Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17d increases apoptosis in experimentally infected mice

Patrícia Flora Sandri, Gislaine Janaina Sanchez Falkowski, Luzmarina Hernandez, Márcia Machado de Oliveira Dalálio, Denise Lessa Aleixo, Mônica Lúcia Gomes, Anélio Dias Nascimento Júnior, Ricardo Alberto Moliterno, Silvana Marques de Araújo

State University of Maringá - UEM, Brasil

ABSTRACT

Introduction: the mechanism of action of ultradiluted medicines has not yet been established[1,3]. Many basic research studies have focused on isopathic models using *in vitro* or *in vivo* designs [4,5]. Recent studies indicate that an ultradiluted (isopathic) antigen can transfer signals to the immune system and modulate its response when an organism is challenged against this same antigen [6]. Some studies on experimental infection of mice by *T. cruzi* identified apoptotic cells and showed that the increase of their number is associated with an increase also in the number of parasites in the blood of the infected animals, while blockage of apoptosis can be the target of therapeutic intervention [7,8].

Aim: to evaluate the development of apoptosis in mice treated with biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* in dilution 17d through *in situ* detection of fragmented DNA.

Method: in a blind randomized controlled trial, 36 male Swiss mice age 4 or 8 weeks were distributed in groups control - treated with 7% hydroalcoholic solution(CI-4=9 animals or CI-8=9 animals); and treated with biotherapeutic 17d (BIOT-4=9 animals or BIOT-8=9 animals). Infection was performed with 1,400 trypomastigotes *T. cruzi*-strain Y via intraperitoneal. Biotherapeutic 17d was prepared through the addition of 0.9ml of concentrated *T. cruzi* (10^7 trypomastigotes/ml) to 9.1 ml of distilled water. The following dilutions were prepared in 86% hydroalcoholic solution until dilution 16d. Dilution 17d was prepared with 7% hydroalcoholic solution. It was performed microbiological control and biological risk *in vivo*. Treatment: 0.2 ml in 3 consecutive days, oral route, from the moment infection was verified. Animals were sacrificed on the 3rd day of treatment in a chamber saturated with ether. The liver and spleen were removed and fixated in 4% paraformaldehyde for 24 hours and then included in paraffin. Apoptosis was evaluated through DNA fragmentation – TUNEL technique (TdT dUTP-biotin Nick End Labeling (ApopTag® Peroxidase-Chemicon). For statistical analysis software Statistica 8.0 was used. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of UEM.

Results and Discussion: in the samples of liver of animals age 4 and 8 weeks either treated or not with biotherapeutic 17d it was found cells parasitized by amastigotes of *T. cruzi* with apoptotic bodies, or phagocytic cells with phagocytic vacuole with apoptotic marked material inside them. The number of cells in apoptosis in animals age 4 weeks was not significantly ($p=0.03$) larger in treated group BIOT-C4 than in control group CI-4 (Figure 1). In animals age 8 weeks, the number of cells in apoptosis was significantly ($p<0.001$) larger in the treated group BIOT-8 than in control group CI-8 (Figure 1).

Figure 1. Average number of cells in apoptosis observed in slices of liver of male Swiss mice age 4 and 8 weeks infected by 1,400 blood trypomastigotes Y strain treated (biotherapeutic) or not (control) with biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17d. Technique employed: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labelling - APOPTAG (Millipore). * $p < 0,05$ regarding the corresponding control.

These results point to a mechanism of action for the rise in the peak of parasitemia caused by ultradiluted substances in low dilutions in Swiss mice experimentally infected by *T. cruzi*, as it was observed in several studies [9-12]. It is known that homeopathic preparations are able to increase communication between cells [13-14]. Affected organisms treated with ultradilutions would resort to apoptosis as mechanism of cure, removing altered cells[15]. Literature confirms that the use of homeopathic medicines increases apoptosis[16]. The idea to be assessed is that, when attempting to eliminate infection by *T. cruzi*, parasitized cells enter into apoptosis and consequently release parasites to the circulation rising the peak of parasitemia up. This hypothesis was demonstrated here, since it was shown that the number of cells in apoptosis and the number of cells containing phagocytized apoptotic material inside them (Figure 2) was larger in the group treated with biotherapeutic of *T. cruzi* 17d than in the control group.

Figure 2. Average number of cells with phagocytic vacuole with apoptotic material observed in slices of liver of male Swiss mice age 4 and 8 weeks infected by 1,400 blood trypomastigotes Y strain treated (biotherapeutic) or not (control) with biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17 d. Technique employed: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labelling - APOPTAG (Millipore). * $p < 0,05$ regarding the corresponding control.

According to the law of similitude, a homeopathic medicine must cause symptoms similar to the ones observed in disease [17] in order to awaken in the organism a reaction fit to combat the affection and promote the re-equilibrium of health in the treated individual. In this study in particular, the administration of biotherapeutic of *T. cruzi* 17d increased apoptosis and acted according to the principle of similarity, since Dos Reis et al (2007) state that apoptotic cells were detected in both experimental infection of mice by *T. cruzi* and the heart of patients with chronic Chagas' disease[8]. In another article, members of the same group state that an increase of apoptotic cells during infection by *T. cruzi* might contribute to the increase of parasitemia in infected animals [7]. According to Francisco (2007)[18], treatment of mice infected by *T. cruzi* with benznidazole – the only medicine available in Brazil for the etiological treatment of Chagas' disease – elicits an accumulation of CD8 T lymphocytes due to inhibition of apoptosis.

Conclusion: these results show that apoptosis is increased in animals treated with biotherapeutic of *T. cruzi* 17d.

Keywords: Chagas' disease; Biotherapeutic; Apoptosis.

References:

- [1] Elia V, Napoli E, Germano R. The "Memory of Water": an almostdeciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueoussolutions. Homeopathy. 2007; 96: 163-169.
- [2] Anick DJ, Ives JA. The silica hypothesis for homeopathy: physical chemistry. Homeopathy. 2007; 96: 189-195.
- [3] Wynn SG. Studies on use of homeopathy in animals. J Am Vet Med Assoc. 1998; 212: 719-724.
- [4] Van Wijk R, Albrecht H. Proving and therapeutic experiments in the HomBRex basic homeopathy research database. Homeopathy. 2007; 96: 252-257.
- [5] Bonamin LV, Endler PC. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: conceptual critical review. Homeopathy. 2010. 99:37-50.
- [6] Bastide M, Lagache A, Lemaire-Misonne C. Le paradigme des signifiants: sche`me d'information applicable a` l'Immunologie et a` l'Home'pathie. Rev Int Siste'mique. 1995; 9: 237-249.
- [7] Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, Bozza PT, Faria-Neto HCC, Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. Nature. 2000; 403:199-203.
- [8] DosReis GA, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LVC, Lopes MF. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. Cytokine & Growth Factor Rev. 2007; 18: 97-105.
- [9] 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.
- [10] Gabriel M, Amado CAB, Aleixo DL, Kaneshima EN, Pupulim ART, Araújo SM, 2010. Efeitos do medicamento canova® sobre a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* utilizando cepa resistente ao tratamento alopático. Proceedings of the CONSUFAR; 2010 Nov 08-11; Maringá. Brasil. Maringá: Anais do I CONSUFAR; 2010.

- [11] 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.
- [12] Ferraz FN, Simoni GK, Nascimento AJ, Melo CS, Toledo MJO, Gomes ML, et al. Effect of biotherapeutics in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi*. Homeopathy. In press. 2011.
- [13] Costa B, Siqueira C, Veiga V, Soares R, Holandino C. Alterações celulares induzidas pelo bioterápico *Candida albicans* 30dH: um estudo *in vitro*. In: Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Homeopatia [CD-ROOM]; 17-21 set 2008. São Paulo. BR. 2008.
- [14] Smit E, Pretorius E, Anderson R, Oommen J, Potio M. Differentiation of human monocytes in vitro following exposure to Canova in the absence of cytokines. Ultrastruct Pathol. 2008; 32:147-152.
- [15] Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleia E, Dardashti LJ, et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. N Engl J Med. 1998; 339:1341-1348.
- [16] Jonas WB, Gaddipati JP, Rajeshkumar NV, et al, 2004. In vitro and in vivo assessment of homeopathic treatment for prostate cancer. Paper presented at: Society of Integrative Oncology First International Conference; New York, NY.
- [17] Neto RM B. Bases da Homeopatia. Liga de Homeopatia. – Medicina Unicamp. 2006. P. 42.
- [18] Francisco AF. Efeito do tratamento com benznidazol sobre o curso da infecção pela cepa y do *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos à alteração dos estoques de ferro pelo uso da desferrioxamina [Dissertação Master]. Rio Preto: Programa de mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rio Preto, UFRP; 2007.
-

Bioterápico 17DH de *Trypanosoma cruzi* aumenta a apoptose em camundongos experimentalmente infectados

RESUMO

Introdução: O mecanismo de ação de medicamentos ultradiluídos ainda não está elucidado [1-3]. Muitos estudos em pesquisas básicas concentraram-se nos modelos de isopatia, utilizando protocolos *in vivo* ou *in vitro* [4,5]. Estudos recentes relatam que um antígeno ultradiluído (isopático) pode transferir sinais para o sistema imunológico e modular a sua resposta quando o organismo é desafiado contra este antígeno [6]. Outros trabalhos mostraram que na infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi* foram detectadas células apoptóticas e que um aumento das células apoptóticas está relacionado ao aumento da parasitemia em animais infectados e que o bloqueio da apoptose pode ser alvo de intervenção terapêutica [7,8].

Objetivo: Avaliar o envolvimento de apoptose em camundongos tratados com bioterápico 17DH de *Trypanosoma cruzi* através da detecção *in situ* de DNA fragmentado.

Método: Em ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio, 36 camundongos suíços, machos, com 4 ou 8 semanas de idade foram divididos nos grupos: controle tratados com solução hidroalcoólica-7% (CI-4= 9 animais ou CI-8=9 animais) e tratados com bioterápico-17DH (BIOT-4= 9 animais ou BIOT-8=9 animais). A infecção foi feita com 1400 tripomastigotas, *T. cruzi*-cepa Y, intraperitoneal. O bioterápico 17DH foi preparado pela adição de 0,9mL do concentrado *T. cruzi* (10^7 tripomastigotas/mL) a 9,1mL de água destilada. As diluições seguintes foram feitas em solução hidroalcoólica 86% até 16DH. A 17DH foi preparada com solução hidroalcoólica a 7%. Foi realizado controle microbiológico e risco biológico *in vivo*. O tratamento: 0,2mL/20 dias consecutivos/via oral a partir da constatação da infecção. Os animais foram sacrificados no 3º dia de tratamento. Fígado e baço foram coletados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas e a seguir incluídos em parafina. A apoptose foi avaliada pela fragmentação do DNA - técnica do TUNEL (TdT dUTP-biotin Nick End Labeling) (ApopTag® Peroxidase-Chemicon). Para as comparações estatísticas utilizou-se o programa Statística 8.0. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM.

Resultados e Discussão: Nos cortes de fígado de animais de 4 e 8 semanas de idade, tratados ou não tratados com Bioterápico 17DH, foram encontrados células parasitadas por amastigotas de *T. cruzi* com corpos apoptóticos, ou célula fagocitária com vacúolo fagocítico com material apoptótico marcado no interior. O número de células em apoptose em animais de 4 semanas foi maior no grupo tratado com bioterápico (BIOT-4) que no controle (CI-4), sem diferença significativa ($P=0,3$) (Figura 1). Nos animais de 8 semanas o número de células em apoptose foi significativamente maior no grupo tratado (BIOT-8) ($P<0,001$) que no grupo controle (CI-8) (Figura 1). Estes resultados vêm oferecer um mecanismo de ação para a elevação do pico de parasitemia produzido por substâncias ultradiluídas em baixas potências sobre a infecção experimental de camundongos suíços pelo *T. cruzi* observado em vários estudos [9-12]. É sabido que preparações homeopáticas são capazes de aumentar a comunicação entre células [13,14]. O organismo doente tratado com substâncias ultradiluídas lançaria mão da apoptose como mecanismo mediador da cura, removendo células alteradas [15]. A literatura confirma que a utilização de medicamentos homeopáticos aumenta a ocorrência de apoptose [16]. A idéia a ser considerada é que na tentativa de eliminar a infecção pelo *T. cruzi*, as células parasitadas entrariam em apoptose e consequentemente liberariam os parasitos na circulação elevando o pico de parasitemia. Esta hipótese ficou aqui comprovada, já que, foi demonstrado que o número de células em apoptose e o número de células contendo material apoptótico fagocitado em seu interior (Figura 2) foi maior no grupo tratado com bioterápico 17DH de *T. cruzi* que no grupo controle. Segundo a lei dos semelhantes, o medicamento homeopático deve provocar sintomas semelhantes aos observados na doença [17] para suscitar no organismo reação própria para o enfrentamento do agravo, promovendo o reequilíbrio da saúde do indivíduo tratado. No presente estudo em especial, a administração do bioterápico de *T. cruzi* 17DH está aumentando a apoptose e agindo segundo a lei dos semelhantes já que Dos Reis et al. [8] afirmam que tanto na infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi* quanto em coração de pacientes chagásicos crônicos foram detectadas células apoptóticas. Outro artigo do mesmo grupo afirma que um aumento de células apoptóticas durante a infecção pelo *T. cruzi* pode contribuir para o aumento da parasitemia em animais infectados [7]. Segundo Francisco [18] o tratamento de camundongos infectados pelo *T. cruzi* com benznidazol, único medicamento disponível para o tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil, induz o acúmulo de linfócitos T CD8, devido à inibição da apoptose.

Figura 1 - Número médio de células em apoptose observadas em cortes de fígado de camundongos suíços machos com 4 e 8 semanas de idade infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y, tratados (BIOTERÁPICO) ou não (CONTROLE) com bioterápico 17DH de *Trypanosoma cruzi*. Técnica utilizada: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labelling - APOPTAG (Millipore). * $P<0,05$ em relação ao respectivo controle.

Figura 2 - Número médio de células com vacúolo fagocítico com material apoptótico observado em cortes de fígado de camundongos suíços machos com 4 e 8 semanas de idade infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y, tratados (BIOTERÁPICO) ou não (CONTROLE) com bioterápico 17DH de *Trypanosoma cruzi*. Técnica utilizada: Terminal

deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labelling - APOPTAG (Millipore). * $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

Conclusão: A apoptose está aumentada em animais tratados com bioterápico 17DH de *T. cruzi* e infectados pelo protozoário.

Palavras-Chave: Doença de Chagas; Altas Diluições; Bioterápicos; Apoptose.

Licensed to [GIRI](#)

Support: PROAP/CAPES

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, Hernandes L, Dalálio MMO, Aleixo DL, Gomes ML, Nascimento Júnior AD, Moliterno RA, de Araújo SM. Biotherapeutic of *Trypanosoma cruzi* 17d increases apoptosis in experimentally infected mice. *Int J High Dilution Res* [online]. 2011 [cited YYYY Month dd]; 10(36): 119-124. 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/467/483>