

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS EFEITOS DO BIOTERAPEUTICO 200DH EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi*

Eduarda Pereira de Barros¹, Denise Lessa Aleixo², Simone Martins de Oliveira³

¹Acadêmica do Curso de Medicina, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá/PR. Bolsista PIBIC/ICETI-UniCesumar. eduardapereiradebarros@hotmail.com;

²Coorientadora, Doutora, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. denise.aleixo@unicesumar.edu.br

⁴Orientadora, Doutora, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. simone.martins@unicesumar.edu.br

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário que instaura uma infecção grave em seu hospedeiro vertebrado, podendo causar danos irreversíveis, principalmente em suas células musculares, causador da doença tripanossomíase ou Doença de Chagas. A medicação disponível no mercado, que combate esse parasito, não é completamente eficiente e produz danos indesejáveis e irreversíveis. Nesse sentido, pesquisas com medicamentos homeopáticos têm se revelado promissoras no combate ao parasito, sobretudo as formas amastigotas, que são mais difíceis de serem exterminadas. Os bioterápicos são os homeopáticos que obtiveram maior sucesso em relação à infecção por *T. cruzi*, uma vez que esses medicamentos possuem seu princípio ativo retirado do próprio parasito, suas toxinas, parte de membras, realizando uma terapia conhecida como isoterapia – cura pelo igual. Resultados encontrados indicam que o bioterápico 200dH atua coagindo o sistema imune a combater o *T. cruzi* em cobaias contaminadas, fomentando uma resposta imune celular e humoral mais eficiente que a fisiológica. Acredita-se que esse medicamento atue estimulando as células de defesa, que passarão a responder de forma antígeno-específico, favorecendo o combate de amastigotas. Esse processo provavelmente é iniciado pela estimulação do macrófago, que por sua vez, de acordo com os resultados encontrados, inicia uma cascata inflamatória, com predominância da via Th1, fomentando, a produção de IL4, IL-10 e interferon γ , auxiliando no combate as amastigotas.

PALAVRAS-CHAVE: bioterápicos; Doença de Chagas; homeopatia; *T. cruzi*.

1 INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi é o protozoário responsável por causar a tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas (DC) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A infecção humana por *T. cruzi* é frequente nas Américas, sobretudo na América Latina, configurando a terceira doença parasitária de maior prevalência no mundo, com crescente número de casos no continente europeu e asiático (BOCCHI et al., 2012). A infecção pelo parasito consiste na invasão de determinados tecidos pela forma tripomastigota metacíclico, uma forma flagelada que se movimenta pela corrente sanguínea e interage com as células do hospedeiro num processo de invasão que compreende: adesão celular, interiorização e formação de um vacúolo parasitóforo e fenômenos intracelulares (NEVES et al., 2016).

A infecção por *T. cruzi* mobiliza vários mecanismos da resposta imune inata e adaptativa que levam ao controle da primeira fase da infecção, conhecida como parasitemia patente, mas não elimina o parasito do hospedeiro vertebrado, resultando em uma baixa parasitemia e persistente parasitismo tecidual, conhecida como parasitemia subpatente. Estudos mostram que lesões teciduais resultantes da resposta imune prolongada desencadeada pela permanência do parasito no tecido participam na patogênese das diversas formas clínicas da doença (NEVES et al., 2016). Postula-se assim, que a DC é uma doença eminentemente inflamatória, cujas lesões provocadas pelo parasito nos diferentes tecidos revelam-se em sinais e sintomas.

O tratamento para a DC é parcialmente eficaz. No Brasil, a única droga disponível, o benzonidazol, é indicado para a fase aguda da doença e acompanha efeitos indesejáveis importantes que comprometem a adesão ao tratamento (BEZERRA; MENEGUETTI; CAMARGO, 2012). Os bioterápicos são medicamentos homeopáticos, feitos com utilização

do próprio agente etiológico como matéria prima. Dessa forma, a composição pode ser feita por órgãos doentes, patógenos e suas toxinas, bem como secreções patológicas. No campo da homeopatia, essa terapêutica é denominada isopatia, conhecida como a cura pelo igual, descrita por Almeida (2011), na qual o igual (patógeno) é capaz de destruir o igual (patologia).

Em um estudo com bioterápico 200dH, cobaias tratadas exibiram um aumento de algumas citocinas, evidenciando que esse medicamento estimula imunidade humoral frente aos parasitos (ALEIXO et al., 2017). Os resultados prévios obtidos após análise do tratamento dos animais infectados com *T. cruzi* com o bioterápico 200dH mostraram que houve um aumento na mortalidade dos animais infectados e na infecção tecidual, por exemplo. Esses resultados sugeriram que o mesmo medicamento dado em fases diferentes (cônica e aguda) da doença, pode ser desfavorável ao prognóstico. Acredita-se que a administração indiscriminada desse medicamento esteja relacionada à maior periculosidade, visto a diminuição da expectativa de vida após infecção e administração do homeopático (ALEIXO et al., 2017).

Portanto, esse estudo busca avaliar a ação do bioterápico 200dH em lâminas histopatológicas de órgãos alvos após infecção com *T. cruzi* em camundongos. Para isso, foi analisada a resposta inflamatória no músculo cardíaco de camundongos após infecção com *T. cruzi*, a quantidade de macrófagos, linfócitos, bem como a presença de figuras apoptóticas no ambiente de infecção por *T. cruzi* nos órgãos alvo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado a partir de materiais confeccionados em um experimento cego, randomizado, em ensaio controlado, feito em triplicata, utilizando camundongos Suíços, *Mus musculus*, de 56 dias de idade. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/ UEM) sob o protocolo 030/2008, segundo as normas éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O experimento segue o protocolo de Aleixo *et al.* (2015). Foram utilizados animais infectados via I.P. com 1,400 tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y. Os animais foram divididos em grupos e tratados com bioterápico 200dH injetável. Os grupos consistiam em: C.I. – animais infectados e tratados com uma solução de água e etanol a 7%, em água (10 µl/mL); Grupo D.E – animais infectados e tratados com bioterápico *T. cruzi* 200dH, em água (10 µl/mL), oferecido desde o dia da infecção até o final da pesquisa; Grupo S.D – animais infectados e tratados com bioterápico *T. cruzi* 200dH, em água (10 µl/mL), oferecidos nas primeiras 12 horas de infecção.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise histopatológica, foi evidenciado e comparado a presença, assim como a quantidade, de granulomas e focos infecciosos em cobaias infectadas pelo *T. cruzi* e tratadas com bioterápico 200dH. A análise histopatológica apontou que as cobaias infectadas e tratadas com bioterápico 200dH nas primeiras 12 horas (grupo S.D), apresentaram maior quantidade de focos infecciosos em relação ao grupo E.D, que foi tratado constantemente com o medicamento homeopático. A figura 1 evidencia resultados encontrados no músculo cardíaco das cobaias desse grupo.

A figura 1 representa, no lado (A), as cobaias do grupo S.D, em objetiva de 40x, sendo que a flecha cheia indica foco infeccioso de *T. cruzi* em miócitos cardíacos e as flechas vazadas indicam macrófagos dispersos, próximos ao foco infeccioso, no 12º dia da infecção. Em (B), cobaias do grupo S.D, em objetiva de 40x, as flechas cheias indicam

pequeno foco infeccioso na mesma cobaia, circundados por macrófagos escassos, no 12º dia da infecção.

Em contrapartida, as cobaias infectadas e tratadas com bioterápico 200dH ao longo de toda a vida, a partir da infecção (grupo E.D), apresentaram a melhor resposta imune celular contra o parasita, evidenciando uma relevante quantidade de macrófagos circundando os granulomas e focos infecciosos de *T. cruzi*, como ilustrado na figura 2.

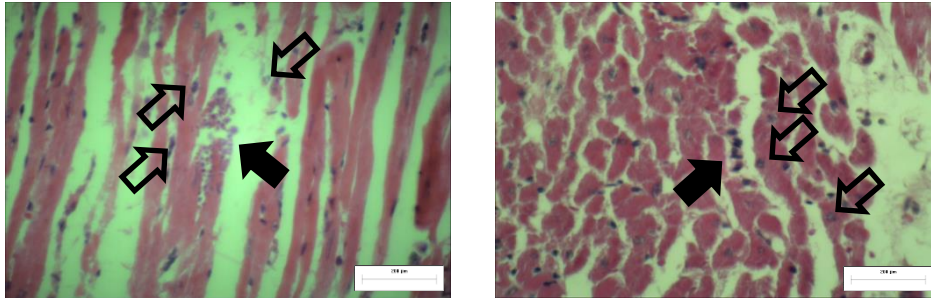


Figura 1: Fotografia de alterações no músculo cardíaco do *Mus musculus* no grupo S.D. Flecha cheia indica foco infeccioso de *T. cruzi* em miócitos cardíacos e as flechas vazadas indicam macrófagos dispersos, próximos ao foco infeccioso, no 12º dia da infecção. Em (B), cobaias do grupo S.D, em objetiva de 40x, as flechas cheias indicam pequeno foco infeccioso na mesma cobaia, circundados por macrófagos escassos, no 12º dia da infecção.

Fonte: Autoria própria, 2020.

Essas cobaias apresentaram uma densidade de macrófagos maiores, em relação aos grupos C.I e S.D, bem como em Aleixo *et al.* (2017), foi constatado uma melhor resposta imune contra as amastigotas do *T. cruzi*, assim como uma resposta humoral, mediada, principalmente, por IL-4 e IL-10. Por fim, as cobaias que não receberam tratamento com a medicação homeopática evidenciaram maior quantidade de granulomas e focos disseminados da infecção em relação aos grupos tratados, progredindo conforme o dia da infecção. Sendo assim, os resultados apontam que os bioterápicos 200dH estimulam a resposta imune inata, para que esta antecipe a resposta imune adaptativa, combatendo com maior eficiência os parasitos. Resultados expostos em Aleixo *et al.* (2017) comprovam a efetividade do bioterápico 200dH, no tocante à parasitemia.

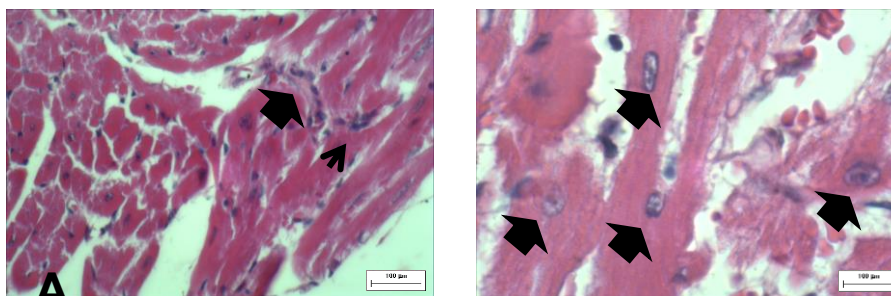


Figura 2: Fotografia de alterações no músculo cardíaco do *Mus musculus* no grupo E.D. Flecha cheia indicam macrófagos dispersos, próximos ao foco infeccioso, apontado por flecha simples.

Fonte: Autoria própria (2020).

Na figura (A), tem-se as cobaias do grupo E.D, em objetiva de 40x, a flecha cheia indica células de defesa (macrófagos) em direção e circundando o foco infeccioso de *T. cruzi*, no 12º dia da infecção. Já na figura (B), há as cobaias do grupo E.D, em objetiva de 100x, as flechas cheias indicam a presença de macrófagos, células com nucléolo basofílico e núcleo único, no 12º dia da infecção.

Os grupos S.D e E.D apresentaram combate às tripomastigotas. O grupo E.D evidenciou, a partir do 15º dia de tratamento, uma carga infecciosa média inferior a 1mL x 10⁻⁵, se aproximando da extinção parasitológica do organismo das cobaias. O grupo S.D também apresentou baixa concentração de tripomastigotas, aproximando-se da extinção do parasito no 18º dia, no entanto, a concentração ascendeu a partir do 19º dia da infecção.

Aleixo et al. (2017) evidenciou que as cobaias tratadas (grupo S.D e E.D) apresentaram mortalidade média, em até 20 dias, assim como as cobaias não tratadas com o medicamento homeopático. No entanto, estas apresentaram uma vida maior em relação aos grupos tratados.

Os medicamentos homeopáticos altamente diluídos, denominados bioterápicos, apresentam matéria prima constituída do próprio agente agressor ao organismo. Nesse sentido, como evidenciado nos resultados, ele é capaz de desencadear uma reposta imunológica mais agressiva, auxiliando no recrutamento celular para a defesa do hospedeiro. Essas reações culminam no aumento de macrófagos, que por sua vez, deflagram respostas importantes para a erradicação do patógeno.

De acordo com Montéon et al. (1996), a reação imune inata contra o *T. cruzi* é formada, primeiramente, por células polimorfonucleares, que se inicia após 1 (uma) hora da infecção, com pico em cerca de 24 (vinte e quatro) horas depois, desaparecendo gradativamente após isso. Concomitante ao desaparecimento, a migração de macrófagos tissulares se inicia, podendo perdurar intensamente por mais de 15 (quinze) dias da infecção. Essas células possuem uma peculiaridade no que se refere a esse parasito, visto que inicialmente elas constituem-se como alvos do *T. cruzi*. No entanto, os macrófagos, conforme a progressão e maior interação com o parasito, adquirem resistência, atuando, então, de maneira mais efetiva no combate à Doença de Chagas.

A infecção pelo *T. cruzi*, segundo Jorge e Casto (2000), promove, inicialmente, uma lesão vascular após romper células musculares devido à alta, e crescente, carga de parasitas no granuloma. Esse rompimento gera alterações e lesões vasculares, fazendo com que, rapidamente, as plaquetas sejam ativadas no local da lesão, bem como o endotélio vascular adjacente. Esses acontecimentos constituem-se como sinais para a migração de macrófagos tissulares à região de ocorrência do granuloma, ou foco infeccioso.

Os macrófagos constituem-se como células multiefetoras, pois adquirem, processam e apresentam o antígeno para linfócitos T e B, iniciando a resposta imune adaptativa. Além disso, essas células, concomitantemente, são responsáveis por aumentar a concentração de IL-1 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), que sinalizam para mastócitos, monócitos e fibroblastos o local da lesão, além de auxiliarem na produção de Óxido Nítrico (NO), tornando o epitélio mais permeável para a diapedese de células de defesa. Dessa forma, os resultados encontrados possibilitam acreditar que o bioterápico 200dh antecipa a resistência do macrófago pelo *T. cruzi*, desencadeando uma resposta imunológica mais rápida do que a do grupo C.I, uma vez que esses animais apresentam carga parasitológica maior conforme a progressão dos dias de infecção, ao contrário dos grupos tratados (S.D e E.D).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Doença de Chagas ainda se configura como uma doença infecciosa de alta prevalência no Brasil, no entanto, continua sem tratamento eficaz. As medicações homeopáticas demonstram que são capazes de atuar no combate da infecção provocada pelo agente etiológico dessa patologia, contudo, os estudos para entender a atuação desses medicamentos são escassos.

O bioterápico 200dH apresentou uma boa resolução do quadro parasitológico em cobaias infectadas pelo *T. cruzi*, todavia, a resolução do quadro imunológico é de difícil

controle, visto que esse medicamento, possivelmente, amplifica, de forma descontrolada, a resposta do hospedeiro aos antígenos do parasita, evidenciando o benefício e a periculosidade desses medicamentos, de forma simultânea.

Estudos em relação a formulações semelhantes ao bioterápico 200dH podem configurar-se como vanguarda para a resolução de patologias infecciosas, tendo em visto a alta responsividade dos parasitos e do organismo a esses medicamentos. Dessa forma, esse estudo traz a possibilidade do viés homeopático no combate às maiores patologias infecciosas, sobretudo, a Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO D. L. et al. Biotherapeutic 200dH is harmful to acute murine infection with *Trypanosoma cruzi*. **International Journal Of High Dilution Research**. Maringá-PR, p. 11-21. 2017.
- ALEIXO D. L. et al. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. *BMC Research Notes* 2012 5:352.
- ALEIXO D. L. et al. Randomized study using biotherapeutic “T. cruzi 3dH” impairs experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Journal Of Experimental And Integrative Medicine**. Maringá-PR, p. 100-104. set. 2015.
- ALMEIDA, E. **As Razões da Terapêutica – Racionalismo e Empirismo na Medicina**. UFF. Niterói: 2011.
- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**. P. 1-16. abr. 2016.
- BEZERRA, W. S., MENEGUETTI, D. U. O., CAMARGO, L. M. A. **A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência**. Saúde (Santa Maria), v.38, n.1, p. 920, 2012.
- BOCCHI E. A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica - 2012**. Arq. Bras. Cardiol. 2012; 98(1 supl. 1): 1-33.
- BRASIL. Constituição. Conselho Federal de Medicina. **Resolução nº 1000/1980, de 04 de julho de 1980**. Rio de Janeiro, 21 jul. 2019.
- CONAHON: Conselho Nacional de Homeopatia e Fitoterapia. **Justificativa da criação do CONAHOM**. Acesso em: 16 de set. 2020. Disponível em: <<https://conahom.com/justificativas/>>.
- FERRAZ, F. N. et al. Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy** (2011) 100, 237 e 243.
- JORGE, T.C.A., CASTRO, S.L. orgs. **Doença de chagas: manual para experimentação animal** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85- 85676-75-2. Available from SciELO Books.

MONTÉON, V.; FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; ALEJANDRE-AGUILAR, R *et al.*
American trypanosomosis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation
kinetics in a murine model. **Experimental Parasitology**, 83:267-274, 1996.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo
Horizonte: Atheneu, 2016. 559p.

SANDRI, P. et al. *Trypanosoma cruzi*: Biotherapy made from trypomastigote modulates
the inflammatory response. **British Homeopathic Journal**. Maringá, p. 48-59. Mai. 2015.

TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (Ed.). **American Trypanosomiasis: American**
Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research. França: Academic
Press, 2010. 870p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia: a introdução**. 10. ed. Porto
Alegre: Artmed, 2012. 967p.