

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS EFEITOS DO BIOTERÁPICO 200DH EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR TRYPANOSOMA CRUZI

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF 200DH BIOTHERAPEUTIC IN MICE INFECTED WITH TRYPANOSOMA CRUZI

EDUARDA PEREIRA DE BARROS*
DENISE LESSA ALEIXO**
SIMONE MARTINS DE OLIVEIRA***

Descritores:

Trypanosoma cruzi; Bioterápicos; Homeopatia; Doença de chagas

* Acadêmica do curso de Medicina, Centro Universitário de Maringá – Unicesumar
eduardapereiradebarros@hotmail.com

** Co-orientadora, Professora-doutora e tutora do Curso de Medicina da Unicesumar
denise.aleixo@unicesumar.edu.br

*** Orientadora, Professora-doutora e tutora do Curso de Medicina da Unicesumar
simone.martins@unicesumar.edu.br

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário responsável por causar a tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas (DC).¹ 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.²

A infecção pelo parasito consiste na invasão de determinados tecidos pela forma tripomastigotameta-cíclica, 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.³ O parasito então invade células musculares esqueléticas, lisas e cardíacas – principais alvos – e passa por um processo de transformação, sendo chamado de amastigota (aflagelado).

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.³ 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.⁴ O estudo “Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease”, realizado por Bermudez *et al.*, revelou vários avanços na busca de tratamentos mais eficazes para a infecção por *T. cruzi* e uma das pesquisas demonstrou que medicamentos homeopáticos, em modelos animais, surgem como uma alternativa a ser considerada.

Sendo assim, a utilização de medicamentos homeopáticos pode provocar efeitos significativos nas manifestações morfológicas da infecção desse parasito. Em Ferraz *et al.*⁶ fica evidente que as pesquisas utilizando medicamentos homeopáticos têm crescido nas últimas décadas. Na infecção por *T. cruzi*, especificamente um medicamento homeopático se destaca, sendo denominado como bioterápico.^{7,8}

Os bioterápicos são medicamentos homeopáticos feitos com utilização do próprio agente etiológico como matéria-prima. Também conhecidos como nosódios, os bioterápicos consistem em medicamentos formulados por um princípio ativo a partir, principal-

mente, de um produto patológico animal ou vegetal. 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 Almeida⁹, na qual o igual (patógeno) é capaz de destruir o igual (patologia).

Embora não seja totalmente claro o mecanismo pelo qual estes medicamentos atuam, algumas hipóteses foram formuladas com base em pesquisas experimentais, evidenciando o aumento da apoptose de células infectadas.⁷ Em um estudo com bioterápico 200dH, cobaias tratadas com bioterápico exibiram um aumento de algumas citocinas, evidenciando que esse medicamento estimula imunidade humoral frente aos parasitos. O aumento de TNF- α e IL-6 e a diminuição de IL-4, IL-10 e IL-17A nesse estudo mostram que o tratamento usando 200dH, em dose única, promove modificações no organismo.¹⁰

Segundo a CONAHON (Conselho Nacional de Homeopatia e Fitoterapia)¹¹, o uso da homeopatia é livre em quase 100% dos países onde é usada, como na Índia, EUA, Inglaterra, Canadá, Portugal. Isso passa a ser um desafio para a sociedade, uma vez que frente aos resultados prévios e revisões da literatura, os medicamentos homeopáticos atuam em todos os tipos de células com os mais variados tipos de resposta.

Desde 1980, a homeopatia é considerada no Brasil como uma das especialidades médicas reconhecidas pelo Conselho Federal de Medicina.¹² Em 2006, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), na qual o Ministério da Saúde passou a considerar o tratamento à base de produtos naturais, a exemplo da fitoterapia e da homeopatia, como sendo um sistema complexo, de abordagem integral e dinâmica do processo saúde-doença, com ações no campo da prevenção de agravos, promoção e recuperação da saúde.¹³

A partir disso, em 2007, o Ministério da Saúde passou a incluir essas práticas nos tratamentos subsidiados pela rede do Sistema Único de Saúde (SUS). Frente a essa nova abrangência das terapias com produtos naturais e às políticas de promoção da saúde promovida pelo SUS, surge a necessidade de mais estudos sobre a ação dos produtos homeopáticos usados no cotidiano da população e sobre as suas possibilidades terapêuticas. Muitos medicamentos homeopáticos, usados sem o devido conhecimento, poderiam trazer riscos à saúde devido a seus efeitos.

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 (crônica 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.¹⁰

Dessa forma, enfatiza-se a necessidade de estudos qualificados e controlados que revelem a resposta do organismo infectado frente às medicações homeopáticas, colaborando com a correta administração medicamentosa, evitando, dessa maneira, a automedicação ou não acompanhamento dos pacientes.

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, será 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. Além disso, será avaliada a presença de remodelamento de matriz tecidual, com formação de granulomas, relacionando os resultados obtidos com resultados prévios.

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 (CEEA/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.*¹⁴ Foram utilizados animais infectados via I.P. com 1400 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 μ l/mL); Grupo D.E – animais infectados e tratados com bioterápico *T. cruzi* 200dH, em água (10 μ l/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 μ l/mL), oferecidos nas primeiras 12 horas de infecção.

Foram coletados materiais para análise da parasitemia e parasitismo tecidual e soro para dosagem de citocinas. Os dados foram publicados em Aleixo *et al.*¹⁰ e, no presente estudo, propomos avaliar a histopatologia da infecção pelo parasito no esquema que apresentou resultados mais significativos e no controle. Para isso, foram utilizadas lâminas de músculo cardíaco, alvo do *T. cruzi*, coletadas após o sacrifício dos animais. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e montadas em meio de montagem.

A análise das lâminas foi feita no laboratório de morfologia da UniCesumar, com a utilização do sistema

de aquisição de imagens. Para a análise de células e tipos celulares, primeiro identificou-se os tipos celulares presentes. Foram contadas 100 lâminas, fazendo uma varredura na lâmina na forma de “zigzague” para que os campos não se sobrepussem.

RESULTADOS

A partir da análise histopatológica, foi evidenciada e comparada 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. Embora tenham sido encontrados macrófagos ao redor da lesão, os focos infecciosos se apresentaram em maior quantidade e mais extensos, quando comparados ao grupo E.D. A figura 1 evidencia resultados encontrados no músculo cardíaco das cobaias desse grupo.

A figura 1 representa, em (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, eviden-

ciando uma relevante quantidade de macrófagos circundando os granulomas e focos infecciosos de *T. cruzi*, como ilustrado na figura 2. Essas cobaias apresentaram uma densidade de macrófagos maiores, em relação aos grupos C.I e S.D, bem como em Aleixo *et al.*¹⁰ foi constatada 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.*¹⁰ (2017) comprovam a efetividade do bioterápico 200dH, no tocante à parasitemia.

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 $1\text{mL} \times 10^{-5}$, 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.

Figura 1. Cobaias do grupo S.D (Fonte: autoria própria)

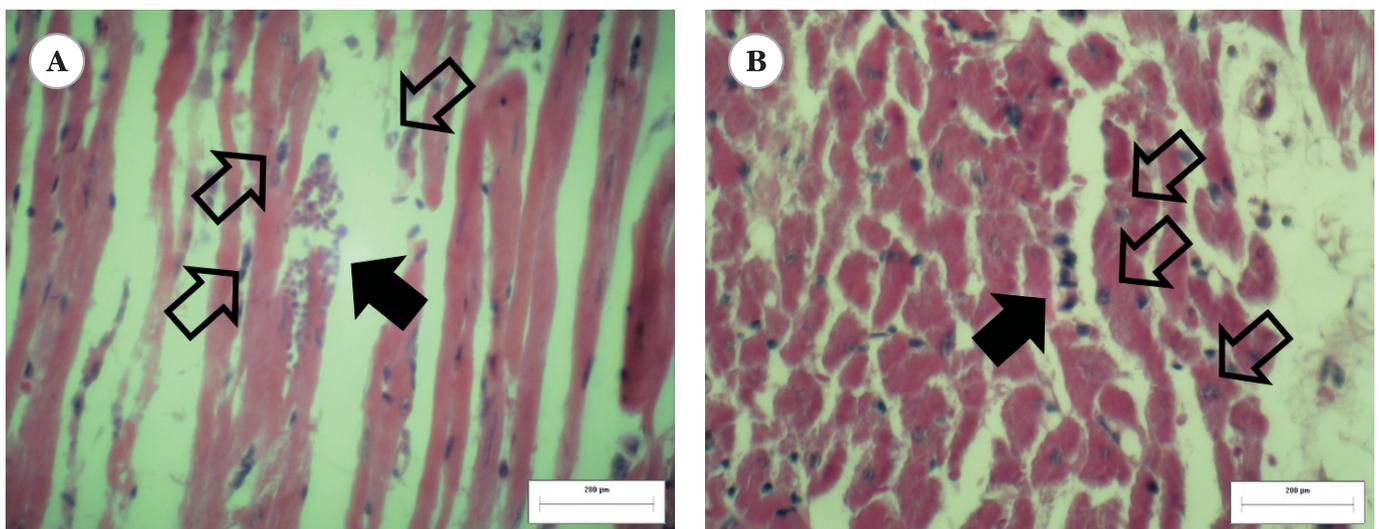


Figura 2. Cobaias do grupo E.D (Fonte: autoria própria).

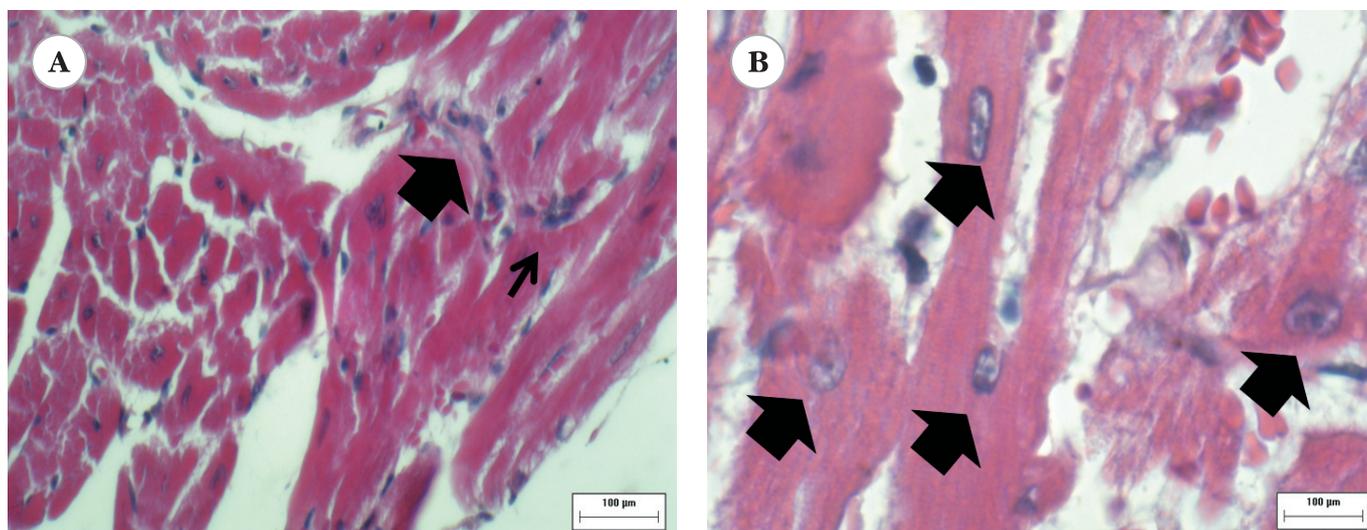
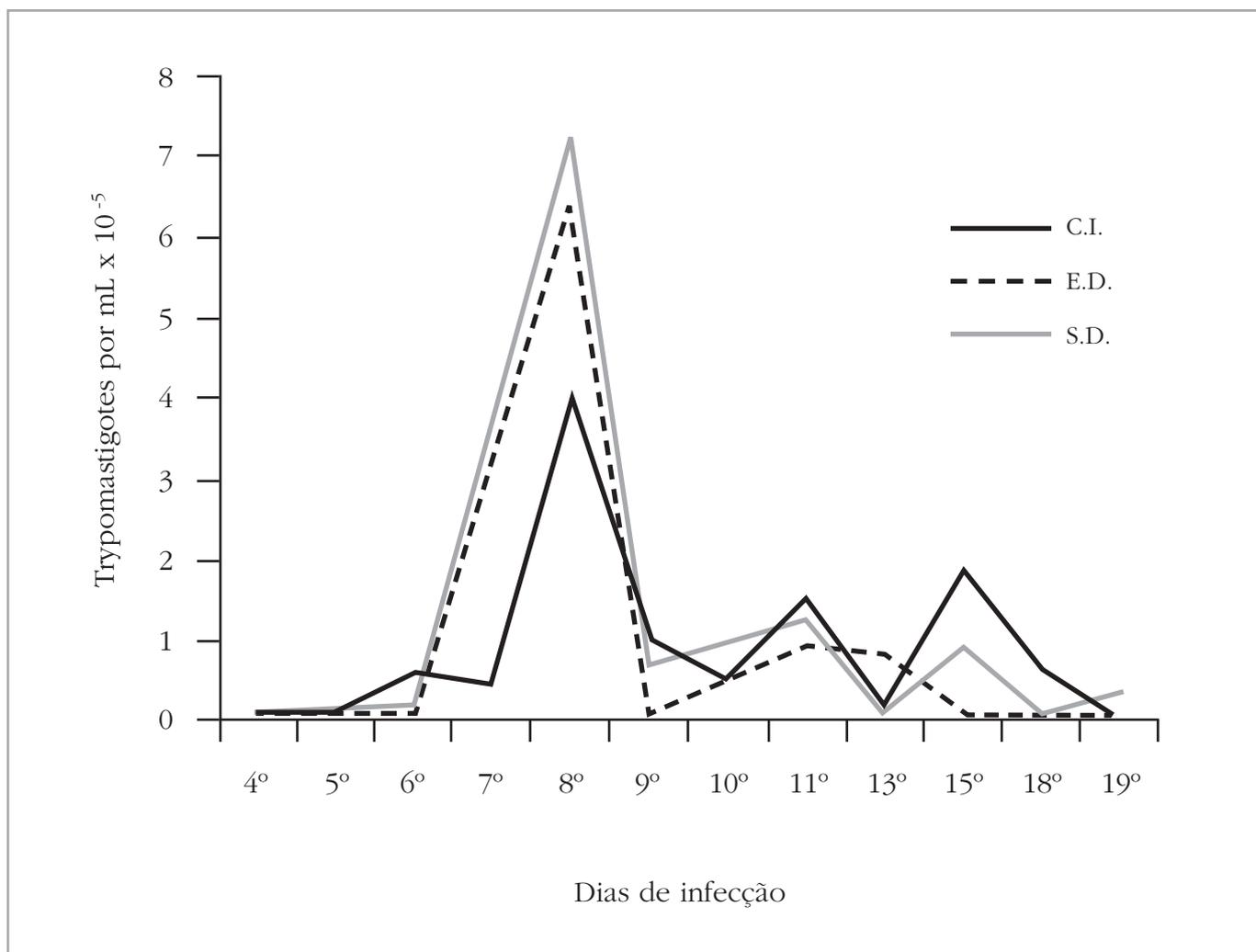


Figura 3: Curva de parasitemia média de animais infectados por *T. cruzi* e tratados com bioterápico 200dH (Fonte: Aleixo *et al.*¹⁰).



As cobaias utilizadas para a pesquisa, mesmo tratadas com o bioterápico 200dH e apresentando baixa carga parasitológica no que se refere às tripomastigotas e amastigotas, morreram em até 20 dias da infecção. 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, como explicitado na figura 4.¹⁰

DISCUSSÃO

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 resposta 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.

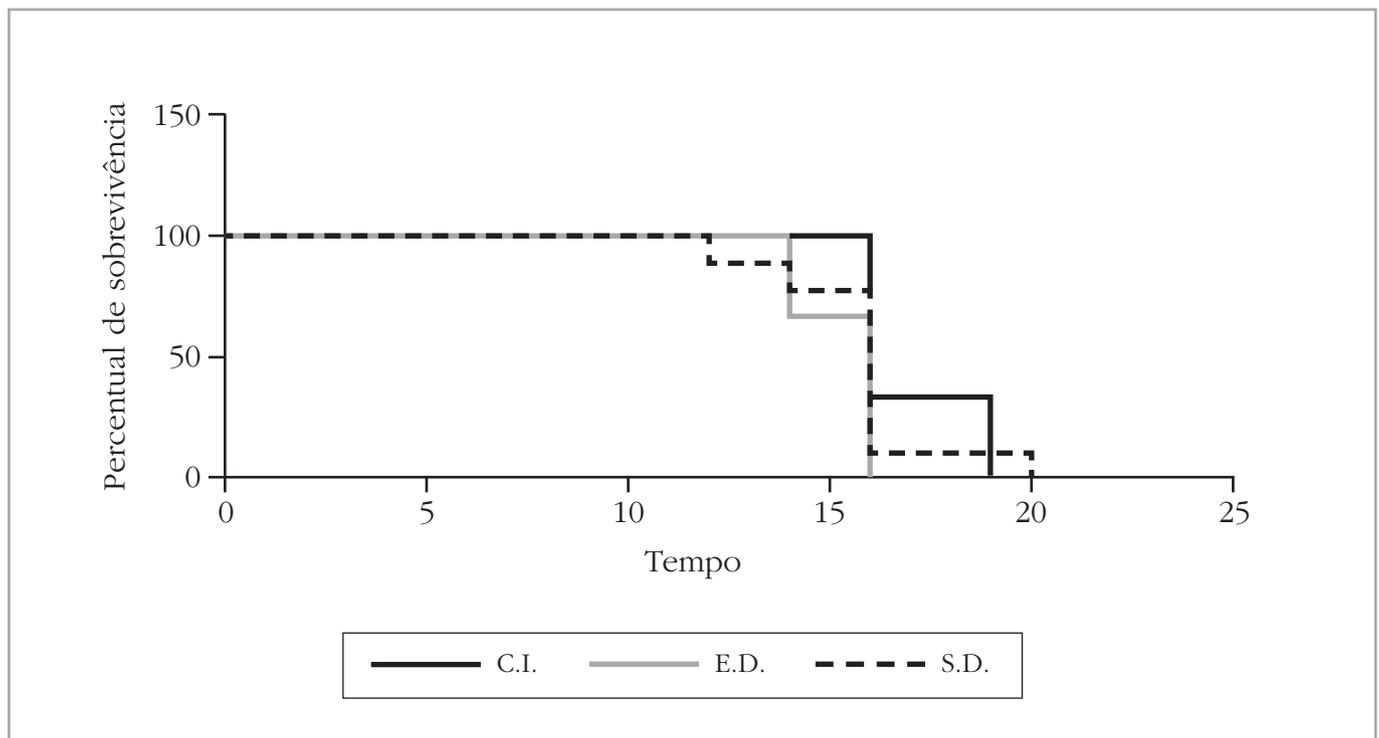
A reação imune inata contra o *T. cruzi* é formada, primeiramente, por células polimorfonucleares, que se inicia após 1 (uma) hora da infecção, com pico em cerca de 24 (vinte e quatro) horas depois, desaparecendo gradativamente após isso. Concomitante ao

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.¹⁵

A infecção pelo *T. cruzi* 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.¹⁶

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.

Figura 4: Curva de sobrevivência de grupos de animais tratados com bioterápico *T. cruzi* 200dH e grupo controle (Fonte: Aleixo *et al.*¹⁰).



As alterações endoteliais inicializadas pelas funções dos macrófagos ainda permitem o aumento da expressão e função de moléculas de adesão celular, como a selectina e ICAM-1 (Molécula de Adesão Intracelular tipo 1) que, juntamente a agentes quimiotáticos, auxiliam no recrutamento de células inflamatórias nos locais lesionados pelo rompimento do granuloma do *T. cruzi*, por meio de mediação do reconhecimento de leucócitos com o endotélio local. Essa mediação torna-se possível com a interação entre a ICAM-1 e a integrina LFA-1 (Antígeno associado à função linfocitária 1).

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).

Ademais, as citocinas inflamatórias Interferon- γ (INF- γ) e TNF- α , também resultados da resposta massiva dos macrófagos, foram encontradas em quantidades elevadas em Aleixo et al (2017), comprovando a função dessa célula na linha de frente da defesa contra o *T. cruzi*. Essas citocinas, resultantes, principalmente, de uma via de resposta imune à Th1, além de auxiliarem na formação da resposta imune adquirida, realizam uma espécie de *feedback* positivo na resposta macrocitária, aumentando ainda mais essas células nos focos de lesão.

No entanto, a mesma resposta imune responsável por compor o combate ao parasito, também pode ser responsável pela deterioração do organismo, pois caso esse *feedback* não seja controlado, as células atacam massivamente os focos, deflagrando uma resposta imune sistêmica, podendo atingir o Sistema Nervoso Central (SNC), desencadeando ações no termostato fisiológico, além de uma ativação sistêmica endotelial, hepatomegalia, febre, edemas em membros inferiores e dores generalizadas.

O aumento de IL4 e IL-10, constatado em Aleixo et al.¹⁰ (2017), indica que a resposta imunológica desencadeada pela ação de células da imunidade inata, sobretudo os macrófagos tissulares, tornou-se adquirida, uma vez que essas citocinas aparecem em reações imunológicas antígeno-específicas. Dessa forma, o bioterápico 200Dh auxilia o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida, consequentemente, específica, com maior rapidez, visto que os resultados demonstraram que cobaias tratadas com o medicamento homeopático altamente diluído apresentaram aumento de IL-4 e IL-10 no 12º dia da infecção, um número superior ao encontrado nas cobaias C.I.

Por conseguinte, conforme resultados descritos em Aleixo et al.¹⁰ e resultados obtidos nessa pesquisa, o bioterápico 200dh constitui-se como uma possibilidade medicamentosa alternativa para a Doença de Chagas. O possível mecanismo de ação desse medi-

camento consiste em uma sensibilização do sistema imune inato, com uma atuação importante nos macrófagos. Essa ação, por sua vez, acelera o tempo de resposta do hospedeiro ao parasita, fazendo com que ocorra uma amplificação das reações imunológicas, tempestade de citocinas, favorecendo o combate ao parasita, sobretudo em sua forma amastigota.

No que se refere à periculosidade dos bioterápicos, a Figura 4 evidencia que as cobaias que receberam o tratamento com o medicamento homeopático apresentaram uma mortalidade média precoce em relação às cobaias C.I. Isso se deve, possivelmente, ao mecanismo de formulação do medicamento. O bioterápico, tendo sua formulação a partir do próprio parasita, simula, mesmo que em baixa concentração, inoculação de partes do *T. cruzi*, sendo assim, amplifica as respostas do hospedeiro para combater antígenos desse protozoário.

A reação imunológica massiva desencadeada pelo medicamento altamente diluído, no entanto, não apresenta auto-regulação, motivo que, possivelmente, inviabilizou a progressão de vida das cobaias.

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.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário que instaura uma infecção grave em seu hospedeiro vertebrado, podendo causar danos irreversíveis, principalmente em suas células musculares, conhecida como a doença tripanossomíase ou Doença de Chagas. A me-

dicação disponível no mercado, que combate esse parasito, não é completamente eficiente e produz danos indesejáveis e irreversíveis, fazendo-se necessário a busca por outros campos da medicina, em termos de medicação, para combater essa doença. 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 membros, 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 do 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.

ABSTRACT

The trypanosoma cruzi is a protozoan that causes a serious infection in the vertebrate host, being capable of causing irreversible damages mainly in the muscle cells, also known as trypanosomiasis disease or Chagas Disease. The commercially available drug medication which fights this parasite is not completely efficient and causes undesirable and irreversible damages making it necessary to search for other fields of medicine in terms of medication to combat this disease. Therefore research with homeopathic medicines has been promising in the fight against the parasite, especially the amastigote forms, which are more difficult to be exterminated. Biotherapies are the homeopathic ones that have been more successful in relation to *T. cruzi* infection, since these drugs have their active principle removed from the parasite itself, its toxins, part of its members, performing a therapy known as isotherapy - cure by the same. The results indicates that the 200dH biotherapeutic acts by

coercing the immune system to fight *T. cruzi* in contaminated guinea pigs, promoting a cellular and humoral immune response more efficient than the physiological one. It is believed that this medicine works by stimulating the defense cells which will respond in an antigen-specific manner favoring the fight against amastigotes. This process is probably initiated by the stimulation of the macrophage which in turn, according to the remains found, initiates an inflammatory cascade with predominance of the Th1 pathway, promoting the production of IL-4e IL-5 and γ interferon helping to combat amastigotes

REFERÊNCIAS

1. Tortora, GJ; Funke, BR; Case, CL. *Microbiologia: uma introdução*, 10ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p.
2. Bocchi, EA 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.
3. Neves, DP. *Parasitologia Humana*. 13ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2016.
4. Bezerra, WS; Meneguetti, DUO; Camargo, LMA. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. *Saúde* (Santa Maria), v.38, n.1, p. 920, 2012.
5. Bermudez, J et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*. P. 1-16. abr. 2016.
6. Ferraz, FN; Simoni, GK; do Nascimento, A; de Melo, CS; Aleixo, DL; Gomes, ML et al. Different forms of administration of biotherapy 7dH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. *Homeopathy*. 2011; 100(4):237-43.
7. Aleixo, DL; Ferraz, FN; Ferreira, EC; de Lana, M; Gomes, ML; de Abreu Filho, BA et al. Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. *BMC Res Notes*. 2012; 5: 352.
8. Sandri, P et al. *Trypanosoma cruzi*: Biotherapy made from trypanomastigote modulates the inflammatory response. *British Homeopathic Journal*, p. 48-59. Mai. 2015.
9. Almeida, E. *As Razões da Terapêutica – Racionalismo e Empirismo na Medicina*. UFF. Niterói: 2011.
10. Aleixo, DL et al. Biotherapeutic 200dH is harmful to acute murine infection with *Trypanosoma cruzi*. *International Journal Of High Dilution Research*, p. 11-21. 2017.
11. Conselho Nacional de Homeopatia e Fitoterapia. Justificativa da criação do CONAHOM. Acesso em: 16 de set. 2020. Disponível em: <https://conahom.com/justificativas/>.
12. Brasil. Constituição (1980). Conselho Federal de Medicina. Resolução nº 1000/1980, de 04 de julho de 1980. Rio de Janeiro, 21 jul. 2019.
13. Brasil. Constituição (2006). Portaria nº 971, de 03 de abril de 2016. Aprova A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.
14. Aleixo, DL et al. Randomized study using biotherapeutic “*T. cruzi* 3dH” impairs experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Journal Of Experimental And Integrative Medicine*, p. 100-104. set. 2015.
15. Montéon, V; Furuzaza-Carballeda, J; Alejandro-Aguilar, R et al. American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Experimental Parasitology*, 83:267-274, 1996.
16. Jorge, TCA; Castro, SL 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.