Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17x controlled histopathological alterations in mice infected by this protozoon

Patrícia Flora Sandri¹, Gislaine Janaina Sanchez Falkowski¹, Anélio Dias Nascimento Júnior¹, Miguel Spack², Neide Martins Moreira¹, Max Jean de Ornelas Toledo¹, Benício Abreu Filho¹, Maristela Gabriel¹ e Silvana Marques de Araújo¹

¹ State University of Maringá - UEM, Brazil

² Homeopath volunteers, Brazil

ABSTRACT

Introduction: about 10 million people worldwide suffer from Chagas' disease [1]. The World Health Organization (WHO) has explicitly acknowledged the significance of this condition and supports the use of Complementary and Alternative Medicine by health systems integrated with conventional treatments. Even so, one century after its discovery it still represents a global challenge [1,2]. Biotherapies are ultradiluted medicines and the infection of mice by *Trypanosoma cruzi* is an excellent model to understand their effect [3,4]. At 8 weeks, mice are physiologically more developed than at age 4 weeks, including a more competent immune system [5].

Aim: the aim of this study was to assess the effect of biotherapeutic of *T. cruzi* in dilution 17x on liver and spleen tissue of mice of different ages infected by this protozoon.

Method: in a blind, randomized controlled trial 12 male Swiss mice aged 4 and 8 weeks, infected by 1,400 blood trypomastigotes *T. cruzi* Y strain were divided into groups control – treated with 7% hydroalcoholic solution (CI-4=3 animals or CI-8=3 animals) and treated with biotherapeutic 17x (BIOT-4=3 animals or BIOT-8=8 animals). Treatment (0.2 ml biotherapeutic/day/animal, per gavage) started after infection was verified (4th day) and animals were sacrificed on the 3rd day of treatment. For histopathological exam, the liver and spleen were removed and fixated in 4% paraformaldehyde for 24 hours and then processed for inclusion in paraffin. Semi-serial 7µm cuts were made and subjected to hematoxylin-eosin stain. It was performed a quantitative analysis of the number of nests of amastigotes and inflammatory foci in the liver. Slides were observed under microscope Olympus BX41 (Tokyo, Japan) and images captured with camera Qcolor3 (Olympus) coupled to the microscope. In the spleen it was counted the number of nests of amastigotes and the number of foreign-body giant cells. In each organ, 20 microscopic fields/cut were counted under power 40x totaling 120 fields/animal with microscope Olympus CBA (Tokyo, Japan). To analyze data it was used software Statistica 8.0. For data not exhibiting normal distribution it was used Kruskal-Wallis' test at 5% significance and ANOVA for the ones with normal distribution. Chi-square test was used to compare percentages. Biotherapeutic 17d was prepared by adding 0.9 ml of blood with *T. cruzi* (10⁷ trypomastigotes/ml) to 9.1 ml of distilled water in laminar flow. Following dilutions were prepared in 86% hydroalcoholic solutions up to 16x. Dilution 17x was prepared with 7% hydroalcoholic solution [6]. It was performed microbiological control and *in vivo* biological risk of the biotherapeutic. Results showed a number of colony forming units proper for use (>1CFU/ml).

Intraperitoneal inoculation of the biotherapeutic did not cause infection in animals. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation/UEM protocol 030/2008.

Results and Discussion: in the liver, animals of group BIOT-8 exhibited less nests of amastigotes ($p < 0.001$) and less inflammatory foci ($p < 0.06NS$) than animals in group CI-8. In the spleen, the number of nests of amastigotes was lower in BIOT-8 than in CI-8 ($p < 0.08NS$). Similarly, the number of giant-cells/megakaryocytes in the spleen was lower in BIOT-8 than in CI-8 ($p < 0.01$). In 4-week old animals, the number of inflammatory foci in the liver ($p = 0.06NS$) and the number of amastigotes in the spleen ($p = 0.01$) was higher in group BIOT-4 (Figure1). There was no statistical difference in the number of nests of amastigotes in the liver and the number of megakaryocytes/giant cells in the spleen between BIOT-4 and CI-4.

Figure 1. Number of nests of amastigotes in the liver, number of amastigotes in the spleen, number of inflammatory foci in the liver and number of megakaryocytes/giant cells in the spleen on the 3rd day of treatment in 4- and 8-week old mice inoculated with 1,400 blood trypomastigotes Y strain *T. cruzi* treated with 7% alcoholic solution (control). a: $p < 0.001$ for the number of nests of amastigotes in the liver, 8-week old animals; b: $p = 0.01$ for the number of nests of amastigotes in the spleen, 4-week old animals; c: $p = 0.08$ for the number of nests of amastigotes in the spleen, 8-week old animals; d: $p = 0.06$ for the number of inflammatory foci, 4-week old animals; e: $p = 0.06$ for the number of inflammatory foci in the liver, 8-week old animals; f: $p = 0.01$ for the number of megakaryocytes/foreign-body giant cells in the spleen, 8-week old animals.

Physiological development affects a large variety of metabolic functions including the development and functioning of the immune system [7-9].

Histopathological analysis showed that 8-week old animals treated with biotherapeutic exhibited a lower number of nests of amastigotes in the liver and spleen, inflammatory foci in the liver and megakaryocytes/giant cells in the spleen by comparison to the control group suggesting a modulation of the immune response in treated animals that diminishes histopathological alterations. This phenomenon was not seen in 4-week old animals. This contrast is probably related to the difference in thymic maturation [10] and is involved in different immunological mechanisms, such as memory, regulatory, inhibitory, autoimmunity among others, which must be carefully analyzed to better elucidate these mechanisms [11]. According to Sandri et al. [12] in animals treated with biotherapeutic of *T. cruzi* 17x there is increase of apoptosis together with clearance of apoptotic cells (macrophages including apoptotic bodies). This clearance of apoptotic cells controls inflammation [13], which would explain the decrease in the number of inflammatory foci in the treated group observed in our study despite the greater number of parasites found in the blood. It cannot be ruled out the possibility of the biotherapeutic having altered the tissue affinity of *T. cruzi* [14].

Conclusion: there is a difference in the effect of the ultradiluted medicine between mice 4- and 8-week old. Eight-week old animals treated with biotherapeutic exhibited lower tissue parasitism, which is the opposite of what was observed in 4-week old animals.

Keywords: Chagas' disease; High dilutions, Biotherapeutic, Histopathology.

References

- [1] World Health Organization, Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases 2010, 1^o ed. (World Health Organization, 2011).
- [2] Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n^o 971, de 03 de maio de 2006. Diário Oficial da União, Brasília (DF). 2006 4 maio; seção 1(84): 20-5.
- [3] Queiroz AO, Xavier SCC, Faria KG, Bernardo RR, Leitão TCA. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: um estudo *in vivo*. Cult Homeopat. 2006; 17: 9-13.
- [4] Pinto PL, Takami R, Nunes EV, Guilherme CS, Oliveira Jr OC, Gama-Rodrigues J, et al. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo. 1999; 54: 141-146.
- [5] Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. Rev. Ciênc Farm Básica Apl. 2007; 28: 11-23.
- [6] Brazilian Homeopathic Pharmacopeia. 2^o ed, vol1. São Paulo: Atheneu; 1997.
- [7] Takeoka Y, Chen SY, Yago H, Boyd R, Suehiro S, Shultz LD, et al. The murine thymic microenvironment: changes with age. Int Arch Allergy Immunol. 1996; 111: 5-12.
- [8] Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. J Pathol. 2007; 211: 144-156.
- [9] Jenkinson, WE, Bacon A, White AJ, Anderson G, Jenkinson EJ. An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. J Immunol. 2008;181:6101-6108.
- [10] Miller JF. Immunological function of the thymus. Lancet. 1961; 30: 748-749.
- [11] Miller JF. The Discovery of thymus functional and of thymus-derived lymphocytes. Immunol Rev 2002; 185: 7-14.
- [12] Sandri PF, Moreira NM, Gabriel M, Nascimento Jr AD, Abreu Filho BA, Gomes ML, Toledo MJO, Araújo SM. Biotherapeutic 17DH of *Trypanosoma cruzi*: effect versus age. Proceedings of the XXVI Annual Meeting of the Brazilian society of protozoology; 2010 Oct 25-27; Foz do Iguaçu. Brasil. Foz do Iguaçu: XXXVII annual meeting on basic research in Chaga's Disease; 2010. p 218.
- [13] Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. Elsevier Inc. 2010; 140: 871-882.
- [14] Pupulin ART, Araújo SM, Toledo MJO, Gomes LM, Takejima E, Cuman RKN, et al. Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 2010; 126: 435-440.

Bioterápico 17DH de *Trypanosoma cruzi* diminuir alterações histopatológicas em camundongos infectados pelo protozoário

RESUMO

Introdução: No mundo aproximadamente 10 milhões de pessoas são portadoras da doença de Chagas e mesmo após um século do seu descobrimento ela ainda é um desafio global. [1]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimula o uso da Medicina Complementar/Alternativa nos sistemas de saúde de forma integrada com os tratamentos clássicos, [1,2]. O bioterápico é um medicamento ultradiluído e a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos é um excelente modelo para compreender o seu efeito [3,4]. Camundongos com 8 semanas de idade apresentam maior maturidade fisiológica em relação à animais com 4 semanas, incluindo um sistema imunológico mais competente [5].

Objetivo: Avaliar o efeito do bioterápico 17dH de *T. cruzi* no tecido hepático e esplênico em camundongos de diferentes idades infectados pelo protozoário.

Método: Em ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio, 12 camundongos suíços, machos, com 4 ou 8 semanas de idade, infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*-cepa Y, via ip., foram divididos nos grupos: controle tratados com solução hidroalcoólica-7% (CI-4=3 animais ou CI-8=3 animais) e tratados com bioterápico-17dH (BIOT-4=3 animais ou BIOT-8=3 animais). O tratamento (0,2mL de bioterápico/dia/animal, por gavagem) foi iniciado após a constatação da infecção (4º. Dia) e o sacrifício dos animais ocorreu no 3º dia de tratamento. Para o exame histopatológico o fígado e o baço foram coletados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas e a seguir incluídos em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 7µm de espessura processados pela técnica de coloração Hematoxilina-Eosina. Foi realizada uma análise quantitativa do número de ninhos de amastigotas e focos inflamatórios no fígado. No baço foram contados o número de ninhos de amastigota e o número de células gigantes e megacariócitos. As lâminas foram observadas em microscópio Olympus BX41 (tokyo Japão) e as imagens capturadas com câmera Qcolor3 (Olympus) acoplada ao microscópio. Para cada órgão foram contados 20 campos microscópicos/corte com a objetiva de 40X totalizando 120 campos/animal. Para análise dos dados foi utilizado o programa Statística 8.0. Para os dados que não apresentavam distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e para os que apresentavam distribuição normal foi utilizado a ANOVA. Foi considerado o nível de significância de 5%. O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparação de percentuais. O bioterápico 17dH foi preparado pela adição de 0,9mL de sangue com *T. cruzi* (10^7 tripomastigotas/mL) a 9,1mL de água destilada, em fluxo laminar. As diluições seguintes foram feitas em solução hidroalcoólica 86% até 16dH. A 17dH foi preparada com solução hidroalcoólica a 7% [6]. Foi realizado controle microbiológico e risco biológico *in vivo* do bioterápico. Os resultados mostraram número de unidades formadoras de colônias apropriado para uso (>1 UFC/mL). A inoculação intraperitoneal do bioterápico não proporcionou a infecção dos animais. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UEM parecer 030/2008.

Resultados e Discussão: No fígado, animais do grupo BIOT-8 apresentaram menos ninhos de amastigotas ($P<0,001$) e menos focos inflamatórios ($P<0,06$ NS) que animais do grupo CI-8. No baço o número de ninhos de amastigotas foi menor em BIOT-8 que em CI-8 ($P<0,08$ NS). Da mesma forma, o número de células gigantes/megacariócitos no baço também foi menor em BIOT-8 que em CI-8 ($P<0,01$). Para animais de 4 semanas o número de focos inflamatórios no fígado ($P=0,06$ NS) e o número de amastigotas no baço ($P=0,01$)

foi maior no grupo BIOT-4 (Figura 1). Não houve diferença estatística entre BIOT-4 e CI-4 para número de ninhos de amastigota no fígado e número de megacariócitos/células gigantes no baço.

Figura 1. Número de ninhos de amastigota no fígado, número de amastigotas no baço, número de focos inflamatórios no fígado e número de megacariócitos/células gigantes no baço, no 3º dia de tratamento, em camundongos com 4 e 8 semanas de idade, inoculados com 1400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* tratados com solução hidroalcoólica 7% (controle). a: $P<0,001$ para número de ninhos de amastigotas no fígado, animais de 8 semanas. b: $P=0,01$ para número de ninhos de amastigotas no baço, animais de 4 semanas. c: $P=0,08$ para número de ninhos de amastigota no baço, animais de 8 semanas. d: $P=0,06$ para número de focos inflamatórios, animais de 4 semanas. e: $P=0,06$ para número de focos inflamatórios no fígado, animais de 8 semanas. f: $P=0,01$ para número de megacariócitos/células gigantes de corpo estranho no baço, animais 8 semanas.

O amadurecimento fisiológico afeta uma grande variedade de funções metabólicas, incluindo o desenvolvimento e manutenção do sistema imune [7-9]. Na análise histopatológica, os animais de 8 semanas tratados com bioterápico mostraram menor número de ninhos de amastigota no fígado e baço, focos inflamatórios no fígado e megacariócitos/células gigantes no baço, em relação ao grupo controle, sugerindo uma modulação da resposta imune no animal tratado que diminui as alterações histopatológicas o que não ocorreu nos animais de 4 semana. Esse contraste provavelmente está relacionado com a diferença da maturação tímica [10], estando envolvido em diferentes mecanismos imunológicos, como o de memória, regulatórios, inibitórios, auto-imunidade dentre outros, que devem ser analisados criteriosamente para melhor elucidação desses mecanismos[11]. De acordo com Sandri et al. [12] em animais tratados com bioterápico 17dH de *T. cruzi* ocorre um aumento da apoptose, juntamente com um *clearance* de células apoptóticas (macrófago englobando corpos apoptóticos). Este *clearance* de células apoptóticas controla a inflamação [13], o que suportaria o achado de diminuição de focos inflamatórios no grupo tratado observado no presente trabalho a despeito do maior número de parasitos observado no sangue. Não pode ser negligenciada a possibilidade do bioterápico ter alterado o tropismo tecidual do parasito[14].

Conclusão: Existe diferença de efeito do medicamento ultradiluído em camundongos de 4 e 8 semanas de idade. Animais de 8 semanas tratados com bioterápico apresentam menor parasitismo tecidual, ao contrário do observado em animais de 4 semanas.

Palavras-Chave: Doença de Chagas; Alta diluição; Bioterápico; Histopatologia.

Licensed to [GIRI](http://www.giri.org.br)

Support: PROAP/CAPEES

Conflict of interest: authors declare there is no conflict of interest

Correspondence author: Silvana Marques de Araújo. smaraujo@uem.br. Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo, 5790 – Maringá/PR – 87020-900.

How to cite this article: Sandri PF, Falkowski GJS, Nascimento Júnior AD, Spack M, Moreira NM, Toledo MJO, Abreu Filho B, Gabriel M, de Araújo SM. . Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17x controlled histopathological alterations in mice infected by this protozoon. Int J High Dilution Res [online]. 2011 [cited YYYY Month dd]; 10(36): 110-114. Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH; 2011 Sep 04-07; Foz do Iguaçu (Brazil). GIRI and ABFH; 2011; Available from: <http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/view/464/482>