

**AÇÃO IMUNOMODULADORA DO PRODUTO M2 NA INTERAÇÃO
MÁCROFAGO- *LEISHMANIA***

**IMMUNOMODULATING ACTION OF PRODUCT M2 IN THE MACROPHAGO-
LEISHMANIA INTERACTION**

Sheila Paula ADAMCZYK ¹
Katia Fialho do NASCIMENTO ²

RESUMO

Introdução: A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada um grave problema de saúde pública em pelo menos 88 países, mesmo sendo uma doença negligenciada, pode alternar de uma doença cutânea relativamente confinada e controlada, a uma doença visceral progressiva e fatal. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos produtos homeopáticos M2 em *Leishmania amazonensis* (LA) na interação macrófago-*Leishmania*. Trata-se de uma pesquisa experimental e de controle *in vitro*. **Materiais e métodos:** Para a execução do experimento o Medicamento Complexo Altamente – Diluído (M2) seguiu as normas da Farmacopéia Homeopática Brasileira, com dinamizações sucessivas. O veículo de diluição foi água destilada, a qual foi utilizada como controle. As promastigotas da cepa de LA foram cultivadas por 5 dias a 25°C em meio de RPMI suplementados com 20% de soro fetal bovino. Para análise do comportamento das promastigotas, foram feitos 3 experimentos independentes em culturas *in vitro* com LA, tratadas com M2 no período de 24 horas e 48 horas. **Resultados:** Os resultados mostraram que o complexo homeopático M2, promove diminuição da proliferação de LA, após o 4º dia de tratamento e alteração morfológica das rosetas. **Considerações finais:** Concluímos que o produto M2 pode ser um recurso imunomodulador, do ponto de vista epidemiológico, pois auxilia na potencialização e eficácia parasiticida dos quimioterápicos usados tradicionalmente no tratamento da leishmaniose, além de abrir novas perspectivas para o tratamento e / ou prevenção da leishmaniose, assim como novas possibilidades a serem pensadas e testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose Cutânea, leishmania, leishmaniose, homeopatia.

ABSTRACT

Introduction: American Cutaneous Leishmaniasis (ATL) is considered a serious public health problem, at least 88 countries, even though a neglected disease, can alternate from a relatively confined and controlled skin disease to a progressive and fatal visceral disease. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the effects of M2 homeopathic products on *Leishmania Amazonensis* (LA) on the macrophage-*Leishmania* interaction. This is an experimental research and *in vitro* control. **Materials and methods:** For the execution of the experiment, the Highly Diluted Complex Drug (M2) followed the rules of the Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia, with successive dynamizations. The dilution vehicle was distilled water, which was used as a control. The promastigotes of the LA strain were cultured for 5 days at 25°C in RPMI medium supplemented with 20% fetal bovine serum. To analyze the behavior of the promastigotes, 3 independent experiments were performed in *in vitro* cultures with LA, treated with M2 in the period of 24 hours and 48 hours. **Results:** The results showed

Adamczyk SP et al. Ação imunomoduladora do produto m2 na interação mácrofago- leishmania .
RGS.2020;22(2):82-96.

DOI: 10.17648/1984-8153-rgs-v2n22-7

that the M2 homeopathic complex promotes a decrease in the proliferation of LA, after the 4th day of treatment and morphological alteration of the rosettes. **Final considerations:** We conclude that the M2 product can be an immunomodulatory resource, from an epidemiological point of view, as it helps in potentiating and parasiticidal efficacy of chemotherapeutic drugs traditionally used in the treatment of leishmaniasis, in addition to opening new perspectives for the treatment and / or prevention of leishmaniasis, as well as new possibilities to be thought and tested.

KEYWORDS: Cutaneous Leishmaniasis, leishmania, leishmaniasis, homeopathy.

¹ Acadêmica do Curso de Bacharelado em Enfermagem da Faculdade Herrero – Curitiba/PR

² Doutora em Biologia Celular e Molecular, professora do curso de Enfermagem da Faculdade Herrero-Curitiba-PR

e-mail para correspondência: sheilabrt@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas um grave problema de saúde pública em pelo menos 98 países, onde 350 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de contraí-las. As diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas ao homem através da picada das fêmeas de insetos vetores, flebotômíneos do gênero *Lutzomyia*¹.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica as leishmanioses como enfermidades negligenciadas. São doenças endêmicas, causadas por agentes infecciosos ou parasitas que afetam principalmente populações de baixa renda¹. Essa doença é responsável por produzir casos graves de deformidades, incapacidade e mortes, pois se apresenta de três formas distintas: leishmaniose visceral, que é a mais letal, quando não tratada; leishmaniose cutânea e a mucocutânea. As duas últimas, embora não sejam fatais, resultam em graves problemas de saúde, devido a diversas comorbidades associadas².

No Brasil, a forma mais comum é a leishmaniose cutânea, também conhecida como tegumentar americana (LTA), que se caracteriza pela presença de lesões de pele, cartilagem e mucosas do trato respiratório superior. Estima-se que no Brasil entre os anos de 2014 a 2016 foram reportados 52 mil novos casos de leishmaniose tegumentar³, sendo destacadas três espécies de *leishmania* amplamente distribuídas no país como: *L. braziliensis*, *guyanensis* e *amazonensis*⁴.

Nos últimos anos, os números de casos e a ampliação da ocorrência geográfica da LTA aumentaram em todo o país, pois foram diagnosticados casos em todos os estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos⁵. Em consequência disso, podemos afirmar que as leishmanioses sofreram modificações em seu padrão de transmissão, adquirindo um caráter urbano, periurbano e reemergente⁶⁻⁷. Diversos fatores podem ter contribuído para a sua expansão, seja pela coexistência de diferentes espécies de vetores, reservatórios e agentes etiológicos, o que dificultam no seu controle, além das ações humanas modificadoras do ambiente, aumento do turismo internacional e a falta de vacinas eficazes⁸.

Em relação ao tratamento da LTA, os medicamentos utilizados são limitados e apresentam adversidades, incluindo a alta toxicidade e inúmeros efeitos colaterais como: mialgia, rigidez articular, dor abdominal, anorexia, alterações eletrocardiográficas, bradicardia

entre outros, o que leva os pacientes a abandonarem o tratamento, ocasionando a possibilidade de recidivas e conseqüentemente linhagens de *Leishmanias* resistentes, que contribuem para a manutenção do elevado número de casos⁹.

Dessa forma, a OMS passou a apoiar as novas alternativas terapêuticas no tratamento das leishmanioses, considerando uma linha estratégica e prioritária de pesquisa, cuja missão é ajudar a salvar vidas e melhorar a saúde desses indivíduos¹⁰.

Ao longo dos anos, os medicamentos homeopáticos têm sido utilizados com sucesso na área da saúde, auxiliando no tratamento de várias condições como: ansiedade, dermatite atópica, autismo, fraturas, conjuntivite, varicela, depressão, dores de cabeça, herpes zoster, gripe, cálculos renais, etc¹¹.

Logo, a literatura científica relata também inúmeros casos, em que a homeopatia vem sendo usada contra: câncer, HIV/AIDS e doenças terminais, com o objetivo de proporcionar cuidados paliativos sintomáticos e melhorar a qualidade de vida dessas pessoas¹¹. Estudos científicos demonstram o progresso da homeopatia nas últimas décadas, descrevendo experimentos em diferentes linhas de pesquisa que atestam o efeito das ultradiluições em modelos físico-químicos e biológicos (*in vitro*, *in vivo*)¹²⁻¹³⁻¹⁴⁻¹⁵.

Devido ao aumento da empregabilidade da homeopatia na área da saúde, recentemente uma pesquisa traçou o perfil das pessoas que atualmente buscam e utilizam a homeopatia como forma de tratamento. A investigação mostrou que indivíduos com altos níveis de escolaridade, na faixa etária de 33 a 55 anos, com estilo de vida saudável e atitude positiva em relação à terapêutica são os que mais procuram por essa terapia alternativa¹⁶.

Dado o exposto, os tratamentos atuais contra a LTA não garantem que o paciente alcançará a cura, porém, algumas pesquisas mostraram excelentes resultados com tratamentos alternativos, como a homeopatia que combinada com os medicamentos convencionais de controle da leishmaniose, podem auxiliar no aumento da eficácia e diminuição dos efeitos colaterais ao paciente durante o tratamento, além de reduzir o custo da terapia e conter o surgimento de resistência à droga¹⁷.

Tendo-se em vista a alta toxicidade dos medicamentos existentes, assim como a resistência desenvolvida por algumas cepas de parasitos a esses tratamentos, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos dos produtos homeopáticos M2 em *Leishmania amazonensis* (LA) na interação macrófago-*Leishmania*.

2. METODOLOGIA

O complexo M2 foi manipulado e obtido na farmácia Homeoterápica (Curitiba-PR), sob a responsabilidade do farmacêutico Narciso da Lozzo Neto CRF-PR 5604. Entre as diluições, a solução foi agitada vigorosamente, num processo chamado succussão.

Logo, na Figura 1 é possível observar a composição e o veículo de diluição deste medicamento homeopático M2.

Componentes	Matriz	Concentração Final M2	Concentração Final (v/v %)	Veículo Diluição M2
<i>Aconitum napellus</i>	MT	20 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁹	Água destilada
<i>Arsenicum album</i>	6 dH	18 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁷	Água destilada
<i>Asa foetida</i>	MT	20 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁹	Água destilada
<i>Calcarea carbonica</i>	8 dH	16 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁵	Água destilada
<i>Chelidonium majus</i>	MT	20 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁹	Água destilada
<i>Cinnamon</i>	MT	20 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁹	Água destilada
<i>Conium maculatum</i>	5 dH	17 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁶	Água destilada
<i>Ipecacuanha</i>	5 dH	13 dH	0.1 x 10 ⁻¹²	Água destilada
<i>Phosphorus</i>	12 dH	20 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁹	Água destilada
<i>Rhus toxicodendron</i>	6 dH	17 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁶	Água destilada
<i>Silicea</i>	12 dH	20 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁹	Água destilada
<i>Sulphur</i>	12 dH	24 dH	0.1 x 10 ⁻²³	Água destilada
<i>Thuja occidentalis</i>	6 dH	19 dH	0.1 x 10 ⁻¹⁸	Água destilada

Figura 1- Tabela de composição do complexo M2

Adamczyk SP et al. Ação imunomoduladora do produto m2 na interação macrófago- leishmania . RGS.2020;22(2):82-96.

A manipulação seguiu as normas da Farmacopéia Homeopática Brasileira, com dinamizações sucessivas. Todas as sucussões foram realizadas manualmente. As matrizes dos compostos foram adquiridas do Laboratório Schreibmann Ltda (indústria brasileira – CNPJ 62.134.67/0001-00). O veículo de diluição foi água destilada, a qual foi utilizada como controle. Os produtos foram filtrados em membrana de 0,22 µm e acondicionados à temperatura ambiente e protegidos da luz. Antes do tratamento para os diferentes ensaios, os produtos foram sucussionados 20 vezes contra a palma da mão, inclusive a água destilada (controle).

Sobre o Medicamento Complexo Altamente – Diluído (M2): As tinturas foram obtidas do Laboratório Schreibmann Ltda (Carapicuíba - Brazil), o qual é autorizado pelo Ministério da Saúde. Essa empresa certifica a alta qualidade e as condições da composição físico-química e “endotoxina-free” de seus produtos.

Essas tinturas são manipuladas conforme farmacotécnica homeopática criada por Hahnemann, isto é, a partir de um extrato etanólico de cada matriz específica são realizadas diversas dinamizações/sucussões (diluições seriadas) em água destilada. A solução final é um líquido incolor e inodoro que contém menos de 0,01% de álcool. No presente estudo, utilizou-se uma formulação a partir de *Chelidonium* e associações, codificada M2. Todos os frascos utilizados nesse estudo foram armazenados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por até três meses após a data de fabricação. Eles também foram vigorosamente agitados por 30 vezes imediatamente antes do uso.

Em relação aos parasitas, dispomos da cepa de *Leishmania. amazonensis MHOM / BR / 75 / Josefa*, originalmente isolado a partir de um caso humano de CL difundido por CA. Cuba - Cuba (Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil). As promastigotas foram cultivadas por 5 dias a 25°C em meio de RPMI suplementados com 20% de soro fetal bovino.

Quanto à avaliação da ação direta dos produtos sobre as *Leishmanias*, utilizamos os ensaios de MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). Esse teste é um dos métodos utilizados para se determinar a atividade mitocondrial, e foi adaptado segundo Moreira¹⁸.

As Promastigotas da fase logarítmica tardia (4 dias de cultivo) foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 13 minutos e ressuspensos em meio RPMI e 20% de soro bovino fetal na concentração de 2X10⁷/mL. Em placas de 96 poços foram distribuídos em 8 plicatas 150µL da suspensão contendo 3X10⁶ parasitas. Após o plaqueamento os parasitas foram incubados por 24 horas a 25°C e, em seguida receberam os respectivos tratamentos por 5 dias. Posteriormente ao período de incubação foi adicionado 30µL de MTT a 5mg/mL.

A suspensão foi incubada por 2 horas a 25°C protegido da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 50µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 20% e homogeneizando o conteúdo de cada poço. A leitura foi realizada em leitor de microplacas medindo-se absorvância de 590nm e referência de 690nm. A mitocôndria do parasita vivo converte o MTT em cristais de formazan, que podem ser medidos espectrofotometricamente¹⁹. Três experimentos independentes foram realizados em 8 plicatas para cada tratamento. Como controle positivo de morte dos parasitos nas formas promastigotas os mesmos procedimentos foram realizados utilizando o medicamento Anfotericina B ®.

No que diz respeito à proliferação celular, para a determinação da curva de crescimento da LA, foram utilizadas promastigotas da fase logarítmica tardia (4 dias de cultivo). Estes foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 13 minutos e ressuspensos em meio RPMI e 20% de soro bovino fetal na concentração de 2×10^7 /mL. Em placas de 96 poços foram distribuídos em 8 plicatas $150 \mu\text{L}$ da suspensão contendo 3×10^6 parasitos. Após 4 horas de plaqueamento os parasitas receberam 20% dos respectivos tratamentos, seguidos por doses reforços 1% a cada 24 horas por até 6 dias de incubação a 25°C . Posteriormente ao período de tratamento foram realizadas as contagens em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio invertido, obtendo a média através de duas contagens para cada amostra dos respectivos tratamentos nos períodos consecutivos de 1 a 6 dias.

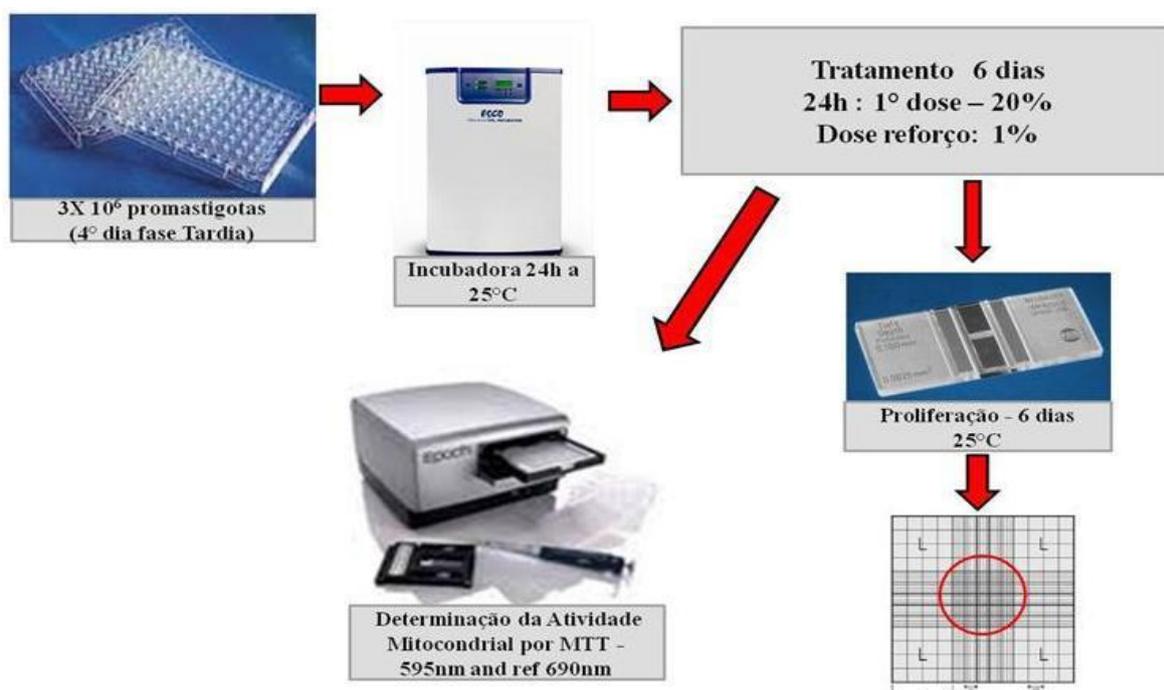


Figura 2- Representação Esquemática dos Ensaios *in vitro*.

Para análise do comportamento das promastigotas *in vitro*, isto é, padrão de formação de rosetas em cultura, a cepa de LA nas formas promastigotas da fase logarítmica tardia (4 dias de cultivo) foram investigadas. Estes foram obtidos por centrifugação a 3000 rpm por 13 minutos e ressuspensos em meio RPMI e 20% de soro bovino fetal na concentração de 2×10^7 /mL.

Em placas de 96 poços foram distribuídos em triplicatas de $150 \mu\text{L}$ da suspensão contendo 3×10^6 parasitos. Decorridos 4 horas de plaqueamento os parasitas receberam 20% dos respectivos tratamentos, seguidos por doses reforços 1% a cada 24 horas por até 96 horas

de tratamento e incubação a 25°C. Após períodos de tratamentos, as culturas foram homogeneizadas 5 vezes com micropipetas e 70 µL da amostra foi transferida para lamínulas de vidro tratadas com polilisina para adesão das promastigotas.

Em seguida, o volume sobre a lamínula foi aspirado com micropipeta e estas, deixadas para secar por aproximadamente 5 minutos em capela e coradas posteriormente com May Grünwald e Giemsa, montadas com Entellan. Para observação das imagens foi selecionado um campo de 3 mm por lamínula o qual foram escaneadas em Microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE). Após o escaneamento foram selecionadas 3 áreas para contagem dos parâmetros: quantidade total das rosetas, quantidade de rosetas fechadas, quantidade rosetas abertas e área das rosetas.

3. DISCUSSÃO

A LTA é uma doença infecciosa, mas não contagiosa causada por um protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae*, parasito intracelular obrigatório que se desenvolve e se multiplica dentro das células fagocitárias que fazem parte do nosso sistema imunológico. Possui duas principais morfologias: promastigota, que é a forma infectante, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados²⁰.

Com efeito, podemos dizer que uma terapia que estimule a resposta imunológica do próprio organismo, como a homeopatia que utiliza uma série de substâncias derivadas de plantas, animais, minerais, substâncias químicas sintéticas ou drogas convencionais, se torna uma alternativa de tratamento mais acessível economicamente e que proporciona uma diminuição dos efeitos colaterais e citotóxicos ao paciente²¹.

Atualmente observa-se, uma clara tendência em priorizar estudos desenvolvidos *in vitro* ou que utilizam métodos alternativos, pois eles evidenciam resultados clínicos que corroboram principalmente na área de medicina complementar, incluindo a homeopatia²².

Dessa forma, nesta pesquisa, analisamos a atividade leishmanicida do produto M2 contra a *Leishmania Amazonensis* (LA) *in vitro*, com o objetivo de investigar se esse produto homeopático apresenta ação direta sob a morfologia da LA, se altera a proliferação e sobrevivência, assim como se esse tratamento modifica a capacidade dos macrófagos *in vitro* de interagirem e endocitarem LA.

De fato, alguns medicamentos homeopáticos atuam em doenças parasitárias, estudos apontam que os efeitos de produtos homeopáticos em doenças parasitárias são benéficos, como na pesquisa realizada com camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com *Phosphorus*, e que tiveram aumento no número de monócitos no 42º dia pós-infecção²³.

Assim, identificamos nesta pesquisa que o complexo homeopático M2 em cultura *in vitro*, promove diminuição da proliferação de LA, após o 4º dia de tratamento (* p< 0,05), seguida de fase de declínio nos 5º e 6º dias, conforme figura 3.

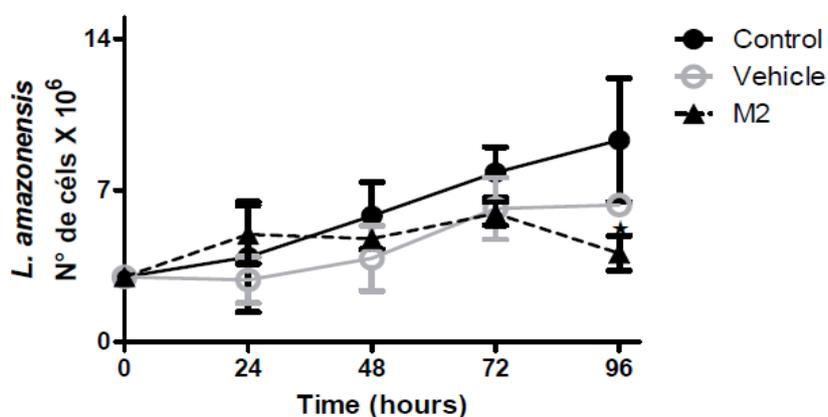


Figura 3- Proliferação Celular: Cultivo de LA (1×10^6) e tratamento com o medicamento

M2. Legenda: Tratamento com M2 (▲), controle (○), sem de tratamento (●). A 1° dose foi de 20% seguida de doses reforço 1 % nos demais dias. Os dados representam a média do experimento realizado durante 6 dias consecutivo * $p < 0,05$ /controle. Fonte: Autoras (2018).

Apesar dos avanços na área da homeopatia, são poucos os estudos descritos na literatura sobre o tratamento de infecções parasitárias com homeopatia.

Recentemente, um estudo desenvolvido com co-cultura de macrófagos contendo a LA tratada com *Antimonium crudum* 30cH *in vitro* apresenta redução significativa da atividade lisossomal e reduz significativamente os picos de produção de uma quimiocina fundamental para o recrutamento de monócitos no sítio inflamatório, a MCP-1 ou CCL2, os quais só ocorrem em células infectadas²⁴.

Considerando o caráter translacional natural do fenômeno homeopático, isso significa que, numa situação clínica hipotética, o tratamento de pacientes com *Antimonium crudum* 30cH poderia levar à melhora das lesões inflamatórias, mas não à eliminação da infecção.

Em relação ao ciclo de vida das *Leishmanias*, para garantir sua sobrevivência os parasitas precisaram adquirir adaptações evolutivas ao longo do trato digestório dos flebotomíneos. Estas adaptações incluem secreção de “promastigote secretory gel” (PSG), contendo proteofosfoglicanos (PPG)²⁵.

O PSG produzido pelas formas promastigotas atua na sobrevivência e colonização do parasita no vetor, e no desenvolvimento da infecção em mamíferos²⁵, apresentando também a finalidade de facilitar e aumentar a transmissão do parasita²⁶.

Logo, a figura 5 apresenta imagens do grupo controle de LA, nas quais observamos o padrão de formação característico de promastigotas metacíclicos infectivos em rosetas, que podem ser fechadas ou abertas. Nota-se na imagem 5 a formação de inúmeras rosetas contendo muitos promastigotas reunidos pelos seus flagelos, formando um nicho que favorece a multiplicação dos parasitas, bem como a troca de material genético entre si observados por Bates *et al*²⁷.

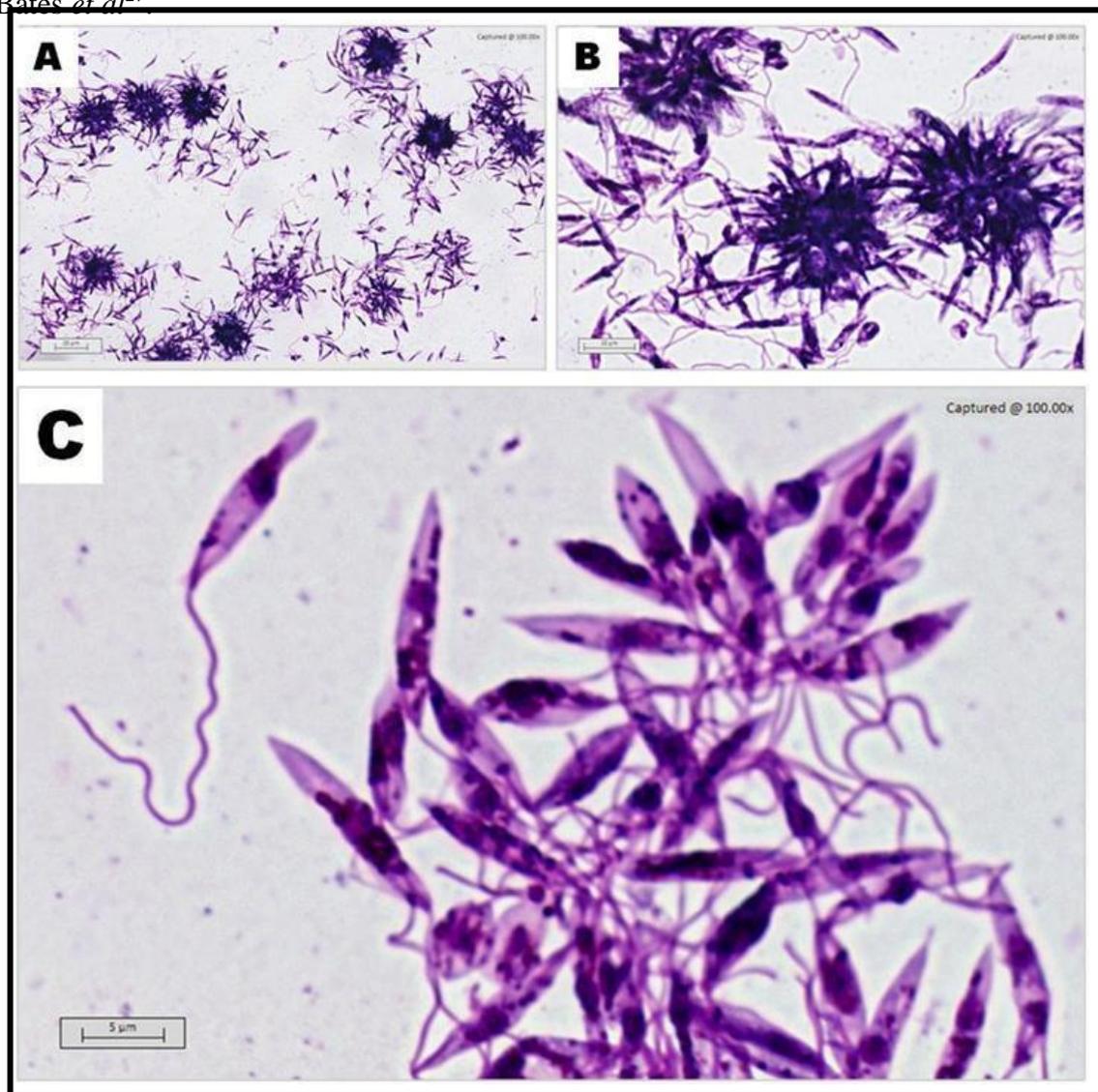


Figura 5-Formação de Rosetas Grupo Controle-72 Horas: Observamos na imagem **A** (100x) e **B** (400x) que as rosetas são fechadas e que estas apresentam muitos parasitas reunidos pelos seus flagelos. Em **C** *leishmanias* em maior aumento (1000x). Coradas com May Grünwald Giemsa. As imagens foram escaneadas em Microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE).

Em paralelo, resolvemos analisar se o tratamento com o produto M2 poderia alterar o padrão de formação de rosetas, durante o cultivo em massa. A figura 6 apresenta imagens da cultura com LA tratadas com M2, nota-se que as rosetas são formadas por *Leishmanias* contendo formas alteradas, isto é, arredondada, muito diferente da morfologia metacíclica observada no grupo controle da figura 5, na imagem C.

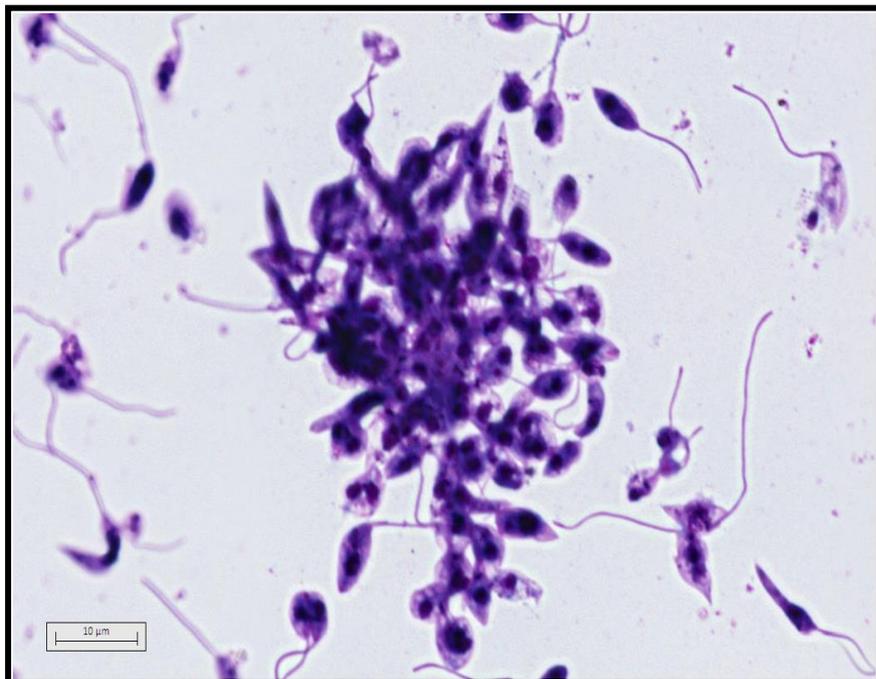


Figura 6- Formação de rosetas de LA do grupo de tratamento com M2, após 72 horas.

Legenda: Observamos na imagem A (1000x) que as rosetas são formadas por parasitas com sua morfologia alterada. Essa imagem foi Corada com May Grünwald Giemsa e escaneada em Microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE). Fonte: Autoras (2018).

De fato, as culturas que receberam o produto M2, apresentam menor quantidade de rosetas e os parasitas ao redor das poucas rosetas presentes são alterados morfologicamente, muitos perderam o flagelo, possuem morfologia globosa, núcleos desorganizados ou estão em processo de apoptose, pois apresentam um aspecto de sofrimento celular.

Assim, observamos na figura 7, conforme o gráfico, que as culturas de LA tratadas com o produto M2, tiveram no período de 24 horas e 48 horas uma diminuição significativa no número de rosetas.

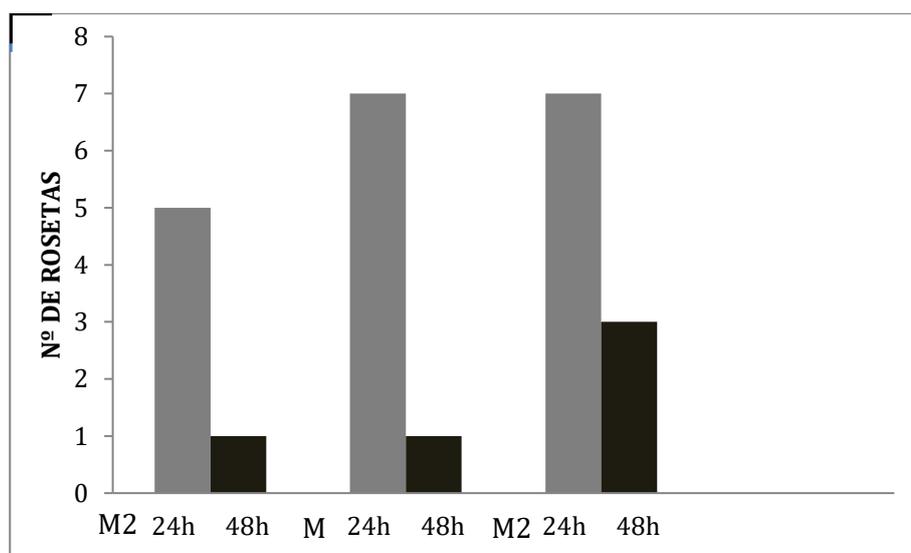


Figura 7- Interação do produto M2 sobre a LA: Representação gráfica, com os resultados de 3 experimentos independente em culturas *in vitro* com LA, tratadas com M2 no período de 24 horas e 48 horas.

A literatura contempla que os medicamentos homeopáticos carregam sinais específicos que agem como gatilho para “ligar” ou “desligar” genes relevantes, os quais iniciam uma cascata de ação gênica para reparar, balancear ou corrigir a expressão de genes que estariam alterados em certas condições patológicas²⁸. Esses produtos têm efeito anti-inflamatório conhecido em animais infectados com LA.

Além disso, resultados *in vitro* demonstraram aumento nas concentrações de óxido nítrico (NO) na cultura de macrófagos tratados com compostos homeopáticos. O óxido nítrico é capaz de atuar diretamente sobre os parasitas, provocando efeitos tóxicos e inibitórios sobre diversos processos celulares, como crescimento e multiplicação²⁹.

Embora os compostos homeopáticos atuem nos sistemas biológicos a médio e/ou longo prazo, promovendo ativação de células do sistema imunológico, melhorando o indivíduo e podendo levar à cura, nossos resultados mostram que o produto M2 age sobre as formas promastigotas de LA a partir de 48 horas de tratamento, conforme figura 8. Os

resultados obtidos através dos ensaios de MTT mostraram aumento da atividade mitocondrial dos parasitas pelo complexo M2 (***) $p < 0,001$).

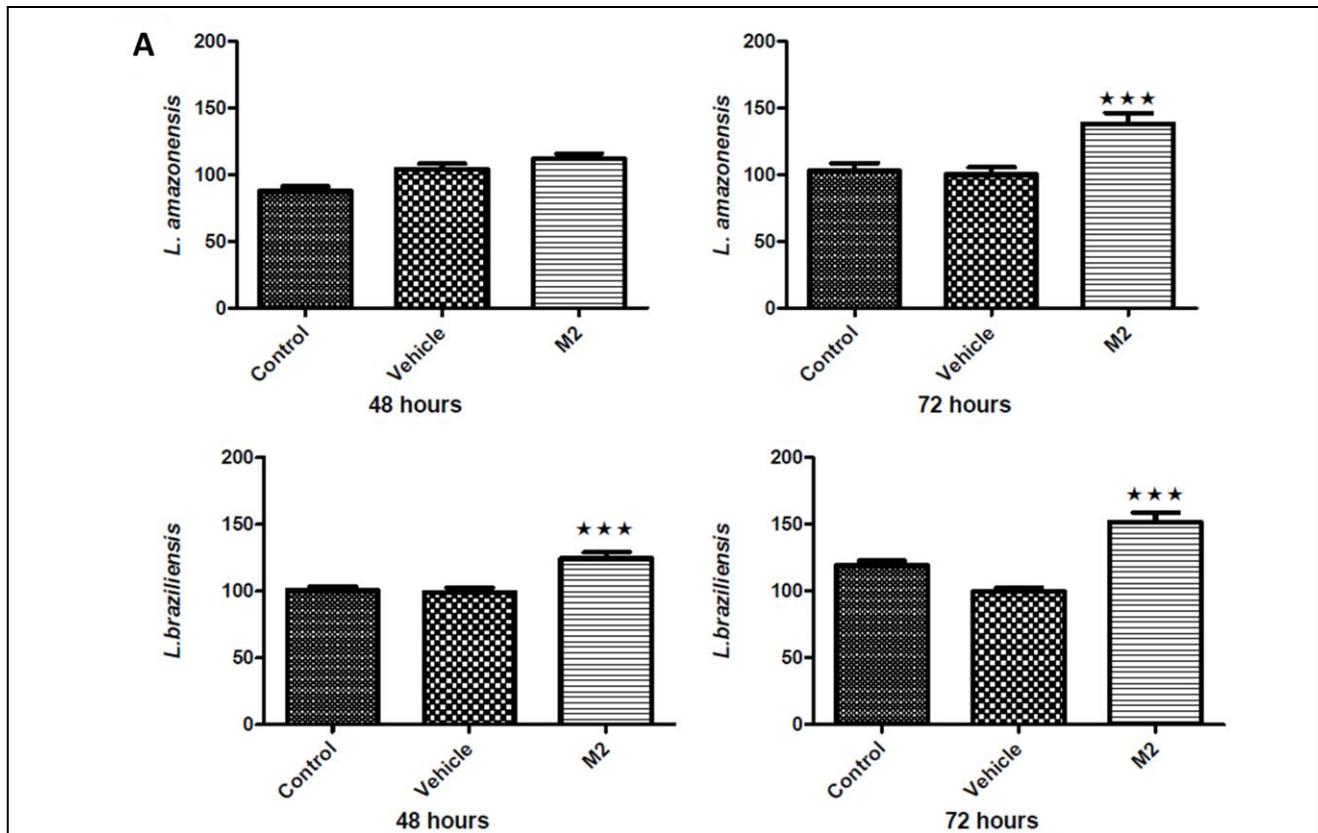


Figura 8- Atividade Mitocondrial *in vitro*- MTT: Os gráficos representam a atividade mitocondrial das cepas de LA, tratadas com M2 por 48 e 72h. Após 48 horas, percebe-se que o produto M2 diminui significativamente atividade mitocondrial em relação ao grupo controle. Os resultados de 3 experiências independentes foram analisados estatisticamente usando o teste t.

Diante dos resultados obtidos através da ação direta, percebemos que o produto M2 age sobre as formas promastigotas de *LA* em cultura. Este medicamento alterou a proliferação celular, a morfologia e/ou atividade mitocondrial das promastigotas. Embora não possamos compreender o mecanismo exato de ação, sabemos que eles continuaram agindo sobre as formas promastigotas após receberem doses reforços de 1%.

Em virtude dos dados apresentados nesta pesquisa, entende-se que o produto M2 demonstra ser um recurso imunomodulador, do ponto de vista epidemiológico, pois auxilia na potencialização e eficácia parasiticida dos quimioterápicos usados tradicionalmente no tratamento da leishmaniose.

A terapia imunológica moderna envolve o uso de imunomoduladores, essas drogas podem exacerbar ou reduzir a resposta imune, buscando manter o equilíbrio do sistema imunológico do paciente e modificando o curso da doença³⁰.

Atualmente é indiscutível a procura por terapias alternativas que sejam efetivas, de baixo custo e que cumpram na integralidade os princípios da bioética da beneficência / não maleficência. Nesse contexto, a utilização de homeopáticos demonstram evidências de seus resultados no tratamento de doenças de todas as naturezas, pois além de não apresentarem efeitos colaterais, possuem ações modulatórias sobre a resposta imunitária e são de baixo custo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista dos resultados apresentados, percebe-se que o produto M2, não promove um efeito “antibiótico”, mas uma ação estimuladora, pois proporciona uma adaptação do organismo hospedeiro à presença do patógeno.

Os dados obtidos nessa pesquisa adquirem especial relevância se compararmos o complexo M2 ao grande número de drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose, que apresentam elevada toxicidade e induzem a resistência do parasito, resultando em ineficácia terapêutica e em baixa adesão ao tratamento.

Considerando que o tratamento da leishmaniose continua longe de ser ideal e sabendo-se que o uso da homeopatia vem crescendo nos últimos anos, nossos resultados indicam que terapias alternativas combinadas com os medicamentos convencionais de tratamento da leishmaniose, podem auxiliar no aumento da eficácia e na tolerância do paciente ao procedimento, reduzindo a duração e o custo da terapia, além de limitar o surgimento de resistência à droga.

Portanto, o complexo M2 age sobre formas promastigotas de LA reduzindo o número total de rosetas (as mesmas para rosetas abertas e fechadas) que estão relacionadas à forma infecciosa de promastigotas, que produzem PSG enquanto em rosetas. Este resultado sugere que o tratamento com o produto M2 é capaz de diminuir a infectividade da *Leishmania*. Embora não tenha sido investigado nesta pesquisa, acreditamos que o M2 possa alterar a produção de PSG. De fato, nossos resultados abrem novas perspectivas para o tratamento e / ou prevenção da leishmaniose, assim como novas possibilidades a serem pensadas e testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pan American Health Organization (PAHO) e World Health Organization (OMS). Control de Las Leishmanioses. [internet]. 2014 [acesso em março de 2019]. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40250&lang=en
2. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do

- Ministério da Saúde. Rev. Saúde Pública. [internet]. 2010 [acesso em 10 de maio de 2019]; 44 (1) :200-2 Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rsp/v44n1/23.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>
3. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil e grandes regiões e unidade federais de 1990 a 2016. [internet]. 2017 [acesso em 10 de maio de 2019]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11328-situacao-epidemiologica-dados>
 4. Torres Filho D, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brasil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev. Inst. Med. 2006; 48(3): 151-156.
 5. Negrão GN. Circuitos espaciais da leishmaniose tegumentar americana no estado do Paraná. Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde.2013; 9:74-94. Disponível em:<http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/23164>
 6. Costa JML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. Gaz Med Bahia.[internet]. 2005 [acesso em 20 de agosto de 2019]; 75(1): 3-17.
 7. Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. J Bras Med. [internet]. 1992; 63:82-104.
 8. Griensven JV, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. Lancet infect dis. 2010; 10:184-194.
 9. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous *leishmaniasis*. Dermatology Therapy. 2009; 22(6):491-502
 10. Organização Mundial da Saúde- OMS. Relatório da Quinta Reunião Consultiva sobre Coinfecção Leishmania / HIV. [internet]. 2007 [acesso em 10 de novembro de 2019]; Etiópia, 20-22 de março. Disponível http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:5ddLY16KvdUJ:bvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_pacientes_leishmania.pdf+&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br
 11. Nony P, Boissel JP, Girard P, et al. The role of an initial single-blind placebo period in phase I clinical trials. Fundam Clin Pharmacol. 1994; 8: 185-7.
 12. Adler UC; Ambrosio E, Anelli M, Cappello E, Guimarães EC. A strict definition of homeopathy according to Hahnemann. British Homeopathic Journal. [internet]. 1996; 85:79-82.
 13. Bonamin, LV. Signal and Images - contributions and contradictions about high dilution research. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1. 222p .
 14. Kassab S, Cummings M, Berkovitz S, Van Haselen R, Fisher P. Homeopathic medicines for adverse effects of cancer treatments. Cochrane Database Syst Rev. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19370613/>
 15. Nony P, Boissel JP, Girard P, et al. The role of an initial single-blind placebo period n phase I clinical trials. Fundam Clin Pharmacol. 1994; 8:185-7.
 16. Wassenhoven MV. Scientific framework of homeopathy: evidence based homeopathy. Revised edition after 69th LMHI Congress. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228340927_Scientific_framework_of_homeopathy_

17. Chakravarty J, Sundar S. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2010; 2(2):167–176.
18. Moreira ME, Del Purtillo HÁ, Milder RV, Balanco JM, Barcinski MA. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania amazonensis*. *J Cell. Physiol*. 1996;7(2):305-313.
19. Monsmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65(12):55-63.
20. Sacks D, Kamhaw S. Molecular aspect of parasite-vector and Vector-host interaction in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol*. 2001;55:453-483.
21. Jacobs J, Jonas WB, Jiménez-Pérez M, Crothers D. Homeopathy for childhood diarrhea: combined results and metaanalysis from three randomized, controlled clinical trials. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22(3):229-34.
22. Chatfield K, Mathie RT, Bonamin LV, Oberbaum M, Fisher P. The publication in Homeopathy of studies involving animal experimentation. *Homeopathy*. 2016; 105(3): 211-6.
23. Almeida LR, Campos COM, Herrera HM, Bonamin LV, Fonseca AH. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Homeopathy*. 2008;65-69.
24. Santana FR, Dalboni LC, Nascimento KF, et al. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage - *Leishmania (L.) amazonensis* interaction *in vitro*. *Cytokine*. 2017; 92: 33-47.
25. Roger ME. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3.
26. Ramalho-Ortigão M, Saraiva EM, Traub-Cseko M. *Leishmania* Interactions: Long Relationship are not necessarily Easy. *The open Parasitology Journal*. 2010; 4:195-204.
27. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International J for Parasitology*. 2007; 37:1097-1106.
28. Khuda-Bukshh AR. Mice as a model for homeopathy research. *Homeopathy*. 2009;98:267-279.
29. Pereira WKV, Lonardon MVC, Grespan R, Caparroz-Assef SM, Cuman RKN, Bersani-amado CA. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Infection*. 2005;51:157–164.
30. Lima HC. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. *An. Bras. Dermatol*. 2007 ; 82(3):207-221.