimento do timo e das células T. Animais com deficiência desse elemento desenvolvem falhas nas respostas mediadas por células (PIMENTEL *et al.*; 1991; TIZARD, 2002). Quando descoberta, em 1975, a timulina era chamada de “fator tímico sérico” (BACH *et al*, 1975).

As concentrações séricas de timulina variam de acordo com a idade do indivíduo e acompanham a atrofia fisiológica do timo. Assim, em seres humanos, a timulina é detectável desde o nascimento, e tem seu pico entre 5 e 10 anos de idade; começa a decrescer na adolescência até os 30 e 40 anos, estabilizando-se até a senilidade (CONSOLINI *et al.*, 2000a). As concentrações séricas de timulina no humano e no rato oscilam em períodos de 24 horas, com picos durante a noite (MOLINERO *et al.*, 2000).

Sabe-se hoje que o papel fisiológico da timulina é muito mais abrangente, envolvendo mecanismos endócrinos, além dos parácrinos já estabelecidos. INAGAKI-OHARA (1996) demonstrou que linfócitos T podem sofrer maturação dentro do timo e fora dele. Diversos trabalhos (SAFIEH-GARABEDIAN, 2000, 2002; KANAAN, 2002; MERLINO & MARSH, 2001a, 2001b; KOSAKA, 1996) demonstram que a timulina pode modular a atividade de células NK, PMN e monócitos, assim como a produção de diversas citocinas (IL-1, IL-6, NGF, TNF e PGE2). O aumento da concentração

sérica de timulina desvia a resposta imune para o padrão celular (Th1), em relação ao padrão humoral (Th2). A falta de zinco, então, determina desvio para a resposta humoral (SPRIETSMA, 1997).

A timulina também exerce importante papel no eixo neuro-imuno-endócrino, com funções importantes no início da puberdade em várias espécies animais, estimulando a secreção de gonadotrofinas (GARCIA *et al.*, 2000; BROWN, 2000; HINOJOSA *et al.*, 1999). Outros hormônios hipofisários são modulados pela timulina, como prolactina, ACTH e LH (HADLEY *et al.*, 1997; DARDENNE, 1999; GOYA *et al.*, 2004).

O controle da secreção e a atividade da timulina, como citado, envolvem fatores imunitários e extraimunitários. Entre esses, destacam-se hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento, prolactina, melatonina, endorfina, hormônios sexuais, gonadotrofinas, zinco e estresse (BARBOUR *et al.*, 2001; MOLINERO *et al.*, 2000; MOCCHIGIANI, 1999; BROWN, 1998, 1999; HEAD, 1999; FABRIS *et al.*, 1997; FOLCH *et al.*, 1991; SAVINO, 1990). SANTARELLI e colaboradores (2005) mostram que a atividade da timulina pode ser controlada indiretamente por meio de metalotioneínas, pois são importantes reguladoras da homeostase do zinco por causa da sua grande afinidade por metais bivalentes. Produzida no hipotálamo, a atividade protetora central da metalotioneína III durante o estresse e senilidade é também bem conhecida, em virtude de sua atividade sequestradora de metais (GIACCONI *et al.*, 2003).

Vários modelos de hiperalgesia foram desenvolvidos e demonstram que a timulina modifica a sensibilidade dolorosa (HADDAD *et al.*, 2005; KANAAN, 2002; SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1996, 2003; SAFIEH-GARABEDIAN, 1999, 2000). Recentemente, foi descrito o efeito anti-inflamatório da timulina no cérebro (MOREL *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo, DARDENNE e colaboradores (2006) sugerem um papel neuroprotetor da timulina no sistema nervoso central. Dentro desse contexto, existem claras evidências de relações entre fatores tímicos e neuroendócrinos, podendo-se estabelecer um eixo timo-hipofisário.

Do ponto de vista patológico, são vários os fatores conhecidos como capazes de interferir na fisiologia da timulina: portadores de HIV apresentam redução na concentração de timulina sérica independentemente da população de linfócitos CD4+ presentes no sangue (CONSOLINI *et al.*, 2000b), assim como pacientes com

câncer (CONSOLINI, 1986; MOCCHEGIANI, 1990). A exposição crônica a baixas concentrações de mercúrio induz aumento na produção de timulina *in vitro* (VALENTINO *et al.*, 2001).

Por causa do papel modulatório abrangente, promovendo a integração entre os sistemas neurológico, imune e endócrino, diversas aplicações terapêuticas são propostas empregando a timulina. KALLEN (1986) mostrou que ratos tratados com ciclofosfamida tiveram a função linfocitária T restabelecida após tratamento com timulina. HIRAI (1995) produziu a recuperação da resposta macrofágica e imune humoral em bovinos e leporídeos submetidos à imunodepressão viral com o uso da timulina. AONO (1997) observou que ratos portadores de artrite experimental e tratados com timulina apresentavam redução do edema e do tecido de granulação, com facilitação da ossificação. YASUDA e colaboradores (2003) observaram que a timulina inibe a indução de óxido nítrico sintetase e protege as células pancreáticas mantidas em cultura, após exposição ao TNF. *In vivo*, a timulina foi capaz de prevenir lesões pancreáticas induzidas por injeção intraplantar de LPS em camundongos, por meio do aumento na expressão de Bcl-2 pelas células pancreáticas e liberação sistêmica de IL-6 (SAITOH *et al.*, 2004). Vários trabalhos demonstram a utilidade da timulina no controle da atividade imune de aves (CHANDRATILLEKE, 2000; MERLINO & MARSH, 2001a, 2001b; MARSH *et al.*, 2001; ORRINGER *et al.*, 2002), sugerindo sua aplicação como potencial recurso zootécnico na prevenção e controle de infecções em animais submetidos a estresse e imunossuprimidos, como é o caso das aves criadas para produção em grande escala.

Seguindo esta linha de raciocínio, a terapia gênica de hormônios tímicos aparece como a ferramenta mais recente para disfunções tímicas. Goya e colaboradores (2007) sugerem a construção de “genes artificiais” que codifiquem peptídeos tímicos cujas sequências são curtas e não requerem processamento pós-translacional. Neste caso, a timulina foi clonada a partir de vetor adenovírus recombinante e utilizada em uma série de estudos de terapia gênica experimental. Por meio de uma sequência de DNA sintético codificante para timulina inserida em *Escherichia coli*, grande quantidade purificada e biologicamente ativa de timulina foi conseguida (CALENDA *et al.*, 1988). Recentemente, molécula análoga chamada de metFTS foi construída e clonada em vetor adenovírus (REGGIANI *et al.*, 2006).

Diversos estudos de terapia gênica são publicados desde então (GOYA *et al.*, 2007; MOREL *et al.*, 2006; REGGIANI *et al.*, 2008; GARCIA-BRAVO *et al.*, 2006).

A despeito dos avanços da biologia molecular concernentes aos efeitos e à produção da timulina, tem-se identificado, desde a década de 1980, estudos sobre os efeitos imunorreguladores da timulina em altas diluições, em diferentes modelos experimentais (BASTIDE *et al.*, 1985,1987; DOCET-JABOEUF *et al.*, 1984; DAURAT *et al.*, 1988; GUENNOUM *et al.*, 1997).

Mais recentemente, nosso grupo tem identificado os efeitos imunomoduladores de altas diluições de timulina em processos mediados por células T, como resposta antitumoral, antiviral e moduladora do perfil histológico de granulomas induzidos por BCG (TOLEDO, 2005; ZALLA-NETTO, 2007; SATO, 2008).

Ainda, a facilidade de administração e o baixo custo indicam um possível uso zootécnico da timulina preparada homeopaticamente (SATO, 2008). Dadas tais constatações, é essencial a compreensão mais aprofundada dos mecanismos fisiopatológicos relacionados aos efeitos moduladores da timulina ultradiluída.

2.3. Inflamação Granulomatosa

A inflamação granulomatosa é o substrato morfológico para diversas doenças infecciosas, como tuberculose, lepra, brucelose, esquistossomíase, sarcoidose e um grande número de micoses viscerais, além de agentes irritantes não infecciosos, como talco, sílica, berílio ou zircônio (MARIANO, 1995).

A formação do granuloma caracteriza-se pelo agrupamento de macrófagos, com diferentes graus de modificações e de transformações, que podem estar associados a outros tipos celulares, como linfócitos e plasmócitos, além de células gigantes multinucleadas e necrose (COELHO, 1999). O granuloma elimina bactérias e protege o tecido circunvizinho do hospedeiro de respostas inflamatórias danosas. Sem a formação do granuloma, infecções micobacterianas podem se disseminar e ser frequentemente letais, como ocorre em humanos na associação AIDS/tuberculose (LEDRU *et al.*, 1999; PALMIERI *et al.*, 1999).

O macrófago é a unidade funcional e arquitetural básica em inflamações crônicas, mas a sua caracterização em granulomas foi dificultada principalmente por causa da sua variação morfológica nesse tipo de lesão (Mariano, 1995). Estudo

clássico sobre a ultraestrutura de granulomas induzidos por BCG foi conduzido por ADAMS em 1974, e mostrou que monócitos recém-migrados são inicialmente células simples e que progressivamente adquirem a morfologia macrófágica típica. Outros estudos demonstraram que macrófagos proliferariam no tecido inflamado após sua chegada ao mesmo, mas depende da natureza do agente e da imunidade do hospedeiro (RYAN & SPECTOR, 1969; BIRMAN & Mariano, 1985). Entretanto, é bem estabelecido que macrófagos apresentam apenas duas divisões durante a primeira semana de residência tecidual, e que essas divisões pouco contribuem para a quantidade celular na lesão (RYAN & SPECTOR, 1969; SPECTOR & LYKKE, 1966). Sabe-se que a taxa de turnover celular reflete a velocidade de entrada de novas células para o foco da lesão, e a taxa de divisão celular local (SPECTOR & MARIANO, 1975).

VIGNA e colaboradores (2006) sugeriram que a interação entre células B-1 e macrófagos exerce importante papel no desenvolvimento de granulomas induzidos por gp43 (principal componente antigênico secretado pelo *Paracoccidioides brasiliensis*). Sabe-se também que células B-1 podem se diferenciar em fagócitos fenotipicamente semelhantes a macrófagos derivados de monócitos, *in vitro* e *in vivo* (POPI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009). RUSSO & MARIANO (2010), em experimentos recentes, sugerem que a célula B-1 é essencial à formação granulomatosa induzida por BCG em camundongos.

2.4. Células B-1

Células B-1 representam população distinta de linfócitos B fenotipicamente únicas, com desenvolvimento e funções próprias (STALL *et al.*, 1996), que residem em múltiplos tecidos no camundongo, incluindo as cavidades peritoneais e pleurais (HERZENBERG & TUNG, 2007). As células B-1 diferem dos linfócitos B convencionais (B-2) porque são autorrenováveis e aparentemente independentes de células progenitoras e de estímulo proliferativo (DARNELL *et al.*, 1994). As células B-1 da cavidade peritoneal são divididas entre subtipos B-1a e B-1b, distintas pela expressão de CD5 (B-1a são CD5+ e B-1b são CD5-) (KANTOR *et al.*, 1992). Classificação mais completa foi proposta por GHOSH e colaboradores (2008): B-1a (CD23-, CD45R+, CD19+, IgM^{hi}, IgD^{lo}, CD11b+, CD5+), B-1b (CD23-, CD45R+, CD19+, IgM^{hi}, IgD^{lo}, CD11b+, CD5-), B-1c (CD23-, CD45R+, CD19+, IgM^{hi},

IgD^{lo}, CD11b-, CD5-), ou seja, células B-1a e B-1b passariam por fases de maturação ou diferenciação (B-1c) em que a expressão de CD11b estaria ou não presente. Uma das hipóteses sobre a origem destas células sugere que as células B1-a e B1-b são linhagens distintas, em que a primeira provém de linhagem fetal autorrenovável e a segunda é derivada de precursores da medula óssea (KANTOR & HERZENBERG, 1993; HAUGHTON *et al.*, 1993; HARDY & HAYAKAWA, 2003; MONTECINO-RODRIGUES *et al.*, 2006) (Quadro 1).

Quadro 1: Diferenças entre células B-1a e B-1b

Células	Marcadores	linhagem
B-1a	CD23-, CD45R+, CD19+, IgM ^{hi} , IgD ^{lo} , CD11b±, CD5+	Precursos de fígado fetal, autorrenovável
B-1b	CD23-, CD45R+, CD19+, IgM ^{hi} , IgD ^{lo} , CD11b±, CD5-	Poucos precursores da medula óssea adulta, autorrenovável

Funcionalmente, as células B-1 diferem das células B-2 no repertório de anticorpos, que tende a ser mais restrito na célula B-1 (KANTOR *et al.*, 1997). Além disso, as células B-2 participam da resposta adaptativa, enquanto as células B-1 são responsáveis pela resposta imune inata e respondem a uma variedade de antígenos T independentes (BAUNGARTH *et al.*, 2005; HERZENBERG, 2000).

Quanto à distribuição no organismo, outras diferenças são notadas entre células B-1 e B-2. As células B-1 são a principal população das cavidades pleural e peritoneal; entretanto são escassas no baço e ausentes nos linfonodos (OHDAN *et al.*, 2000; KAWAHARA *et al.*, 2003). Mas as células B-2 são amplamente distribuídas pelo organismo, sendo predominantes no sangue, baço e linfonodos (Quadro 2).

Quadro 2: Diferenças entre células B-1 e B-2

	Proliferação	Localização	Resposta imune	Repertório de Ac
B-2	dependem de progenitores	sangue/baço/linfonodos	adaptativa	amplo
B-1	autorrenováveis/independem de progenitores e estímulo proliferativo	pleura/peritônio	inata	restrito

Diversos estudos conduzidos pelo professor Mario Mariano e equipes na UNIFESP e na UNIP foram feitos na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos na origem da célula B-1 e suas funções, utilizando camundongos *Xid* (deficientes em células B-1). Células B-1 possuem a capacidade de migrar da cavidade peritoneal para o foco inflamatório agudo inespecífico, perdendo características de células B, como a expressão de IgM e diferenciando-se em fagócitos mononucleares morfolologicamente semelhantes a macrófagos derivados de monócitos (ALMEIDA *et al.* 2001; POPI *et al.*, 2009). Nos processos inflamatórios crônicos específicos, as células B-1 são essenciais à formação de células gigantes de corpo estranho (BOGSAN *et al.*, 2005) e participam no processo de cicatrização (OLIVEIRA, 2009). A célula B-1 é capaz de migrar do peritônio para a inflamação granulomatosa induzida por BCG em pulmões de camundongos (RUSSO & MARIANO, 2010).

O presente projeto, portanto, tem como finalidade estudar os mecanismos imunomoduladores de ultradiluições de timulina, utilizando o modelo experimental granulomatoso induzido por BCG em patas de camundongos, dando especial enfoque à possível participação das células B-1 nessa modulação.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do trabalho é detalhar os mecanismos imunomoduladores da timulina ultradiluída utilizando como modelo o desenvolvimento do granuloma imunogênico induzido por BCG e a identificação/mapeamento de marcadores celulares capazes de identificar linfócitos, fagócitos e células progenitoras B-1 no peritônio.

3.2. Objetivos específicos

- A. Pelo estudo histomorfométrico, quantificar a hemossiderose esplênica em lâminas histológicas do baço coradas com Azul da Prússia, e a quantidade de bacilos intracitoplasmáticos em macrófagos presentes na lesão granulomatosa, corados pelo método Ziehl-Neelsen.
- B. Por citometria de fluxo, identificar e quantificar células positivas para CD11b (fagócitos ativados, células B-1), CD19 (células B-1 e B-2), CD23 (células B-1 são negativas), CD5 (células B-1a) do peritônio dos camundongos inoculados.
- C. Descrever a cinética dos parâmetros descritos acima, analisando os dados em diferentes tempos: 7, 14 e 21 dias após a inoculação do BCG.
- D. Analisar se há interferência do Zn ou outro metal nos tratamentos propostos, por meio do uso de Chelex ® nas preparações medicamentosas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, SPF (*Specific pathogen free*), machos e adultos, provenientes do Centro de Desenvolvimento para Modelos experimentais – CEDEME – da UNIFESP e mantidos em microisoladores (Techniplast ®), no biotério de experimentação animal – SPF, do Centro de Pesquisa da UNIP – campus Indianópolis, onde receberam água e ração *ad libitum* e foram submetidos a controle de temperatura e iluminação, com ciclos de claro e escuro 12/12horas.

4.2. Grupos experimentais e preparo do medicamento

Os animais foram divididos em três grupos experimentais, com n=15 por grupo, a saber:

Grupo experimental A: tratado com timulina 5cH, preparada a partir de matriz 4cH (Boiron - França), sendo a última diluição feita no momento da administração em solução hidroalcoólica 30% e sucussionada mecanicamente com auxílio de braço mecânico automatizado (Autic ®).

Grupo experimental B: tratado com timulina 5cH + Chelex® (SIGMA, USA) (Quelante inespecífico de metais), para evitar a influência do Zn no processo imunomodulatório da timulina.

Grupo controle C (veículo): tratado com solução hidroalcoólica 30% sucussionada.

Foi respeitada a quantidade máxima de cinco camundongos por microisolador.

Após a dinamização, a concentração de timulina na solução 5cH foi de 4×10^{-14} M. A matéria-prima utilizada para o preparo da matriz 4cH foi o peptídeo puro, livre

de zinco, produzido sinteticamente, conforme documento enviado pelo laboratório fornecedor (Boiron Brasil) (Anexo 2).

4.3. Tratamento

Os animais foram tratados recebendo diariamente timulina 5cH (grupo A), timulina 5cH + Chelex® (grupo B) ou veículo (grupo C), via água de bebida, em cego, durante 21 dias. O Chelex ® é um copolímero utilizado como quelante de metais de transição, como o Zn. A solução de timulina incubada com Chelex seguiu o protocolo estabelecido por DARDENNE e colaboradores (1982).

Para o procedimento em cego, os frascos contendo timulina 5cH, timulina 5cH + Chelex® e veículo foram adesivados com as letras A, B e C, por funcionário do laboratório, não envolvido em nenhuma etapa experimental. Os códigos só foram revelados após o término das análises estatísticas.

4.4. Inoculação do BCG e observação das lesões

As lesões granulomatosas foram induzidas pela inoculação experimental de BCG, via injeção subcutânea, no coxim plantar da pata esquerda, utilizando-se seringas descartáveis Ultra-Fine (BD Medical, EUA). A dose utilizada foi de 2×10^5 UFC de bactérias viáveis em volume de 50 microlitros de inóculo total. A micobactéria foi fornecida pelo Instituto Butantan, sob o nome de Vacina BCG® mediante doação, e, em todos os preparos, foi diluída em salina estéril apirrogênica.

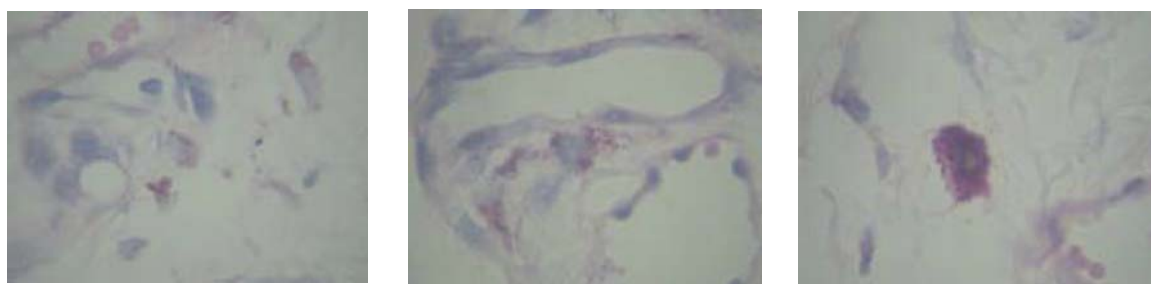
Antes da inoculação da pata esquerda (tempo zero), a medida de sua espessura foi tomada inicialmente, com um micrômetro (Mitutoyo® IP65, Japan). Em seguida, medidas diárias foram feitas para avaliação da evolução granulomatosa. Os animais foram sacrificados nos tempos 7, 14 e 21 dias após. Ao final de cada tempo, cinco animais de cada grupo foram sacrificados em cuba de CO₂, e a pata esquerda inoculada mais o baço foram colhidos e fixados em solução de formol a 10%, por 24 horas, seguido de processamento histológico convencional.

O material colhido foi submetido às colorações HE, Azul da Prússia e Ziehl Neelsen. A partir das lâminas coradas pelo método Ziehl Neelsen, a análise histométrica se deu por escores, representando a quantidade de bacilos

citoplasmáticos presentes em 20 macrófagos observados aleatoriamente nos coxins plantares, usando objetiva de imersão (100x) (Figura 1). Tal leitura foi feita em duplicata, a partir de dois observadores diferentes.

O número de macrófagos positivos para Azul da Prússia encontrados no baço (Figura 2) foi determinado pela contagem de dez campos microscópicos por lâmina, usando-se objetiva de 40X. A área de cinco folículos identificados aleatoriamente nos cortes de baço foi medida em pixels, a partir de lâminas coradas com HE. Para isso, fotomicrografias foram feitas utilizando-se objetiva de 10X, analisadas por meio do programa de análise de imagem *Image J for Windows* (Figura 3).

Todas as lâminas deste trabalho foram lidas em microscópio Zeiss Primo Star (Zeiss, Germany), e todas as imagens feitas com máquina fotográfica Canon Power Shot A650 IS (Canon, Japan).

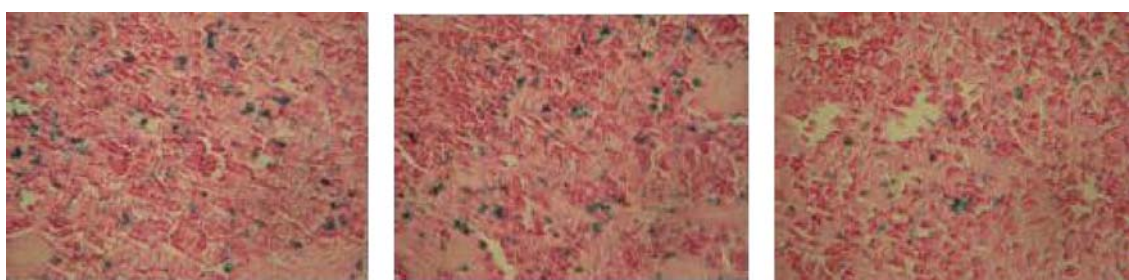


1

2

3

Figura 1: Escores de infecção intracelular em macrófagos presentes no granuloma induzido. (1) poucos bacilos intracitoplasmáticos; (2) quantidade intermediária de bacilos intracitoplasmáticos, (3) quantidade incontável de bacilos intracitoplasmáticos. Ziehl Neelsen, 1000x

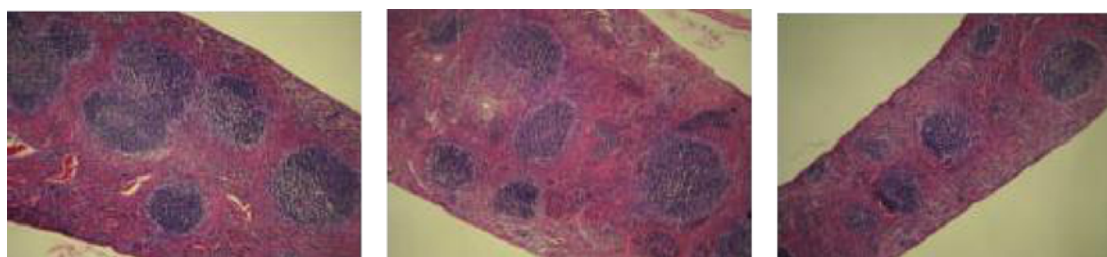


1

2

3

Figura 2: Fotomicrografia de baço de camundongo com a presença de macrófagos pigmentados por hemossiderina, positivos para Azul da Prússia. (1) Timulina 5cH, (2) Timulina 5cH+Chelex, (3) Controle. Azul da Prússia, 400x



1

2

3

Figura 3: Fotomicrografia de baço e seus folículos linfoides. (1) Timulina 5cH, (2) Timulina 5cH+Chelex, (3) Controle. Hematoxilina/Eosina, 100x

4.5. Avaliação por citometria de fluxo para células B-1

A lavagem peritoneal foi feita logo após sacrifício dos camundongos em câmara de CO₂, 7, 14 e 21 dias após a inoculação do BCG.

O peritônio de cada animal foi injetado com 5 mL de RPMI (GIBCO®, USA), massageado para desprendimento e homogeneização das células peritoneais, e o lavado foi colhido com seringa. As células foram, então, transferidas para tubo plástico, centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos e ressuspensas em tampão hemolítico ACK (GIBCO, USA) por 2 minutos, a temperatura ambiente. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS (GIBCO®, USA). O material obtido foi mantido sempre em gelo, durante todo o processamento.

Alíquota de 5 µl de cada amostra foi transferida para um microtubo contendo 100µl de Azul de Tripán 0,1% (MERCK), a fim de se contar o número de células viáveis, utilizando-se Câmara de Neubauer modificada (Hausser Scientific, USA).

Após outra centrifugação a 2000rpm por 5 minutos, as amostras foram novamente ressuspensas em 100µl de PBS. Para o bloqueio do receptor de Fcγ II e III, foram adicionados 10 µl de anticorpo monoclonal anti-CD16/CD32 (CALTAG-INVITROGEN, USA) de camundongo, na concentração 1:100, seguido de incubação por 15 minutos a 4°C. Após nova centrifugação, as amostras foram ressuspensas em 200µl de PBS/BSA 1% e divididas em dois microtubos, sendo um deles mantido sem a adição de marcadores (controle de marcação) e o outro incubado com os seguintes anticorpos: anti-CD19 APC, anti-CD23 FITC, anti-CD5 PerCP e anti-CD11b PE (CALTAG-INVITROGEN, USA) por 30 minutos a 4°C. Uma última centrifugação foi executada, sempre a 2000rpm por 5 minutos, e as células foram ressuspensas em 1 ml de PBS e transferidas para tubos FACS.

A leitura foi feita no aparelho de citometria de fluxo FACS Calibur (BD). Inicialmente, o tamanho e a granulosidade das células foram utilizados para a determinação das populações de linfócitos e macrófagos. A fluorescência obtida com marcadores específicos determinou os demais *gates*, a partir da combinação de dois marcadores simultaneamente. Assim, a partir do *gate* de linfócitos, a subpopulação de linfócitos B2 foi determinada pela expressão simultânea de CD19 e CD23, a subpopulação de células B1 foi determinada pela expressão de CD19 associada à baixa expressão de CD23. Uma região desse *gate* (contendo apenas

células CD19+) foi selecionada para identificação de células B-1a (CD19+, CD5+) e B-1b (CD19+, CD5-). O *gate* de macrófagos, selecionado inicialmente, foi a base para a identificação das subpopulações de fagócitos derivados de B-1 (CD19+, CD11b+) e fagócitos derivados de monócitos (CD19-, CD11b+).

A compensação de cada fluorocromo foi realizada pela marcação simples de amostra do grupo controle. A positividade de cada marcador foi determinada a partir da fluorescência natural das células sem nenhum anticorpo.

As porcentagens de cada subtipo celular, em cada amostra, foram calculadas automaticamente pelo programa Flow Jo 8.7. A transposição dos dados para os programas EXCEL 2007 e INSTAT 3.0 foi feita manualmente, sendo os dados finais conferidos por uma terceira pessoa.

4.6. Análise estatística

A evolução da lesão granulomatosa macroscópica e a quantificação de macrófagos esplênicos positivos para hemossiderose, em função do tempo, foram analisadas pelo teste MANOVA de duas vias. A comparação entre os diferentes escores de infecção por BCG foi feita pelo método Kruskal Wallis/Dunn. O diâmetro folicular esplênico e os valores absolutos das células contadas em citometria de fluxo foram analisados pelo teste ANOVA/Tuckey-Krammer. O método do X^2 foi utilizado para avaliação da proporção entre os diferentes subtipos celulares observados em citometria de fluxo. Em todos os casos, os valores de $p=0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.7. Bioética e conflito de interesses

O presente projeto passou pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIP, e foi conduzido de acordo com a lei 6.638, de 8 de maio de 1979, sobre “Normas para prática didático-científica da vivisseção de animais”, e lei estadual 11.977/05, que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, com o nº de protocolo 007/10 (Anexo 1).

Não há conflito de interesses relacionados a este trabalho de pesquisa.

5. Resultados

5.1. Relação macrófagos/linfócitos no peritônio

A figura 4 mostra que, aos 21 dias após a inoculação de BCG, a população de linfócitos no peritônio diminui em função do tempo, enquanto a população de macrófagos aumenta. Contudo, o estudo da proporção entre tais subtipos celulares indica o predomínio de linfócitos em relação a macrófagos, conforme observado no grupo controle. Nos animais tratados com timulina, entretanto, a proporção entre tais células sofre mudanças significativas, sendo que os macrófagos passam a representar 50% da população celular peritoneal.

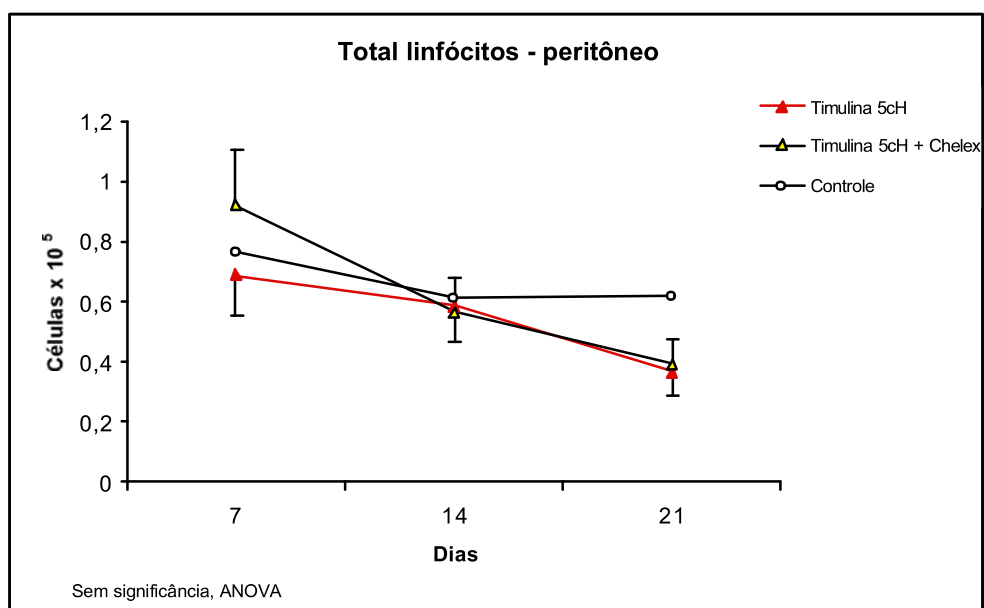
5.2. Relação macrófago derivado de monócito/fagócito derivado de B1 no peritônio

Na figura 5 se percebe, pela análise do grupo controle, que o aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal é, na verdade, a expressão do aumento da subpopulação de fagócitos derivados de monócitos, pois os fagócitos derivados de células B-1 (CD19+CD11b+) diminuem em função do tempo. Ao contrário, os animais tratados com timulina 5cH, com ou sem Chelex®, apresentam persistência dessas últimas, evidente no 21º dias pós-infecção, o que resulta na maior proporção das mesmas em relação àquelas derivadas de monócitos.

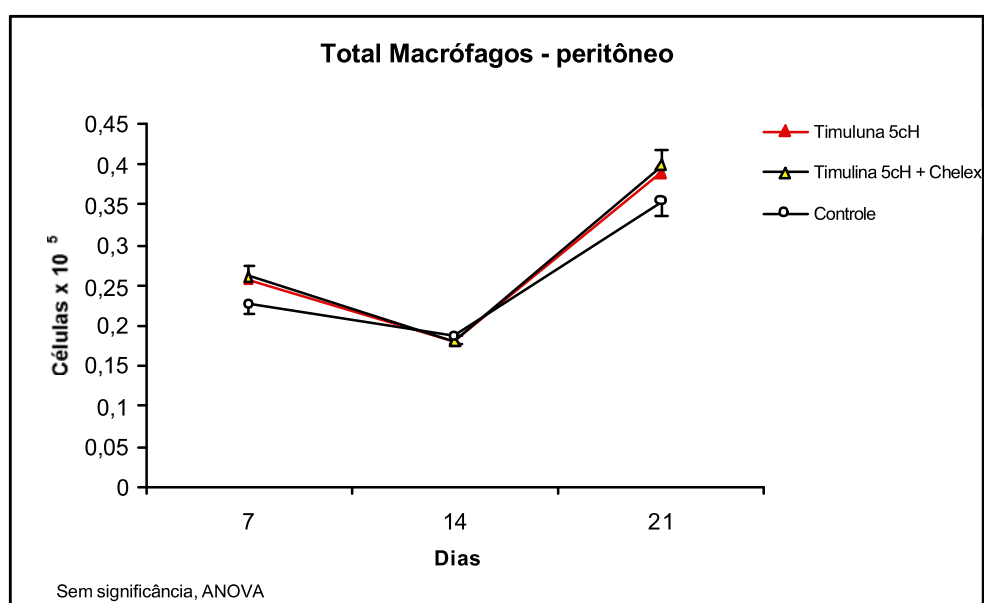
5.3. Relação B1/outras linfócitos no peritônio

A figura 6 mostra que o tratamento com timulina 5cH induziu queda na população de linfócitos CD19+/CD11b+ (células B-1) em relação aos demais linfócitos, aos 14 e 21 dias após a inoculação do BCG, sendo mais evidente aos 21 dias. Tal queda, associada ao aumento de fagócitos CD19+/CD11b+ descrito no item anterior, sugere a diferenciação dessas células em fagócitos ativos.

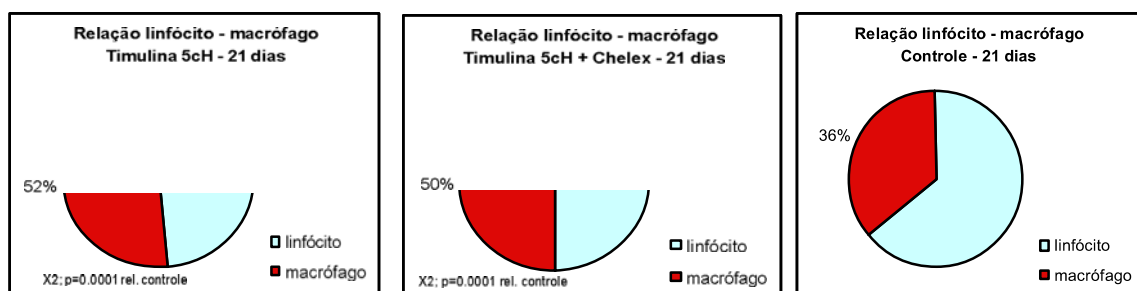
Já a população de células B convencionais (B-2) decresce ao longo do tempo no grupo controle, mas não no grupo tratado com timulina 5cH. Nesse caso, porém, há interferência da incubação do medicamento com Chelex ®, no sentido de bloquear tal efeito.



A



B



C

Figura 4: A: Total de Linfócitos do peritônio em função do tempo, quantificados por citometria de fluxo. B: Total de macrófagos do peritônio em função do tempo, quantificados por citometria de fluxo. C: Relação Linfócito/Macrófago aos 21 dias. ANOVA; X², p=0,0001 em relação ao controle.

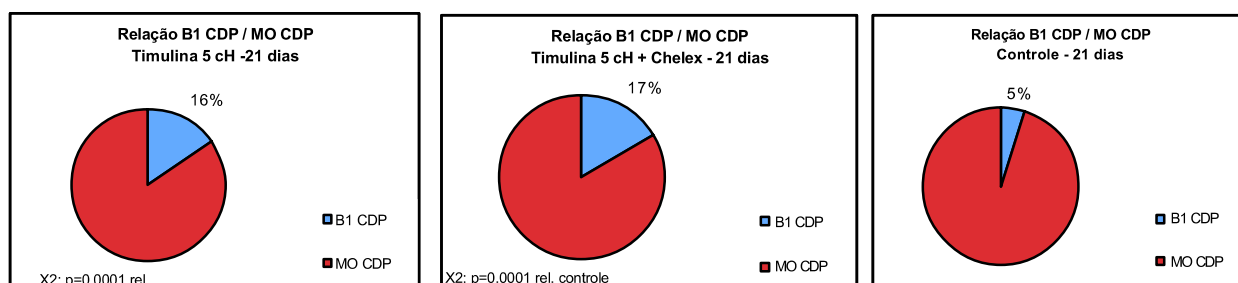
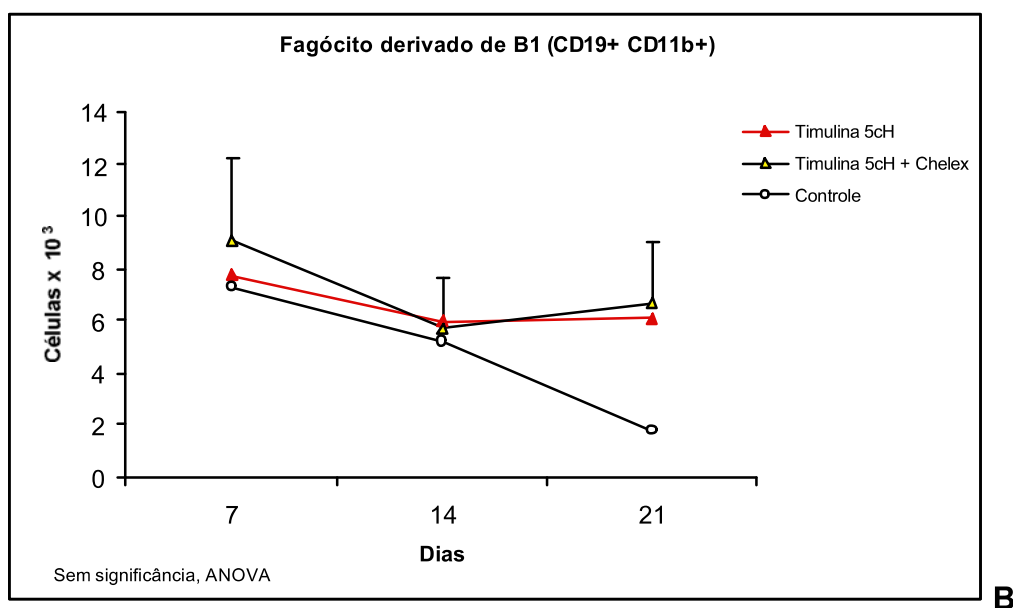
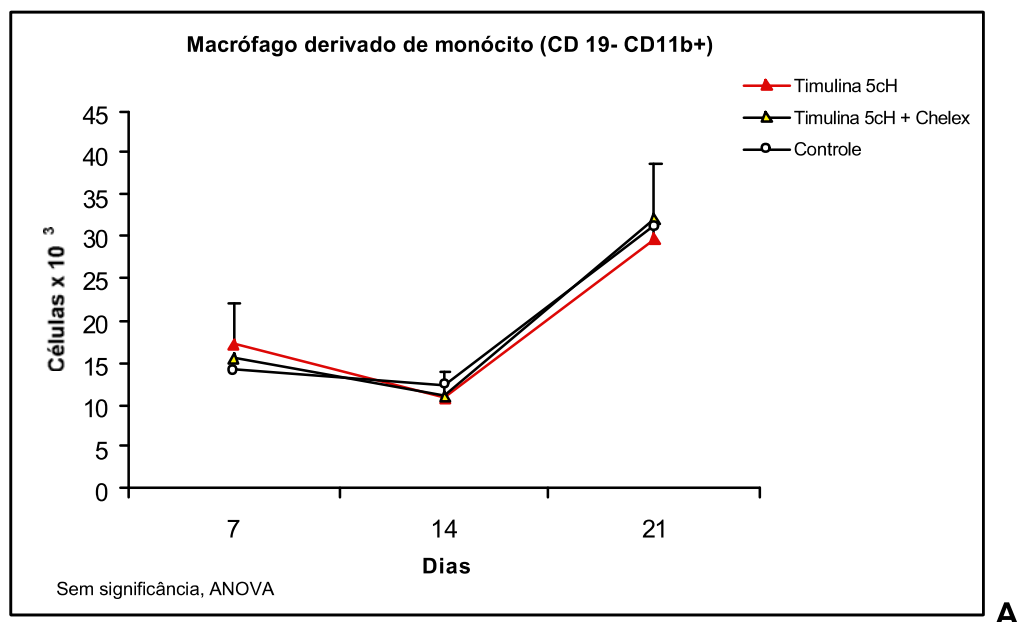


Figura 5: A: Total de Macrófagos derivados de monócitos do peritônio em função do tempo, quantificados por citometria de fluxo. B: Total de Fagócitos derivados de células B1 do peritônio, em função do tempo, quantificados por citometria de fluxo. C: Relação B1 CDP/ Monócito CDP aos 21 dias, sendo CDP = *cell derived phagocytes*. ANOVA; X², p=0,0001 em relação ao controle.

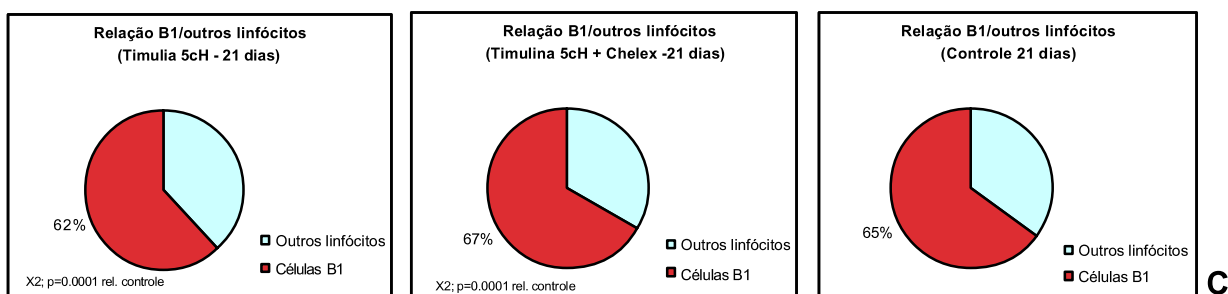
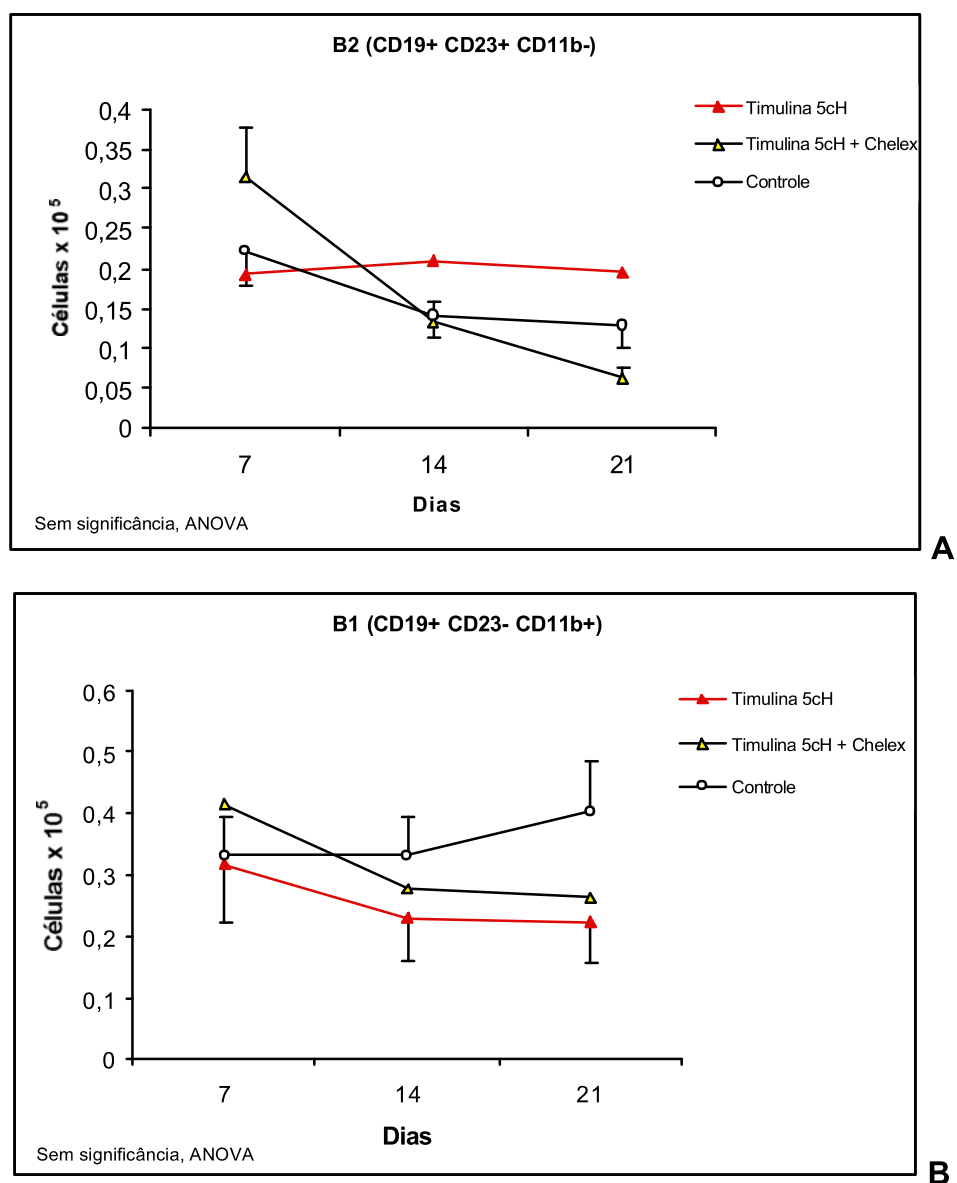


Figura 6: A: Total de células B2 do peritônio em função do tempo, quantificadas por citometria de fluxo. B: Total de células B1 do peritônio em função do tempo, quantificadas por citometria de fluxo. C: Relação B1/outros linfócitos, aos 21 dias. ANOVA, X², p=0,0001 em relação ao controle.

5.4. Relação B1-a/B1-b no peritônio de camundongos

A incubação da timulina 5cH com Chelex® parece ter evitado a diminuição da população de células B-1a, mas não a queda da população de células B-1b induzida pelo tratamento com timulina 5cH. Tal efeito é mais evidente no 21º dia pós-infecção, o que mostra a figura 7.

Embora os mecanismos exatos de tais subtipos celulares ainda estejam a ser determinados, fica clara a ideia de que a timulina 5cH exerce ação sobre essas células a partir de mecanismos diferentes.

5.5. Diâmetro folicular esplênico

A figura 8 mostra aumento dos folículos do baço nos grupos tratados, em relação ao controle, indicando haver efeitos sistêmicos sobre a reatividade linfóide, sobretudo no início do processo (7 dias). Ainda nessa avaliação, observa-se que não houve influência do Chelex® ou do Zinco.

5.6. Hemosiderose esplênica

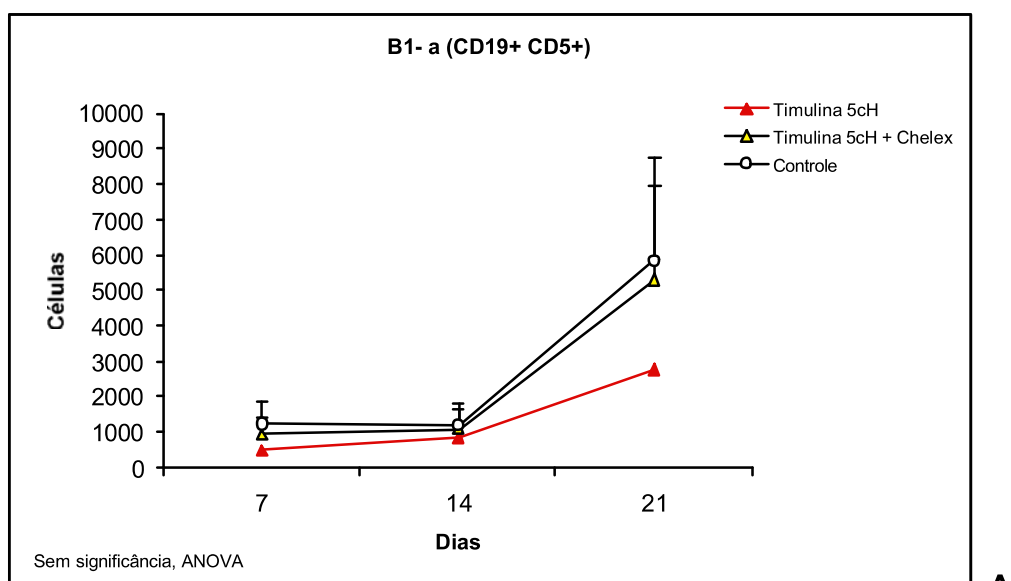
Animais tratados com timulina 5cH, com ou sem a incubação do medicamento com Chelex®, apresentam número maior de macrófagos esplênicos positivos para Azul da Prússia, indicando maior atividade fagocítica dessas células nesses grupos (figura 9).

5.7. Espessura da pata

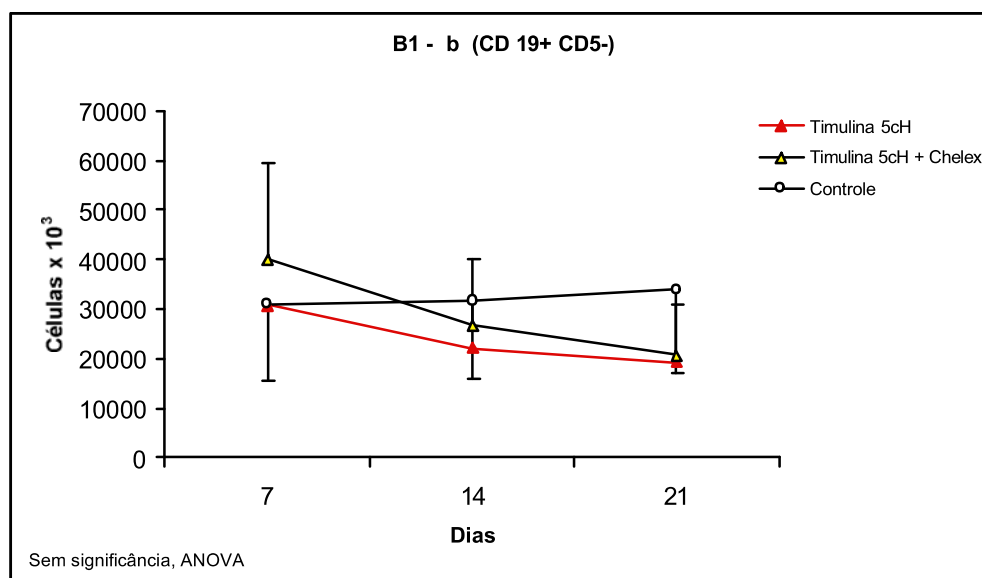
O resultado mostrado na figura 10 ressalta a evolução da inflamação granulomatosa em função do tempo. Aos 21 dias, quando o granuloma está em estágio de amadurecimento maior, há melhor evidência da ação da timulina não incubada com Chelex®.

5.8. Escores de infecção por BCG intracitoplasmático

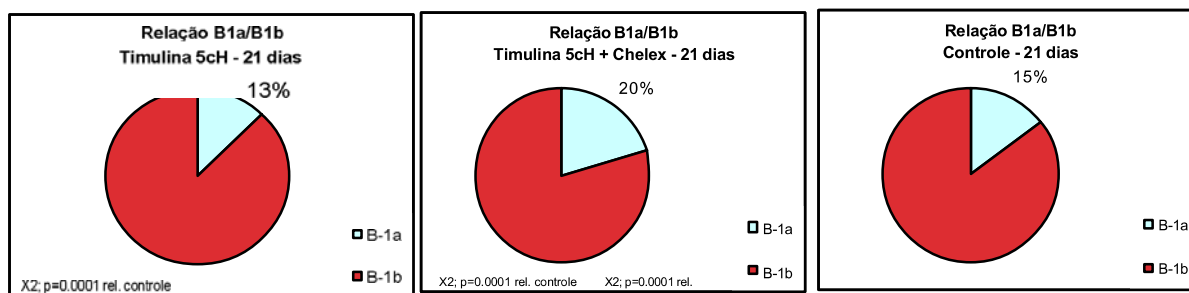
A figura 11 mostra que os macrófagos que migraram para o local da lesão foram mais eficientes no processo de fagocitose e digestão do BCG nos animais tratados com timulina 5cH, de forma independente do Chelex ®.



A



B



C

Figura 7: A: Total de células B1-a do peritônio em função do tempo, quantificadas por citometria de fluxo. B: Total de células B1-b do peritônio em função do tempo, quantificadas por citometria de fluxo. C: Relação B1-a/B1-b aos 21 dias. X^2 , $p=0,0001$ em relação ao controle/timulina 5cH.

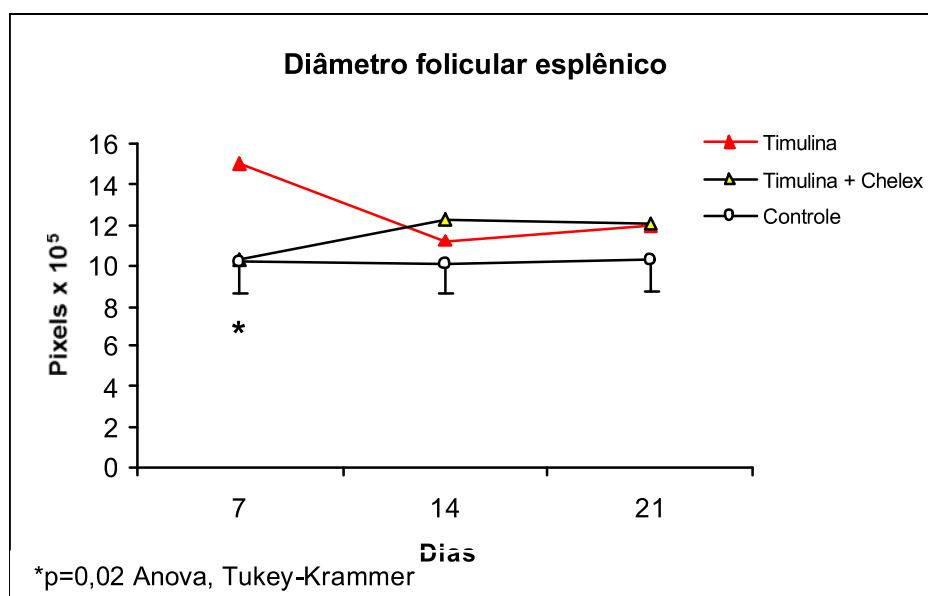


Figura 8: Medida da área folicular (em pixels) de cinco campos aleatórios por lâmina em função do tempo. A contagem foi feita com auxílio do programa de análise de imagem *Image J for Windows*. ANOVA/Tuckey-Krammer, p=0,02.

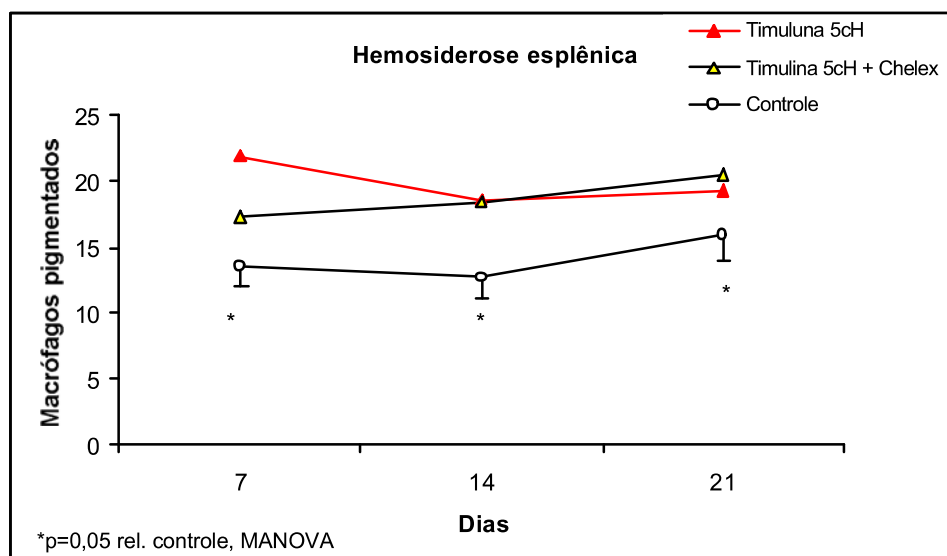


Figura 9: Contagem de Macrófagos pigmentados em dez campos aleatórios por lâmina, em função do tempo. A contagem foi feita com auxílio do programa de análise de imagem *Image Tool 3.0 for Windows*. MANOVA, p=0,05.

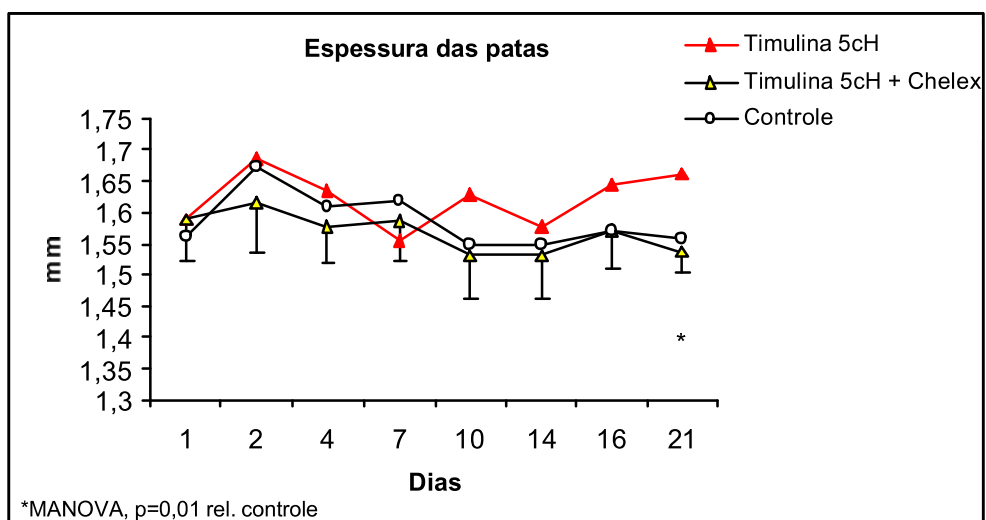


Figura 10: Avaliação macroscópica da evolução da lesão granulomatosa nos diferentes grupos, em função do tempo, pela micrometria da pata. MANOVA, $p=0,01$.

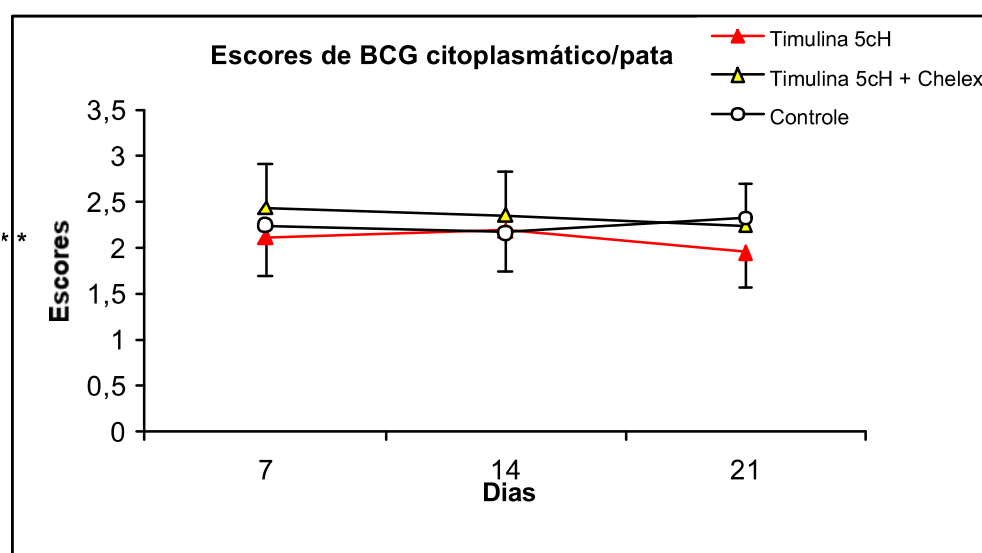


Figura 11: Avaliação dos escores de infecção por BCG intracitoplasmático, a partir de 20 macrófagos observados aleatoriamente, por lâmina, em função do tempo. O resultado expressa a contagem executada por dois observadores independentes, em cego. Kruskal Wallis/Dunn, $p=0,05$ em relação à timulina+Chelex; $p=0,001$ em relação ao controle.

5.9. Análise do Zn nas amostras utilizadas nos diferentes tratamentos

Apenas traços de zinco foram encontrados em todas as amostras: veículo, timulina 5cH e timulina 5cH adicionada a diferentes concentrações de Chelex®. Os resultados descritos acima permitem descartar a hipótese de efeito inespecífico da Timulina homeopática por contaminação de Zn em concentrações imunomoduladoras.

Quadro 3: Análise da concentração de Zn determinada por espectrometria de Absorção atômica das soluções utilizadas nos diferentes tratamentos: Timulina 5cH, Timulina 5cH + Chelex® e Controle (Sol. Alcoólica). Análises feitas pelo lab. CBO – Análises Laboratoriais. Anexos 3 – 8.

Amostras	Quantidade de Zn (microgramas/ml)
ALCOOL 70%	0.04
Timulina 5cH	0.05
Timulina 5cH + 5 mg Chelex	0.05
Timulina 5cH + 10 mg Chelex	0.05
Timulina 5cH + 50 mg Chelex	0.04
Timulina 5cH +100 mg Chelex	0.05

5.10. pH das amostras utilizadas nos diferentes tratamentos

A bula do produto Chelex® revela que a sua utilização eleva consideravelmente o pH das soluções. No caso particular deste estudo, o pH da amostra quelada subiu de 7 para 9. Entretanto, a quantidade utilizada nos bebedouros dos camundongos (100µl/200ml) não foi suficiente para induzir tal alteração na água de bebida, descartando-se a influência do pH nos resultados deste trabalho (Quadro 4).

Quadro 4 – Medida do pH dos bebedouros após a adição de timulina 5cH, timulina 5cH + Chelex® e veículo (álcool 30%) na água (250 mL).

Solução	pH	pH final (solução + água de bebida)
Timulina 5cH	7	7
Timulina 5cH +Chelex®	9	7
sol. alcoólica	7	7

5.11. Análise do Ca, MG e Mn das amostras utilizadas nos diferentes tratamentos

Ca e Mg não foram detectados em nenhuma das amostras. Entretanto, as quantidades de Mn encontradas nas soluções utilizadas nos tratamentos foram diferentes.

Quadro 5: Análise da concentração de Ca, Mg e Mn determinada por espectrometria de Absorção atômica das soluções utilizadas nos diferentes tratamentos: Timulina 5cH, Timulina 5cH + Chelex® e Controle (Sol. Alcoólica). Análises feitas pelo lab. CBO – Análises Laboratoriais. Anexos 9 – 11.

Amostras	Quantidade de Ca
ALCOOL 70%	Não detectado
Timulina 5cH	Não detectado
Timulina 5cH +100 mg Chelex	Não detectado

Amostras	Quantidade de Mg
ALCOOL 70%	Não detectado
Timulina 5cH	Não detectado
Timulina 5cH +100 mg Chelex	Não detectado

Amostras	Quantidade de Mn
ALCOOL 70%	=5µg/L
Timulina 5cH	6,5µg/L
Timulina 5cH +100 mg Chelex	=5µg/L

6. Discussão

Modelos biológicos que utilizam moléculas endógenas em altas diluições são estudados por diversos pesquisadores desde a década de 80. Muitas dessas moléculas estão relacionadas ao controle do sistema imune, como, por exemplo, bursina (Lys-His-Gly-NH₂), TNF e timulina.

A bursina é hormônio produzido pela bursa de Fabricius, sendo a principal responsável pela maturação de linfócitos B em aves. YOUNG-SIMO e colaboradores (1993, 1996, 1997), em sequência de três trabalhos, avaliaram a utilização da bursina ultradiluída em interessante modelo com embriões de galinha bursectomizados. Aves bursectomizadas *in ovo* perdem a produção de ACTH, corticosterona e melatonina, assim como as respostas de IgG específicas a aloantígenos; com a injeção *in ovo* de bursina ultradiluída, tais funções foram recuperadas. Para averiguar a especificidade da bursina ultradiluída, um grupo controle tratado com um tripeptídeo sabidamente sem atividade biológica (Trp-Leu-leu-NH₂) foi adicionado a todas as etapas do estudo.

Outro modelo interessante foi usado por CARMINE (1997). O autor utilizou citocina TNF α em altas diluições para avaliar as variações na produção de H₂O₂ por células de neuroblastoma, por meio da técnica de quimioluminescência. O peróxido de hidrogênio é substância liberada por uma série de culturas de células tumorais, e é associado à progressão e malignidade dos tumores. O aumento da liberação de H₂O₂ pelas células cultivadas com o TNF α ultradiluído foi altamente significativo em relação ao controle, contudo, não se observou linearidade dos efeitos, nem foi possível obter curva diluição – efeito padrão.

O estudo da timulina ultradiluída e seus efeitos imunomoduladores teve início com o grupo da profa. Madeleine Bastide nas décadas de 80 e 90 (BASTIDE *et al.*, 1985, 1987; DOUCET-JABOEUF *et al.*, 1984; DAURAT *et al.*, 1988; GUENNOUM *et al.*, 1997). Nesses estudos, observou-se que a timulina em altas diluições apresentava evidente efeito imunomodulador, com variações em função da sazonalidade e também das condições imunológicas individuais prévias. Em camundongos C57BL/6-hígidos, a timulina ultradiluída (10⁻¹¹ mg/animal) reduziu a resposta imune celular. Em camundongos NZB, que desenvolvem lúpus espontaneamente, essa mesma concentração de timulina reduziu a resposta imune humoral

timodependente e a hiper-resposta dos linfócitos a agentes mitogênicos. Assim, a discrasia imunitária que se manifesta nessa linhagem foi corrigida (BASTIDE *et al.*, 1987). Essa linha de pesquisa foi retomada recentemente pelo nosso grupo de estudos, coordenada pela profa. Leoni Bonamin, da Universidade Paulista.

Em um desses trabalhos, observou-se que a administração de timulina preparada homeopaticamente na potência 5cH (quinta diluição Hahnemaniana) e adicionada à água de bebida, diminuiu de forma estatisticamente significativa os efeitos mielossupressores da ciclofosfamida em camundongos portadores do tumor de Ehrlich, e aumentou 27 vezes a área de metaplasia óssea do tumor implantado na pata dos animais (TOLEDO, 2005).

Recentemente, em trabalho experimental na área de pecuária orgânica, a timulina 5cH administrada via água de bebida a frangos de corte melhorou significativamente os índices zootécnicos em relação ao grupo controle, potencializou a resposta linfóide esplênica e reduziu a incidência de artrite viral na semana pré-abate, demonstrando a plausibilidade do uso da timulina 5cH como ferramenta zootécnica (SATO, 2008). É importante considerar que o uso de medicamentos homeopáticos adicionados à água de bebida ou à ração representa potencial recurso zootécnico-sanitário com grande vantagem prática para o tratamento de grandes plantéis, dadas a facilidade de administração e ausência de resíduos químicos nos produtos derivados (carne, leite, ovos), base da pecuária orgânica. Vários trabalhos publicados propõem tais métodos (Filliat, 2002; GUAJARDO-BERNAL *et al.*, 1996; VARSHNEY & NARESH, 2004; WILLIAMSON *et al.*, 1991; SOTO *et al.*, 2008; 2009; VALENTIN-ZABOTT *et al.*, 2008; Vargas & Ribeiro, 2009).

Outro experimento utilizando a timulina na potência 5cH, via água de bebida, demonstrou que camundongos inoculados na pata com onco-BCG oral (10^6 UFC) apresentaram aumento estatisticamente significativo no desenvolvimento do granuloma subcutâneo quando comparados aos animais do grupo controle. A análise histopatológica qualitativa do material revelou maior celularidade nos granulomas de animais tratados com timulina, sobretudo no que se refere aos fagócitos recém-migrados, enquanto os animais do grupo controle apresentaram menor celularidade, com predomínio de células epitelioides e maior incidência de focos de degeneração celular, portanto, menor *turn-over* celular em relação ao grupo tratado com timulina. Da mesma forma, a reatividade do linfonodo poplíteo

(responsável pela drenagem do tecido subcutâneo da pata inoculada) também se apresentou significativamente maior nos animais tratados, após avaliação histométrica dos folículos linfóides (ZALLA-NETO, 2007).

A partir desses dados idealizamos o presente trabalho, no intuito de propor os prováveis mecanismos regulatórios da resposta imune sob a ação da timulina ultradiluída. Assim, tomando-se os dados obtidos anteriormente com granuloma induzido por BCG, adotamos o mesmo modelo experimental para avaliar a possível participação de células B-1 nesse mecanismo, haja vista que, em interessante estudo desenvolvido na UNIFESP, RUSSO & MARIANO (2010) demonstraram que a célula B-1 é capaz de migrar do peritônio para o foco inflamatório crônico específico (granuloma induzido por BCG) e modular sua evolução.

Analisando-se os dados obtidos, observam-se evidências claras da participação das células B-1 na modulação da lesão granulomatosa pela timulina ultradiluída.

Conforme observado na Figura 4, constata-se dinamismo evidente da cavidade peritoneal e de sua resposta celular a agente infeccioso, mesmo a distância do sítio inflamatório. Essa resposta foi modulada pelo tratamento proposto, sem a interferência do Zn em concentrações imunomoduladoras, pois a incubação da timulina 5cH com Chelex ® não interferiu nos dados observados. É possível que a mobilização das células peritoneais, como, por exemplo, as células B-1, esteja diretamente relacionada ao estímulo remoto (no caso deste estudo, a inoculação de BCG na pata). Os resultados convergem para os encontrados por RUSSO & MARIANO (2010).

O predomínio de fagócitos peritoneais derivados de células B-1 encontrado no grupo tratado com timulina 5cH (Figura 5) sugere a ação da mesma na regulação dos processos de diferenciação das células progenitoras B-1, mesmo que haja a possibilidade de existir variações nas taxas de proliferação ou morte entre as duas subpopulações, ou mesmo de migração para o foco inflamatório. Uma análise das citocinas encontradas no peritônio, a contagem de células B-1 presentes na própria lesão granulomatosa e a utilização de métodos imunohistoquímicos para análise das populações celulares presentes nos granulomas podem dar novas diretrizes para melhor elucidar esse achado. Tais experimentos são previstos para a continuação desta linha de pesquisa.

A queda da população peritoneal de linfócitos CD19+/CD11b+ (células B-1), conforme observado na Figura 6, explicaria a diminuição de linfócitos totais no peritônio. Nesse caso, supõe-se que houve diferenciação das células B-1 em fagócitos B-1 (*B-1 cell derived phagocytes*), como mostrou POPI e colaboradores (2009). O aumento simultâneo de fagócitos CD19+/CD11b+ na cavidade peritoneal corrobora a hipótese. Em relação às células B-2, o grupo tratado com timulina 5cH parece manter essa população constante, enquanto o grupo controle apresenta queda gradativa dessas células, o que seria esperado para um processo inflamatório em evolução. Entretanto, a nítida interferência da incubação prévia da timulina 5cH com Chelex® aparenta a indução de ação anti-inflamatória. O fato sugere mecanismos diferentes da timulina 5cH sobre células B-1 e células B-2. No último caso, não se pode afirmar que o Zn seja o fator responsável pela regulação da população celular, pois apenas traços de Zn foram observados em todas as preparações de timulina, a despeito da presença ou não de Chelex® (Quadro 3). Cogitamos que talvez o Chelex® tenha sequestrado algum outro íon importante para o processo inflamatório. Nova análise das amostras foi enviada ao laboratório CBO - Análises laboratoriais, para avaliação por espectrometria de absorção atômica para os seguintes elementos: Mg, Mn e Ca (Anexos 9, 10 e 11), e os resultados estão apresentados no quadro 5. A presença de maior concentração de Mn na solução de Timulina 5cH é hipótese plausível para explicar estes resultados. Trabalhos com Timulina ultradiluída acima do número de Avogadro estão previstos nesta linha de pesquisa e ajudarão a eliminar tais artefatos. Efeitos inespecíficos, como variações de pH na água de bebida em função dos diferentes tratamentos, também podem ser descartados (Quadro 4).

Os resultados mostrados na figura 7 são de difícil interpretação. À primeira vista, a incubação da timulina 5cH com Chelex® parece ter evitado a diminuição da população de células B-1a, mas não evitou a queda da população de B-1b induzida pelo tratamento com timulina 5cH. Tem-se, aqui, a evidência mais clara de que a timulina 5cH pode atuar por meio de mais de um mecanismo. Sabe-se que as células B-1b se diferenciariam espontaneamente em células fagocíticas, entretanto, alguns autores demonstram que células B-1a se diferenciariam em fagócitos, desde que cultivadas com fibroblastos (BORRELLO & PHIPPS, 1995; 1996; 1999), ou seja, desde que devidamente sinalizadas por mediadores pró-inflamatórios. Somem-se a

isso a ação da timulina 5cH, os diferentes requisitos para o desenvolvimento dessas linhagens celulares, como, por exemplo, a expressão de CD19 e suas diferentes funções na imunidade inata e adaptativa (HAAS *et al*, 2005), e eis um verdadeiro quebra-cabeças.

Nesse caso, a hipótese descrita acima, de que a incubação de timulina 5cH com Chelex ® gera efeitos anti-inflamatórios, ganha mais um argumento a favor, pois somente as células dependentes de tais estímulos (B-1a) tiveram os efeitos da timulina 5cH anulados pelo Chelex®. Contudo, tais dados necessitam de muito mais estudos para serem entendidos plenamente, pois pouco se sabe sobre as funções das células B-1a e B-1b, e as ações da timulina homeopática e quais íons estariam envolvidos nessa modulação. Um estudo mais aprofundado sobre o Mn e sua possível influência sobre o processo inflamatório em questão se faz necessário.

O aumento da reatividade linfóide do baço nos primeiros dias após a inoculação de BCG nos animais tratados com timulina (Figura 8) configura resultado compatível aos anteriormente encontrados por ZALLA-NETO (2007) e SATO (2008), além de mostrar total independência em relação à ação do Chelex ® sobre tal mecanismo. Observando-se os resultados associadamente, vê-se que a ação sistêmica da timulina sobre o baço foi mais evidente nas etapas iniciais da infecção experimental. Em contrapartida, a resposta periférica (peritoneal e no local da lesão) foi mais tardia, sendo mais evidente no 21º dia. Essa característica tempo-dependente sugere sequência de eventos fisiopatológicos ordenados, deflagrados pelo tratamento contínuo com timulina 5cH, oferecida na água de bebida.

A figura 9 mostra maior número de macrófagos positivos para Azul da Prússia no baço dos grupos tratados, e corrobora o resultado anterior. As células B-1 são escassas no baço (OHDAN *et al.*, 2000; KAWAHARA *et al.*, 2003), o que leva a crer que o efeito sistêmico induzido pelos tratamentos pode estar associado à maior atividade fagocitária dos macrófagos residentes nesse órgão. Entretanto, há relatos de que células B-1, quando ativadas, migram da cavidade peritoneal para o baço, onde perdem a expressão de CD11b (KAWAHARA *et al.*, 2003). Sabe-se que as células B-1 possuem a capacidade de se diferenciar em fagócitos mononucleares *in vitro* (ALMEIDA *et al.*, 2001; POPI *et al.*, 2009), ou seja, existe ainda a possibilidade de que esses macrófagos encontrados no baço derivem de células B-1. Amostras de

baço em citometria de fluxo e a utilização de imuno-histoquímica para esse órgão ajudariam a esclarecer melhor a questão.

O resultado da figura 10 mostra a evolução da inflamação granulomatosa em função do tempo. Aos 21 dias, quando o granuloma está em estágio de amadurecimento maior, pode-se inferir que a timulina 5cH manteve o influxo de células para o local da lesão, dada a baixa taxa de mitose local dos macrófagos recém-migrados (RYAN & SPECTOR, 1969; SPECTOR & LYKKE, 1966). O resultado corrobora os achados de ZALLA-NETO (2007), que revelam maior celularidade por causa do influxo de fagócitos recém-migrados para o local da lesão. RUSSO & MARIANO (2010) mostram que as células B-1 migram do peritônio para o foco da lesão induzida por BCG, e, mais do que isso, são essenciais à formação do granuloma. O grupo tratado com timulina 5cH previamente incubada com Chelex® induziu ação anti-inflamatória, bloqueando o efeito da timulina 5cH *per se*, como discutido acima.

A figura 11 mostra que os macrófagos que migraram para o local da lesão foram mais eficientes no processo de fagocitose e digestão do BCG nos animais tratados com timulina 5cH. Em outras palavras, observa-se a remissão da infecção ou o efeito terapêutico da timulina 5cH. Na avaliação de ZALLA-NETO (2007), células mais jovens (monócitos e macrófagos) predominam em relação às células mais velhas (epitelioides) na formação do granuloma induzido por BCG em animais tratados com timulina 5cH. A partir desses resultados, sugere-se maior eficiência na resolução da infecção do grupo tratado.

A análise global dos dados corrobora os obtidos anteriormente sobre o efeito imunomodulador da timulina 5cH, e ainda acrescenta informações importantes à compreensão dos seus mecanismos: o aumento da celularidade na lesão granulomatosa e da intensidade da inflamação deflagrada pela inoculação de BCG parece oscilar por meio de mecanismo de sinalização modulado por substâncias passíveis de serem queladas. Portanto, a interferência do Chelex® em alguns efeitos da timulina parece obedecer a um mecanismo anti-inflamatório clássico. Por outro lado, a diferenciação de células B1 no peritônio e os efeitos sistêmicos da timulina 5cH sobre a reatividade linfóide e atividade fagocítica esplênicas parecem obedecer a mecanismos que independem de tais fatores.

A timulina 5cH, no presente estudo, apresentou mecanismo duplo no controle da evolução da lesão granulomatosa. E ainda, o mais importante foi observar, de forma quantitativa, seu efeito terapêutico – ou sua eficácia – na remissão da infecção.

Quanto à metodologia utilizada, sabe-se que a técnica de citometria de fluxo para a análise dos efeitos de substâncias ultradiluídas é muito adequada a esse tipo de estudo e confere maior credibilidade, pois não depende de análises subjetivas, como a contagem visual de células. A demonstração cabal dos efeitos biológicos das altas diluições de histamina *in vitro* foi o resultado de vários estudos, repetidos ao longo de 23 anos, utilizando essa técnica (POITEVIN *et al.*, 1986; 1988; BROWN & ENNIS, 2001; LORENZ *et al.* 2003; BELON *et al.*, 2004; SAINTE-LAUDY & BELON, 1997; CHIRUMBOLO *et al.*, 2009), a despeito de situações folclóricas geradas em torno do assunto, como acusações de fraude, pareceres emitidos por prestidigitadores profissionais que se diziam “especialistas em fraudes científicas”, oferta de prêmios vultosos em dinheiro no Reino Unido para quem reproduzisse tais resultados e outras histórias.

Os dados aqui apresentados, utilizando a citometria de fluxo como ferramenta essencial, são confiáveis o suficiente para garantir a segurança nos resultados apresentados e dar continuidade a esta linha de pesquisa.

Desde a década de 80, alguns estados e municípios brasileiros passaram a oferecer atendimentos homeopáticos como especialidade médica, dentre outras modalidades de medicina alternativa, aos usuários dos serviços de saúde pública, porém de forma isolada.

Após a implantação do SUS, as consultas homeopáticas cresceram de forma vertiginosa, a taxa anual em torno dos 10%. Em 2006, o Conselho Nacional de Saúde editou a Portaria 971, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, que assegura aos usuários do SUS o acesso às práticas médicas homeopáticas e atende às recomendações da OMS (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Assim, a pesquisa básica para o conhecimento dos mecanismos imunomodulatórios da Timulina ultradiluída tem sua importância aumentada no

sentido de melhor compreender seus efeitos terapêuticos e possíveis aplicações práticas.

7. Conclusão

- Estímulos remotos alteram a composição celular da cavidade peritoneal;
- A alteração dessa composição celular foi modulada pela timulina 5cH sem a interferência do Zn em concentrações imunomoduladoras;
- O processo imunopatológico induzido por BCG e modulado pela timulina está associado a mecanismos de diferenciação de células B-1 em fagócitos;
- A timulina 5cH exerce efeitos de modo sistêmico e local.

8. Referências Bibliográficas

- ADAMS, D. O. The structure of mononuclear phagocytes differentiation "*in vivo*". 1. Sequential fine and histological studies of the effect of Bacillus Calmette-Guerin (BCG). **Amer. J. Path.**, v. 76, p. 17-48, 1974.
- AGUEJOUF O, BELOUGNE-MALFATI E, DOUTREMEPUICH F, BELON P, DOUTREMEPUICH C. Tromboembolic complications several days after a single-dose administration of aspirin. **Thromb. Res.** 1998;89(3):123-7.
- AGUEJOUF O, MALFATTI E, BELON P, DOUTREMEPUICH C,. Time related neutralization of two doses acetyl salicylic acid. **Thromb. Res.** 2000;100(4):317-23.
- ALMEIDA, S. R.; AROEIRA, L. S.; FRYMULLER, E.; DIAS, M. A.; BOGSAN, J. D. *et al.* Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **Int. Immunol.** v. 13, p. 1193-1201, 2001.
- ANDRIOLI G, LUSSIGNOLI S, ORTOLANI R, MINUZ P, VELLA F, BELLAVITE P. Dual effects of diclofenac on human platelet adhesion in vitro. **Blood Coagul Fibrinolysis.** 1996;7(2):153-6.
- AONO, H. Amelioration of type II collagen induced arthritis in rats by treatment with thymulin. **J. Rheumatol.**, v.24, p. 1564-9, 1997.
- BACH, J. F.; DARDENNE, M.; PLEAU, J. M.; BACH, M. A. Isolation, biochemical characteristics and biological activity of a circulating thymic hormone in the mouse and in the human. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** V. 249,p. 186-210, 1975.
- BARBOUR, E. K.; HAMADEH, S. K.; BEJJANI, N. E.; FAROON, O. M.; EID, A.; SAKR, W.; BOULJIHAD, M.; SPASOJEVIC, R.; SAFFIEH-GARABEDIAN, B. Immunopotential of a Developed *Salmonella enterica* serotype Enteritidis Vaccine by Thymulin and Zinc in meat Chicken Breeders. **Vet. Res. Com.**, v.25, p. 437- 47, 2001.

BASTIDE, M. Interpretative Theories about Ultra-Dilutions: Supporting Evidences. **Cultura Homeopática**, v. 16, p. 22-30, 2006.

BASTIDE, M.; DAURAT, V.; DOUCET-JABOEUF, M.; PELEGRIN, A.; DORFMAN, P. Immunomodulatory activity of very low doses of thymulin in mice. **Int. J. of Immunotherapy**, v. 3, p. 191-200, 1987.

BASTIDE, M.; DOUCET-JABOEUF, M.; DAURAT, V. Activity and chronopharmacology of very low doses of physiological immune inducers. **Immunol. Today**, v.6, p. 234-235, 1985.

BAUNGARTH, N.; TUNG, J. W.; HERZEMBERG, L. A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. **Springer Semin. Immunopathol.**, v. 26, p. 347-362, 2005.

BELON P, CUMPS J, ENNIS M, et al. Histamine dilutions modulate basophil activation. **Inflamm Res.** V.53(5):181-8, 2004.

BELON P, CUMPS J, ENNIS M, et al. Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions: results of a European multi-centre trial. **Inflamm Res.** 1999;48(Suppl 1):S17-8.

BEVING H, EKSBERG S, MALMGREN RS, NORDLANDER R, RYDÉN L, OLSSON P. Inter-individual variations of the effect of low dose aspirin regime on platelet cyclooxygenase activity. **Thromb Res.** 1994;74(1):39-51.

BIRMAN, E. G.; MARIANO, M. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. **Braz. J. med. Boil. Res.**, v. 18, p. 507-512, 1985.

BOGSAN, C. S.; NOVAES e BRITO, R. R.; PALOS MDA, C.; MORTARA, R.A.; ALMEIDA, S. R.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. B-1 cells are pivotal for in vivo inflammatory giant cell formation. **Int. J. Exp. Pathol.** v. 86, p. 257-265, 2005.

BONAMIN, L. V. Review of Veterinary Publications. In: XVIII Symposium of GIRI - ECH General Assembly, 2004, Bruxelas. **Annals of the XVIII Symposium of GIRI**, 2004.

BONAMIN LV.; LAGACHE A.; BASTIDE M. Research on ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: the follow up. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research**. Dordrecht, Springer. 2008. p.9-43.

BONAMIN, L. V. Dados Experimentais que Fundamentam Teorias Interpretativas sobre Ultradiluições. Tributo a Madeleine Bastide. **Cultura homeopática**, v.21, p.29-35, 2007.

BONAMIN, L. V. Sinais e Imagens: O Legado de Madelaine Bastide. **Revista de Homeopatia**. V. 72, p. 5- 8, 2009.

BONAMIN, L. V.; ENDLER, P. C. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review. **Homeopathy**. V.99, p. 37-50,2010.

BORRELLO, M. A.; PHIPPS, R. P. Fibroblasts support outgrowth of splenocytes simultaneously expressing B lymphocyte and macrophage characteristics. **J. Immunol**. V.155, p. 4155-61, 1995.

BORRELLO, M. A.; PHIPPS, R. P. The B/macrophage cell: an elusive link between CD5+ B lymphocytes and macrophages. **Immunology Today**. V. 17, p. 471-475, 1996.

BORRELLO, M. A.; PHIPPS, R. P. Fibroblast-Secreted Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Responsible for Generation of Biphenotypic B/Macrophage Cells from a Subset of Mouse B Lymphocytes. **The Journal of Immunology**. V. 163, p. 3605-3611, 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União. Brasília, 4 de maio de 2006; Seção 1, p. 20.

BROWN, O. A. Growth hormone-releasing activity of thymulin on pituitary somatotropes is age dependent. **Neuroendocrinology**, v. 69, p. 20-27, 1999.

BROWN, O. A. Studies on the gonadotrophin-releasing activity of thymulin: changes with age. **J. Gerontology A. Biol. Sci.**, v.55, p.B170-6, 2000.

BROWN, O. A. Thymulin stimulates prolactin and thyrotropin release in an age-related manner. **Mech. Ageing Dev.**, v. 104, p. 249-262, 1998.

BROWN, V.; ENNIS, M. Flow-cytometric analysis of basophil activation: inhibition by histamine at conventional and homeopathic concentrations. **Inflamm Res.** 2001; 50(Suppl 2):S47-8.

CALENDA, A.; CORDONNIER, A.; LEDERER, F.; *et al.* Production of biologically active thymulin in *Escherichia coli* through expression of a chemically synthesized gene. **Biotechnol.**, v. 10, p. 155-160, 1988.

CARMINE TC. Effects of high potencies of tumor necrosis factor alpha on H₂O₂ production in cultured neuroblastoma cells by enhanced luminol-dependent chemiluminescence (ECL). **British Homeopathic Journal**, v.86, p.67–72, 1996.

CHANDRATILLEKE, D.; MARSH, J. A. The effect of thymulin on avian IL -2 receptor expression. **Int. J. Immunopharmacol.**, v.22,p. 887-96, 2000.

CHIRUMBOLO, S.; BRIZZI, M.; ORTOLANI, R.; VELLA, A.; BELLAVITTE, P. Inhibition of CD203c membrane up-regulation in human basophils by high dilutions of histamine: a controlled replication study. **Inflamm. Research**. V. 58, p. 755-764, 2009.

COELHO, C. P., D' ALMEIDA, V., PEDRAZOLLI NETO, M., DURAN-FILHO, C., FLORIO, J. C., ZINCAGLIA, L. M. C., BONAMIN, L. V. Therapeutic and Pathogenic animal models for *Dolichos pruriens*. **Homeopathy**, v. 95, p. 136-143, 2006.

COELHO, K. I. R. Granulomas. In MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 153-161.

CONSOLINI, R. Circulating thymic hormone activity in Young câncer patients. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 66, p. 173-180, 1986.

CONSOLINI, R.; LEGITIMO, A.; CALLERI, A.; MILANI, M. Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, p. 444-447, 2000.

CONSOLINI, R.; LEGITIMO, A.; MILANI, M. Primary thymic endocrine failure in HIV-1 infected children. **Pathobiology**, v. 68, p. 251-257, 2000b.

CRISTEA A, NICULA S, DARIE V. Pharmacodynamic effects of very high dilutions of Belladonna on the isolated rat duodenum. In: Bastide M (Ed). **Signals and Images**. Dordrecht: Kluwer; 1997 (a). p. 161-170.

DANTAS, F. How can we get more reliable information from homeopathic pathogenetic trials? **Br Homeopath J**. 1996;85:230-6.

DARDENNE, M; PLÉAU, JM.; NABARRA, B.; LEFRANCIER, P. ; DERRIEN, M. ; CHOAY, J. ; BACH, JF. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 79, p. 5370-5373, 1982.

DARDENNE, M. Role of thymic peptides as transmitters between the neuroendocrine and immune systems. **Ann. Med. Suppl.** 2, p. 34-39, 1999.

DARDENNE, M.; SAADE, N.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Role of thymulin or its Analogue as a new Analgesic Molecule. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1088, p. 153-163, 2006.

DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**. V. 264, p. 1415-1421, 1994.

DAURAT, V.; CARRIÈRE, V.; DOUYLLIEZ, C.; BASTIDE, M. Immunomodulatory activity of thymulin and alpha, beta interferon on the specific and nonspecific cellular response of C56BL and NBZ mice. **Immunobiology**, v. 173, p. 188, 1988.

DAVENAS, E.; BEAUVAIS, F.; AMARA, J.; *et al.* Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. **Nature**. 1988;333(6176):816-8.

DOUCET-JABOEUF, M.; PELEGRIN, A.; COT, M. C.; GUILLEMAIN, J.; BASTIDE, M. Seasonal variations in the humoral immune response in mice following administration of thymic hormones. **Annual Review of Chronopharmacology**, v. 1, p. 231-234, 1984.

DOUTREMEPUICH, C.; AGUEJOUF, O.; PINTIGNY, D.; SERTILLANGES, M.N.; DE SEZE, O. Thrombogenic properties of ultra-low-dose of acetylsalicylic acid in a vessel model of laser-induced thrombus formation. **Thromb Res**. 1994; 76(2):225-9.

DOUTREMEPUICH, C.; DE SÈZE, O.; LE ROY, D.; LALANNE, M.C.; ANNE, M.C. Aspirin at very ultra low dosage in healthy volunteers: effects on bleeding time, platelet aggregation and coagulation. **Haemostasis**. 1990;20(2):99-105.

ENDLER, P. C., LUDTKE, R., HECKMANN, C., ZAUSNER, C., LASSING, H., SCHERER-PONGRATZ, W., HAIDVOGL, M. Pretreatment with thyroxine (10^{-8} parts by weight) enhances a "curative" effect of homeopathically prepared thyroxine (10^{-1}) on lowland frogs. **Forsch Komplementarmed Naturheild**, v.10, p. 137-142, 2003.

ENDLER, P. C.; PONGRATZ, W.; KASTBERGER, G.; WIEGANT, F.A.; SCHULTE, J. The effect of highly diluted agitated thyroxine on the climbing activity of frogs. **Vet Hum Toxicol**. 1994; 36(1):56-9.

ENDLER, P. C.; THIEVES, K.; MATTHIESSEN, P.; BONAMIN, L. V.; SCHERR, C.; BAUNGARTNER, S. Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10^{-23} : a bibliometric study. **Homeopathy**. V. 99, p. 25-36, 2010.

ENDLER, P.C.; PONGRATZ, W.; SMITH, C. W.; SCHULTE, J. Non-molecular information transfer from thyroxine to frogs with regard to homeopathic toxicology. **Vet Hum Toxicol**. 1995;37(3):259-60.

EPSTEIN, W. L. 1983. Granulomatous inflammation in skin, p. 21-59. In H.L. Ioachim, **Pathology of Granulomas**, Raven Press, New York.

FABRIS, N.; MOCCHEGIANI, E.; PROVINCIALI, M. Plasticity of neuro-endocrine-thymus interaction during aging- a minireview. **Cell Mol. Biol.**, v. 43, p. 529-541, 1997.

FILLIAT, C. Particularité de l' utilisation de l' homeopathie en production avicole. In: **Annals of the Entretiens Internationaux de Monaco**, 2002, Monte Carlo. Abstracts. Monte Carlo, 2002.

FISHER P, DANTAS F. Homeopathic pathogenetic trials of Acidum malicum and Acidum ascorbicum. **Br Homeopath J**. 2001;90(3):118-25.

FOLCH, H.; OJEDA, F.; ESQUIVEL, P. Rise in thymocyte number and thymulin serum level induced by noise. **Immunol. Lett.**, v. 30, p. 301-305, 1991.

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

GARCIA, L.; HINOJOSA, L.; DOMINGUEZ, R.; CHAVIRA, R.; ROSAS, P. Effects of infantile thymectomy on ovarian functions and gonadotrophin-induced ovulation in prepuberal mice: role of thymulin. **J. Endocrinol.**, v. 166, p. 381-387, 2000.

GARCIA-BRAVO, M. M.; POLO, M. P.; REGGIANI, P. C.; *et al.* Partial prevention of hepatic lipid alterations in nude mice by neonatal thymulin gene therapy. **Lipids**, v. 41, p. 753-757, 2006.

GHOSN, E. E., YANG, Y., TUNG, J., HERZEMBERG, L. A. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 105, p. 5195-5200, 2008.

GIACCONI, R.; CIPRIANO, C.; MUZZIOLI, M.; GASPARINI, N., ORLANDO, F.; MOCCHEGIANI, E. Interrelationships among brain, endocrine and immune response in ageing and succesful ageing: role of metallothionein III isoform. **Mech. Ageing Dev.**, v. 124, p. 371-378, 2003.

GOYA, R. G.; BROWN, O. A.; PLEAU, J. M.; DARDENNE, M. Thymulin and the neuroendocrine system. **Peptides**, v. 25, p. 139-142, 2004.

GOYA, R. G.; REGGIANI, P.C.; VESENBECKH, S. M., *et al.* Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficient mice. **Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.**, v. 293, p. 182-187, 2007.

GUAJARDO- BERNAL, G.; SEARCY- BERNAL, R.; SOTO- AVILA, J. Growth-promoting effect of Sulphur 201c in pigs. **British Homeopathic Journal**, v.85, p. 15-6, 1996.

GUEDES, J. R. P. **Glândula tireoidiana de Rana catesbeiana em ultradiluição homeopática altera a velocidade de metamorfose de girinos da mesma espécie** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.

GUENOUN, M.; BOUDARD, F.; CABANER, C.; ROBBE, Y.; DUBOIS, J. B.; BASTIDE, M. Radioprotection and immune system regeneration of irradiated mice by using high dilution treatment. **Chronobiology International**, v. 14(Suppl.1), p.60, 1997.

GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de Patologia Geral**. São Paulo: Santos, p.121, 1997.

HADDAD, J. J.; SAADE, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Thymulin: An emerging anti-inflammatory molecule. **Current Medicinal Chemistry**, v.4, p. 333-38, 2005.

HADLEY, A. J.; RANTLE, C. M.; BUCKINGHAM, J. C. Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. **Neuroimmunomodulation**, v. 4, p. 62-69, 1997.

HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. CD 5 B cells, a fetal B cell lineage. **Adv. Immunol.** V. 55, p. 401-411, 2003.

HAAS, K. M.; POE, J. C.; STEEBER, D. A.; TEDDER, T. F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. **Immunity**. V. 23, p. 7-18, 2005.

HAUGHTON, G.; ARNOLD, L. W.; WHITMORE, A. C.; CLARKE, S. H. B-1 cells are made, not born. **Immunol. Today**. V. 14, p. 84-87, 1993.

HEAD, G. H. Rapid progesterone actions on thymulin-secreting epithelial cells cultured from rat thymus. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 31-38, 1999.

HERZEMBERG, L. A. B-1 cells: the lineage question revisited. **Immunol. Rev.**, v. 175, p. 9-21, 2000.

HERZEMBERG, L. A.; TUNG, J. W. **Unraveling B-1 progenitors**. Curr. Opin. in Immunol., v. 19, p. 1-6, 2007.

HINOJOSA, L.; CHAVIRA, R.; DOMINGUEZ, R.; ROSAS, P. Effects of thymulin on spontaneous puberty and gonadotrophin-induced ovulation in pubertal normal and hypothyroid mice. **J. Endocrinol.**, v. 163, p. 255-260, 1999.

HIRAI, N. Effect of administration of serum Thymic factor (FTS) in calves and rabbits infected with bovine immunodeficiency- like virus. **J. Vet. Sci.** , v.57, p. 307-10, 1995.

INAGAKI-OHARA, K. Effects of a nonapeptide thymic hormone on intestinal intraepithelial lymphocytes in mice following administration of 5-fluorouracil. **Cell Immunol.**, v. 171, p. 30-40, 1996.

KALLEN, B. Effect of cyclophosphamide pretreatment on autoimmune encephalomyelitis in rats. **Acta Neurol. Scand.**, v. 73, p. 338-44, 1986.

KANAAN, S. A. Thymulin reduces the hyperalgesia and cytolytic upregulation induced by cutaneous leishmaniasis in mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 16, p. 450-460, 2002.

KANTOR, A. B.; HERZEMBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. **Ann. Rev. Immunol.** V. 11, p. 501-538, 1993.

KANTOR, A. B.; MERRIL, C. E.; HILLSON, J. L. An unbiased analysis of V(H)-D sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. **J. Immunol.**, v. 158, p. 1175-1186, 1997.

KANTOR, A. B.; Stall, A. M.; ADAMS, S.; HERZEMBERG, L. A. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3320-3324, 1992.

KAWAHARA, T.; OHNAN, H.; YANG, Y. G.; SYKES, M. Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells. **J. Immunol.** V. 171, p. 5406-5414, 2003.

KAWAKAMI, A. P.; SATO, C.; CARDOSO, T. N.; BONAMIN, L. V. Inflammatory Process Modulation by Homeopathic Arnica Montana 6CH: The Role of Individual Variation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V.2011, p.12, 2010.

KOSAKA, T. Activation of canine monocytes and polymorphonuclear cells by serum thymic factor (FTS) in vivo. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 58, p. 323-327, 1996.

LEDRU, E.; LEDRU, S.; ZOUBGA, A. Granuloma formation and tuberculosis transmission in HIV-infected patients. **Immunol. Today**, v. 20, p. 336-337, 1999.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; ROMANHA, W. S.; PACHECO, R. G.; MARIANO, M.; LENZI, J. A. Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 141-151, 1998.

LINDE, K.; JONAS, W. B.; MELCHART, D.; WORKU, F.; WAGNER, H.; EITEL, F. Critical review and meta-analysis of serial agitated dilutions in experimental toxicology. **Hum. Exp. Toxicol.** V. 13, p. 481-492, 1994.

LORENZ, I.; SCHNEIDER, E. M.; STOLZ, P.; STRUBE, J. Influence of the diluent on the effect of highly diluted histamine on basophil activation. **Homeopathy**. V.92, p. 11-18, 2003.

LUZ, M.T. **A arte de curar versus a ciência das doenças: história social da homeopatia no Brasil**. São Paulo: Dynamis Editorial; 1996.

MADDOX, J.; RANDI, J.; STEWART, W.W. "High-dilution" experiments a delusion. **Nature**. 1988;334(6180):287-91.

MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 37, p. 161-176, 1995.

MARSH, J. A., MERLINO, P. G., STAEHELI, P. The effects of triiodothyronine and thymulin on avian NK cytolytic activity. **Int. J. Immunopharmacol.**, v.1, p.1823-30, 2001.

MERLINO, P. G.; MARSH, J. A. Evidence for the direct action of thymulin on avian NK cells. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 25, p. 337-43, 2001a.

MERLINO, P. G.; MARSH, J. A. The enhancement of avian NK cells. **Dev. Comp. Immunol.**, v.25, p.337-343, 2001b.

MIRANDA, A. R. Water and High Dilutions Phenomenology: Physical Characterization. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research**. Dordrecht, Springer. 2008. p.49-65.

MOCCHEGIANI, E. Melatonin administration in tumor-bearing mice (intact and pinealectomized) in relation to stress, zinc, thymulin and IL-2. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 21, p. 27-46, 1999.

MOCCHEGIANI, E. Recovery of low Thymic hormone levels in cancer patients by lysine-arginine combination. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 12, p. 365-371, 1990.

MOLINERO, P.; SOUTO, M.; BENOT, S.; HMADCHA, A.; GUERRERO, J. M. Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin and thymulin concentrations: observations in rats and humans. **Journal of Neuroimmunology**. V. 103, p. 180-188(9), 2000.

MONTAGNIER, L.; AÏSSA, J.; FERRIS, S.; MONTAGNIER, JL.; LAVALÉE, C. Electromagnetic signals are produced by aqueous nanostructures derived from bacterial DNA sequences. **Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.** v. 1, p. 81-90, 2009.

MONTAGNIER, L.; AÏSSA, J.; LAVALÉE, C.; MBAMY, M.; VARON, J.; CHENAL, H. Eletromagnetic detection of HIV DNA in the blood of AIDS patients treated by antiretroviral therapy. **Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.** v. 1, p. 245-253, 2009.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.; DORSHKIND, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. **Nat. Immunol.** V. 7, p. 293-301, 2006.

MOREL, G. R.; BROWN, O. A. ; REGGIANI, P. C.; HERENU, C. B.; PORTIANSKY, E. L.; ZUCCOLILLI, G. O.; PLEAU, J. M.; DARDENNE, M.; GOYA, R. G. Peripheral and mesencephalic transfer of a synthetic gene for the thymic peptide thymulin. **Brain Res. Bull.**, v. 69, p. 647-651, 2006.

MOUSA, A.S.; FORSYTHE, M.S.; BOZARTH, J.M.; REILLY, T.M. Effect of single oral dose of aspirin on human platelet functions and plasma plasminogen activator inhibitor-1. **Cardiology**. 1993; 83 (5-6):367-73.

OHDAN, H. ; SWENSON, K. G.; KRUGER GRAY, H. S.; YANG XU, Y.; THALL, A. D. *et al.* Mac-1-negative B-1b phenotype of natural antibody-producing cells, including those responding to Gal alpha 1,3Gal epitopes in alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient mice. **J. Immunol.**, v.165, p. 5518-5529, 2000.

OLIVEIRA, H. C.; POPI, A. F.; BACHI, A. L.; NONOGAKI, S.; LOPES, J. D., MARIANO, M. B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. Immunobiology. **Immunobiology**. In press. 2009.

ORRINGER, D. A.; STAEHELI, P., MARSH, J. A. The effects of thymulin on macrophage responsiveness to interferon-gamma. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 26, p. 95-102, 2002.

PALMIERI, F.; PELLICELLI, A. M.; GIRARDI, E.; DE FELICI, A. P.; DE MORI, P.; PETROSILLO, N.; IPPOLITO, G. Negative predictors of survival in HIV-infected patients with culture-confirmed pulmonary tuberculosis. **Infection**, v. 27, p. 331-334, 1999.

PIMENTEL, J. L.; COOK, M. E.; GREGER, J. L. Immune responses of chickens fed various levels of zinc. **Poultry Science**. v. 70, p.947-954, 1991.

POITEVIN B., AUBIN M., BENVENISTE J. Approche analytique quantitative de l'effet d'Apis mellifica sur la dégranulation des basophiles humains *in vitro*. **Innovation et Technologie en Biologie et Médecine**, v.7, p.64-68, 1986.

POITEVIN B., DAVENAS E., BENVENISTE J. *In vitro* immunological degranulation of human basophils is modulated by Lung histamine and Apis mellifica". **Brit J Clin Pharmacol**. v.25, p.439-444, 1988.

POPI, A. F.; MOTTA, F. L. T.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes *in vitro*. **Immunology**. V. 126, p. 114-122, 2008.

REGGIANI, P. C.; BARBEITO, C. G.; FLAMINI, M. A.; *et al.* **Neonatal thymulin gene therapy prevents the characteristic ovarian atrophy of adult nude mice**. Presented at the seventh meeting of the International Society for Neuroimmunomodulation. Rio de Janeiro, Brazil, 2008.

REGGIANI, P. C.; HERÑÚ, C. B.; RIMOLDI, *et al.* Gene therapy for long-term restoration of circulating thymulin in tymectomized mice and rats. **Gene Ther.**, v. 13, p. 1214-1221, 2006.

ROCHA, M. P. S.; SOARES, F. M.; MARTINI, L. C.; BONAMIN, L. V. Behavior of rats treated with *Rhus toxicodendron* 200cH. **Int. J. of High Dil. Research**. V. 7, p. 3-6, 2008.

RUIZ-VEGA, G.; ESTEVEZ-SALGADO, G. Non-linearity modeling of Ultra dilutions: the histamine disturbance case. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research**. Dordrecht, Springer. 2008. p. 67-82.

RUSSO, R. T.; MARIANO, M. B-1 cell protective role in murine primary Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection. **Immunobiology**. V. 215, p. 1005-1014, 2010.

RUTTEN, A. L. B. Bayesian homeopathy: talking normal again. **Homeopathy**. V. 96, p. 120-124, 2007.

RYAN, G. B.; SPECTOR, W. G. Natural selection of long-lived macrophages in experimental granuloma. **J. Path.**, v. 99, p. 136-139, 1969.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. Potent analgesic and anti-inflammatory actions of a novel thymulin-related peptide in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 947-955, 2002.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. The role of cytokines and prostaglandin-E2 in thymulin induced hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v. 29, p. 1653-1661, 2000.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; JALAKHIAN, R. H.; SAADE, N. E.; HADDAD, J. J.; JABBUR, S. J.; KANAAN, S. A. Thymulin reduces hyperalgesia induced by peripheral endotoxin injection in rats and mice. **Brain Research**, v. 717, p. 179-183, 1996.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; OCHOA-CHAAR, C. I.; POOLE, S.; MASSAD, C. A.; ATWEH, S. F.; JABBUR, S. J.; SAADE, N. E. Thymulin reverses inflammatory hyperalgesia and modulates the increase concentration of proinflammatory cytokines induced by i.c.v. endotoxin injection. **Neuroscience**, v. 121, p. 865-73, 2003.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokine-mediated or direct effects of thymulin on the nervous system as assessed by pain-related behavior. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 39-44, 1999.

SAINTE-LAUDY, J. Modulation of allergen and anti-IgE induced human basophil activation by serial histamine dilutions. **Inflamm Res**. 2000;V.49, p.5-6, 2000.

SAINTE-LAUDY, J. Standardization of basophil degranulation for pharmacological studies. **J. Immunol. Methods**. V. 98, p. 279-282, 1987.

SAINTE-LAUDY, J.; BELON, P. Improvement of flow cytometric analysis of basophil activation inhibition by high histamine dilutions. A novel basophil specific marker CD203c. **Homeopathy**. V. 95, p.3-8, 2005.

SAINTE-LAUDY, J.; BELON, Ph. Inhibition of basophil activation by histamine: a sensitive and reproducible model for the study of biological activity of high dilutions. **Homeopathy**. V. 98, p. 186-197, 2009.

SAINT-LAUDY, J.; BELON, P Application of flow cytometry to the analysis of the immunosuppressive effect of histamine dilutions on human basophil activation: effect of cimetidine. **Inflamm Res**. V.46, p.27-28, 1997.

SAINT-LAUDY, J.; BELON, P. Analysis of immunosuppressive activity of serial dilutions of histamine on human basophil activation by flow cytometry. **Inflamm Res**. V.45, p.33-34, 1996.

SAITOH, N.; AWAYA, A.; SAKUDO, A. SUNGWOOK, S.; SAEKI, K.; MATSUMOTO, Y.; ONODERA, T. Serum thymic factor prevents LPS-induced pancreatic cell damage in mice via up-regulation of Bcl-2 expression in pancreas. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, p.629-638, 2004.

SANTARELLI, ET, L.; BRACCI, M.; MOCCHEGIANI, E. Influence of Mercury on thymulin production: metallothioneins role. **G. Ital. Med. Lav. Ergon.**, v. 27, p. 335-338, 2005.

SATO, C. **Desenvolvimento de frangos de corte tratados com timulina dinamizada homeopaticamente**. Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária. São Paulo, UNIP. 2008. 66 p.

SAVINO, W. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. II. Stimulatory effects of endogenous opioids on thymulin production by cultured human and murine thymic epithelial cells. **Life Sci.**, v. 46, p. 1687-1697, 1990.

SHANG, A.; HUWILER- MÜNTNER, K.; NARTEY, L.; JÜNI, P.; DÖRIG, S.; STERN, J. A. C.; EGGER, M. Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homeopathy and allopathy. **Lancet**. V. 366, p. 726-732, 2005.

SIQUEIRA C, MOTTA PD, BONAMIN LV, COUCEIRO JN, HOLANDINO C. Avaliação de soluções aquosas homeopáticas de vírus influenza H3N2 administradas oralmente a camundongos Balb-c: um estudo cego randomizado. **Anais do XXX Congresso Brasileiro de Homeopatia**, Recife, 22-27 de novembro, 2010.

SOTO, F. R. M.; VUADEN, E. R.; COELHO, C. P.; BONAMIN, L. V.; AZEVEDO, S. S.; BENITES, N. R. Uso de medicação homeopática para redução da mortalidade em leitões por doenças infecciosas na fase de creche em uma granja comercial de suínos. **Veterinária e Zootecnia**. 15, p. 335-339, 2008.

SOTO, F. R. M.; VUADEN, E. R.; COELHO, C. P.; BONAMIN, L. V.; AZEVEDO, S. S.; BENITES, N. R. Efeito da *Avena sativa* CH6 no metabolismo do sêmen diluído de suínos. **Veterinária e Zootecnia**. V. 16, p. 367-372, 2009.

SPECTOR, W. G. & MARIANO, M. Macrophage behaviour in experimental granulomas. In: FURTH, R. **Mononuclear phagocytes in immunity infection and pathology**. Oxford, Blackwell, 1975. p. 959-968.

SPECTOR, W. G.; LYKKE, A. W. The cellular evolution of inflammatory granulomata. **J. Path. Bact.**, v. 92, p. 163-167, 1966.

SPRIETSMA, J. E. Zinc-controlled Th1/Th2 switch significantly determines development of diseases. **Med. Hypotheses**, v.49, p. 1-14, 1997.

STALL, A.; WELLS, S.; LAM, K. P. B-1 Cells: unique origins and functions. **Seminars in Immunology**, v. 8, p. 45-59, 1996.

TEIXEIRA, M. Z. Panorama da pesquisa em homeopatia: iniciativas, dificuldades e propostas. **Diagn. Tratamento**, v. 9, p. 93- 104, 2004.

TEIXEIRA, M.Z. **Semelhante cura semelhante: o princípio de cura homeopático fundamentado pela racionalidade médica e científica**. São Paulo: Editorial Petrus; 1998.

TEIXEIRA, M.Z. Similitude in modern pharmacology. **Br Homeopath J.** 1999;88(3):112-20.

TIZARD, I. R. Defeitos imunológicos secundários. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Rocca, 2002, p. 463-477.

TOLEDO, R. L. **Associação timulina-isoterápico de ciclofosfamida no tratamento de camundongos portadores de tumor de Erlich**. 2005. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, São Paulo.

VALENTINO, M.; SANTARELLI, L.; PIERAGOSTINI, E.; SOLEO, L.; MOCCHEGIANI, E. In vitro inhibition of thymulin production in mercury-exposed thymus of young mice. **Sci. Total Environm.**, v. 270, p. 109-112, 2001.

VALENTIN-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. R.; PIAU JR, R.; TORRES, M. B. A.; RONNAU, M.; SOUZA, J. C. Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. **Homeopathy**. V. 97, p. 190-195, 2008.

VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. Homeopatia populacional em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*. In TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. EMBRAPA, Amapá, Macapá, 2009.

VARSHNEY, J. P., NARESH, R. Evaluation of a homeopathic complex in the clinical management of udder diseases of riverine buffaloes. **Homeopathy**, v. 93, p. 17-20, 2004.

VIGNA, A. F.; ALMEIDA, S. R.; XANDER, P.; FREIMÜLLER, E.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 589-597, 2006.

WASSENHOVEN, M. V. Evidence of effectiveness of homeopathy. **Cultura Homeopática**, v. 20, p. 27-31, 2007.

WEBER, S.; ENDLER, P. C.; WELLES, S. U.; SUANJAK-TRAIDL, E.; SCHERER-PONGRATZ, W.; FRASS, M.; SPRANGE, H.; PEITHNER, G.; LOTHALLER, H. The Effect of Homeopathically Prepared Thyroxin (10^{-30} Parts by Weight) on Highland Frogs: Influence of Electromagnetic fields. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research**. Dordrecht, Springer. 2008. p.137-149.

WILLIAMSON, A. V.; MACKIE, W. L.; CRAWFORD, W.J; RENNIE, B. A study using Sepia 200c given prophylactically postpartum to prevent anoestrus problems in the dairy cow. **British Homeopathic Journal**, v.80, p. 149-156, 1991.

YASUDA, J.; NISHIOKA, W.; SAKUDO, A.; YAMA, S.; SETOGUCHI, R.; SAEKI, K.; MATSUMOTO, Y.; ONODERA, T. Supressor mechanism of serum thymic factor on tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in the mouse pancreatic beta-cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 311, p. 501-505, 2003.

YOUBICIER-SIMO, B. J.; BOUDARD, F.; GUELLATI, M.; MEKAOUCHE, M.; BAYLÉ, J. D.; BASTIDE, M. The role of the Bursa de Fabricius and highly dilute bursin in immunoendocrine interactions in the chickens. In: M. Bastide (Ed). **Signal and Images**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1997. p. 111-121.

YOUBICIER-SIMO, B. J.; BOUDARD, F.; MEKAOUCHE,.; BASTIDE, M.; BAYLÉ, J. D. Effects of embryonic bursectomy and *in ovo* administration of highly diluted bursin on adrenocorticotropic and immune responses of chickens. **Int. J. Immunotherapy**, v. 9, p. 169-180,1993.

YOUBICIER-SIMO, B. J.; BOUDARD, F.; MEKAOUCHE,.; BAYLÉ, J. D.; BASTIDE, M. A role for Bursa Fabricii and bursin in the ontogeny of pineal biosynthetic activity in the chicken. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 35-43,1996.

ZACHARIAS, C. R. Theoretical and Phisical-Chemical Models for Dynamized Systems: Validation Criteria. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research**. Dordrecht, Springer. 2008. p.29-36.

ZALLA-NETO, R. **Efeitos da timulina ultradiluída na resposta linfoide e evolução granulomatosa induzida por BCG**. Mestrado em Medicina Veterinária – Imunopatologia, dissertação. São Paulo, UNIP. 2007. 55p.

Anexos

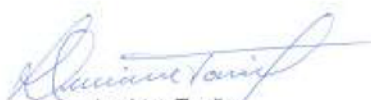
Anexo 1



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 007/10 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Efeitos da Timulina 5cH na lesão granulomatosa induzida por BCG: participação de células B1", sob a responsabilidade de LEONI VILLANO BONAMIN, CESAR SATO, THAYNÁ NEVES CARDOSO e NATASHA TSCHEGE CAMARGO, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 13 dias do mês de maio de 2010.



Luciene Tauil
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa da UNIP



Campus: INDIANÓPOLIS
Rua: Doutor Bacelar, 1212 – Vila Clementino – São Paulo – SP – CEP: 04026-000
Fone: (11) 5586-4090 – Fax: (11) 5586-4073
E-mail: cep@unip.br – <http://www.unip.br>

Anexo 2

LABORATOIRES
BOIRON

DIRECTION CONTRÔLE QUALITÉ
Le 27 mai 2002

FACTEUR THYMIQUE SÉRIQUE POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES

CERTIFICAT D'ANALYSE n° 06010021	Fournisseur : <u>Boiron</u>	Quantité : <u>50 kg</u>
	Date de réception : <u>01.08.02</u>	Référence : <u>2554885-E</u>

	CARACTÉRISTIQUES	NORMES	RÉSULTATS
CARACTÈRES	Poudre blanche, soluble dans l'eau	conforme	<u>conforme</u>
IDENTIFICATION	Spectre infrarouge	identique au témoin	<u>absence de cristaux de lactose</u>
DOSAGE	Teneur en facteur thymique sérique	96 % à 100 %	<u>99,66 %</u>
SPÉCIFICATIONS	BOIRON, Mai 1999		
ANALYSÉ PAR			<u>C. Debrand</u>
DATE D'ANALYSE			<u>26.01.02</u>
CONCLUSION			

ACCEPTÉ	☒
REFUSÉ	☐

Nous certifions que ce produit a été contrôlé et qu'il répond aux spécifications exigées.

Le Pharmacien,
Responsable du Contrôle

Anexo 3



Certificado de Ensaio

Amostra: 311001586

Marca : Profis. Ona. Leon/Villand Bonamin Corante : Profis. Ona. Leon/Villand Bonamin Endereço : Av. José Maria Whitaker, 290 Produto : Alcool 70% Remissor : Não informado Data Produção : Data Receção : 19/1/2011	RUFESP Soliciante : LEONIL V. BONAMIN Cidade : São Paulo Controle : Quantidade : Data Coleta : Data Início : 19/1/2011	Zona : RP : Data Envio : 17/1/2011 Data Liberação : 12/2/2011
--	--	--

Antes	Unidade	Resultado	Padrão
			Mínimo Máximo
Zinco	µg/mL	0,04	
Bromatada			
Cliente	Produto: Alcool 70% Amostra com Q. Verde		
Laboratório			
Depo. Técnico			

Onilda Vieira
Gravado Vieira
Diretora Comercial
(51) 3111-5420/5427

Copyright © 2016 by John Wiley & Sons, Inc.

RELA: WALDEMAR JOSÉ STRAZZACAPPA, 171 - CEP. 13050 - 151, Jardim Indaiatuba - Campinas - SP
 (fones/fax) (019) 3029.8886 e-mail: coperrel@copersa.com.br site: www.copersa.com.br

www.ebsco.com

Anexo 4



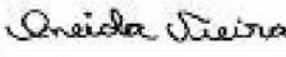
Certificado de Ensaio

Amostra: 311001588

Cliente:	Profa. Dra. Leoni Viliana Bonamin	RUPE SP	
Donato:	Profa. Dra. Leoni Viliana Bonamin	Solicitante:	LEONI V. BONAMIN
Endereço:	Av. José Maria Winkler, 220	Cidade:	São Paulo - SP
Produto:	Timulina 5 CH 5mg/Kelco/ml	Controle:	
Envase:	Não informado	Quantidade:	NP
Data Produção:		Data Coleta:	
Data Recebção:	19/1/2011	Data Envio:	17/1/2011
		Data Liberação:	12/2/2011

Análise	Unidade	Resultado	Limite	Padrão	Reação	Status
Zinco	µg/mL	0,05				
Observações:						
Cliente:	Produto: Timulina 5 CH 5mg/Kelco/ml					
Laboratório:	Amostra com Omeida					
Depo. Técnico:						


 Responsável da Cota
 Coordenadora de Qualidade
 CBO IV LABORATÓRIO


 Diretora Geral
 Diretora Comercial
 CBO IV LABORATÓRIO

O presente relatório é válido apenas para os dados e informações fornecidas e não pode ser reproduzido por terceiros.

RLA:WALDEMAR JOSÉ STRAZZACAPPA,272 -CSP,13050-151, Jardim Independência - Campinas - SP
 Telefone:(0xx19) 3229.8888 e-mail:cbolabor@cbolabor.com.br site:www.cbolabor.com.br

Pág. 1

Anexo 5



Certificado de Ensaio

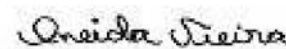
Amostra: 311001588

Cliente:	Profa. Dra. Leoni Viliana Bonamini	RA/ESP:	
Donato:	Profa. Dra. Leoni Viliana Bonamini	Solicitante:	LEONI V. BONAMINI
Endereço:	Av. José Maria Whitaker, 220	Cidade:	São Paulo - SP
Produto:	Timulina 5 CH 5mg Kaleo/ml	Controle:	
Remetente:	Não Informado	Quantidade:	
Data Produção:		Data Coleta:	
Data Receção:	19/1/2011	Data Início:	19/1/2011
		Data Envio:	17/1/2011
		Data Liberação:	12/2/2011

Análise	Unidade	Resultado	Limite	Padrão	Observações
Zinco	µg/mL	0,05			

Observações:
 Cliente: Produto: Timulina 5 CH 5mg Kaleo/ml
 Amostra com Omeprazole
 Laboratório:
 Depto. Técnico:


 Wladimir José Trauzacappa
 Coordenador de Qualidade
 CRG IV 502927


 Graziela Vieira
 Diretora Comercial
 CRG IV 502927

Quem assinar este relatório e este relatório e seus resultados devem ser assinados e rubricados. O relatório de análise só pode ser reproduzido por meio eletrônico.

RLA: WILSONMAR JOSÉ TRAUZACAPPA, 272 - CEP: 13050 - 151, Jardim Indaípolis - Campinas - SP
 fone/fax (0xx19) 3229.8885 e-mail: cboanalise@cboanalise.com.br site: www.cboanalise.com.br

Pág. 1

Anexo 6



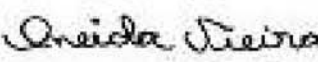
Certificado de Ensaio

Amostra: 311001589

Cliente:	Profa. Dra. Leoni Viland Bonamin	RAPESP:	
Contato:	Profa. Dra. Leoni Viland Bonamin	Solicitante:	LEONI V. BONAMIN
Endereço:	Av. José Maria Whitaker, 280	Cidade:	São Paulo - SP
Produto:	Timulina 5 CH 10 mg Kalexi/ml	Controla:	Lona
Envaseador:	Não informado	Quantidade:	NP
Data Produção:	Validade:	Data Coleta:	Data Envio: 17/11/2011
Data Receção:	19/11/2011	Data Inicio:	19/11/2011
			Data Liberação: 12/12/2011

Análise	Unidade	Resultado	Limite	Padrão	Status
Zinco	µg/mL	0,05			
Observação:					
Cliente:	Produto: Timulina 5 CH 10 mg Kalexi/ml				
Observação:	Amostra com Omeprazol				
Depo. Técnico:					


 Alexandre Maria de Almeida
 Coordenador de Qualidade
 CRQ IV - SP/0407


 Onilda Vieira
 Diretora Comercial
 CRQ IV - SP/0407

O(s) resultado(s) obtido(s) neste relatório é(são) o(s) resultado(s) referente(s) à amostra(s) e não a(s) 12 resultados de análise, os quais não podem ser reproduzidos por completo.

RUA: WALDEMAR JOSÉ NTRAZZACAPPA, 212 - CEP: 13050 - 151, Jardim Independência - Campinas - SP

fone/fax (0xx19) 3229.8885 e-mail: cbo@cbolanalise.com.br

site: www.cbolanalise.com.br

Pág. 1

Anexo 8



Certificado de Ensaio

Amostra: 311001591

Cliente:	Profa. Dra. Leonir Viliana Bonamin	RUFES SP
Donato:	Profa. Dra. Leonir Viliana Bonamin	Solicitante: LEONIR V. BONAMIN
Endereço:	Av. José Maria Whitaker, 200	Cidade: São Paulo, SP
Produto:	Timulina 5 CH 100 mg Kalexi/ml	Controla: _____
Remetedor:	Não informado	Quantidade: _____
Data Produção:	Unidade: _____	Data Coleta: _____
Data Recebido:	19/1/2011	Data Início: 19/1/2011
		Data Envio: 17/1/2011
		Data Liberação: 12/2/2011

		Padrão			
Análise	Unidade	Resultado	Mínimo	Máximo	Status
Zinco	µg/mL	0,05			
Observações:					
Cliente:	Produto: Timulina 5 CH 100 mg Kalexi/ml				
Labordário:	Amostra com Q naída				
Opção Técnico					

Ríngel Maria de Costa
Coordenadora de Qualidade
CBO IV - 000007

Graciele Vieira
Diretora Comercial
CBO IV - 000007

Os dados (tabelas e/ou gráficos) e as informações de análise e resultados apresentados neste certificado são válidos Q naída da amostra sob condições de controle de qualidade por completo.

RUA: WALDIRMAR JOSÉ STRAZZACAPPA, 112 - CEP: 13050 - 151, Jardim Indaialpolis - Campinas - SP
Fone/Fax: (0xx19) 3228.0000 e-mail: cbocentral@cbocentral.com.br site: www.cbocentral.com.br

Anexo 9



Certificado de Ensaio

Amostra: 311011197

Cliente:	Profa. Dra. Leoní Villand Bonamin	UNIF	
Correto:	Profa. Dra. Leoní Villand Bonamin	Solicitante:	CEARSATO
Endereço:	Av. José Maria Whitaker, 290	Cidade:	São Paulo - SP
Produto:	Outros	Conteúdo:	Ureia
Remetedor:	Não informado	Quantidade:	10g
Data Produção:		Data Coleta:	
Data Receção:	11/4/2011	Data Início:	11/4/2011
		Data Envio:	24/2011
		Data Liberação:	13/5/2011

Análise	Unidade	Resultado	Método	Padrão	Observação
Cálcio	%	(*)			
Magnésio	%	(*)			
Manganês	ug/L	<5,00			

Observações:

Cliente:

Tímula

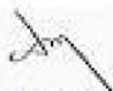
Laboratório:

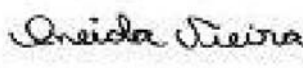
S CHA

CHOLEX

Data Técnica:

Fora solicitado ensaio de cálcio, porém o volume de amostra é insuficiente para este ensaio.
 (*) Cálcio e magnésio não detectados.


 Renata Maria da Costa
 Coordenadora de Qualidade
 CBO IV Sudeste


 Graziela Vieira
 Diretora Comercial
 CBO IV Sudeste

De acordo com o item 5.1 do Regulamento de Controle de Qualidade, a amostra deve ser analisada dentro do prazo estabelecido. O resultado da análise só pode ser registrado após a aprovação.

RUA WALDEMAR JOSE STRAUSSACAPPA, 212 - CEP: 13050 - 151, Jardim Indaípolis - Campinas - SP
 Telefone (0xx19) 3229.8888 e-mail: cbo@cbosudeste.com.br site: www.cbosudeste.com.br

Anexo 10



Certificado de Ensaio

Amostra: 311011198

Cliente:	Profa. Dra. Leoni Vilares Bonamin	UNP	
Contrato:	Profa. Dra. Leoni Vilares Bonamin	Solicitante:	CEARSATO
Endereço:	Av. José Maria Whitaker, 290	Cidade:	São Paulo - SP
Estado:	Quinta	Contato:	
Remetedor:	Não informado	Quantidade:	100g
Data Produção:		Data Coleta:	Data Envio: 04/2011
Data Receção:	11/4/2011	Data Inicio:	11/4/2011
			Data Liberação: 13/6/2011

Análise	Unidade	Resultado	Limite	Padrão	Máximo	Status
Cálcio	%	(*)				
Magnésio	%	(*)				
Manganês	ppm	6,50				

Observações:

Cliente:

Tribunal

Laboratório:

SCM

Por solicitação enviada de cliente, porém o volume de amostra é insuficiente para este ensaio.
(*) Cálcio e magnésio não detectados.

Depo. Técnico:

Sebastião da Costa
Coordenador de Qualidade
CBOV S00017

Graciela Vieira
Coordenadora Comercial
CBOV S001627

Os dados aqui apresentados são válidos apenas para o ensaio realizado e não se estendem a outros ensaios. O relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo.

RUA: WALDEMAR JONES STRAZZACAPPA, 212 - CEP: 13050-151, Jardim Indaípolis - Campinas - SP
Fone/Fax (0xx19) 3229.0000 e-mail: cboanalisa@cboanalisa.com.br site: www.cboanalisa.com.br

Pag. 1

Anexo 11



Certificado de Ensaio

Amostra: 311011199

Cliente:	Profa. Dra. Leoni Viland Bonamin	UNIF	
Contrato:	Profa. Dra. Leoni Viland Bonamin	Solicitante:	CEARSATO
Endereço:	Av. José Maria Whitaker, 290	Cidade:	São Paulo - SP
Redução:	Outros	Controla:	Uma
Remetedor:	Não Informado	Quantidade:	NP
Data Produção:		Data Coleta:	Data Envio: 04/2011
Data Recepção:	11/4/2011	Data Inicio:	11/4/2011
			Data Liberação: 13/6/2011

Análise	Unidade	Resultado	Limite	Padrão	Limite	Status
Cálcio	%	(*)				
Magnésio	%	(*)				
Manganês	ug/L	<5,00				

Observações:

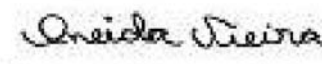
Cliente

Laboratório

Realizado ensaio de sílica, porém o volume de amostra é insuficiente para este ensaio.
 (*) Cálcio e magnésio não detectados.

Data Técnica


 Nelson Gilberto Costa
 Coordenador de Qualidade
 CRG IV 020407


 Onilda Vieira
 Diretora Comercial
 CRG IV 020407

Quaisquer dados e/ou informações não relatados aqui são de responsabilidade exclusiva do cliente. O relatório de ensaio só pode ser reproduzido por completo.

RLIA: WALDIRMAR JOSE STRAZZACAPPA, 212 - CEP: 13050 - 151, Jardim Indaípolis - Campinas - SP
 (19) 3229-8888 e-mail: cbo@rlia.com.br www.rlia.com.br