

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAROLINE FELICIO BRAGA

Efeito de medicamento produzido com cistos de *Toxoplasma gondii* em  
camundongos infectados com este protozoário

Maringá  
2013

CAROLINE FELICIO BRAGA

Efeito de medicamento produzido com cistos de *Toxoplasma gondii* em camundongos infectados com este protozoário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.  
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvana Marques de Araújo

Maringá

2013

# FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINE FELICIO BRAGA

Efeito de medicamento produzido com cistos de *Toxoplasma gondii* em camundongos infectados com este protozoário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana Marques de Araújo  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Falavigna Guilherme  
Universidade Estadual de Maringá

Dr<sup>a</sup> Solange Monteiro de Toledo Piza Gomes Carneiro  
Instituto Agrônômico do Paraná

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cidéli de Paula Coelho  
Universidade de Santo Amaro

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2013.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIAS

A Deus, por me ter concedido tão imensa graça e benção de chegar até aqui, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais Antônio Carlos Braga (*In memoriam*) e Cleuza Aparecida Felicio Braga, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho meu crescimento pessoal e profissional e por todos os ensinamentos que formaram os alicerces da minha história.

Aos meus amados e queridos irmãos Douglas Felicio Braga e Guilherme Felicio Braga, que iluminam o caminho da minha vida com quem posso contar sempre.

Ao meu noivo Thiago José da Silva, pelo amor, paciência, compreensão, por me completar e me fazer feliz. Eu te amo!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Á Deus pela iluminação, força e encorajamento desta importante fase de crescimento pessoal e profissional.

Á minha família pelo amor incondicional, por acreditarem, por torcerem fielmente e mesmo com a distância estão sempre comigo, é imensurável o amor que sinto por vocês.

À minha orientadora, professora doutora Silvana Marques de Araújo, pela paciência, dedicação, atenção, por todo conhecimento a mim transmitido, por estar sempre motivando e guiando nos grandes desafios, esses anos de convivência me mostraram a grandeza da professora, da pesquisadora, da mãe, da amiga, da mulher na qual me inspiro e orgulho de ter como orientadora.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana, pelo cuidado, apoio, pelos ensinamentos e por todas orientações transmitidas ao longo de todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Gentil Ferreira Gonçalves pela disposição e contribuição que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Á Neide Martins Moreira, grande amiga e parceira de todas as horas.

Á todos os amigos, estagiários, funcionários e professores do Departamento de Parasitologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, pela companhia diária no laboratório de pesquisa e por contribuírem para o meu crescimento científico e pessoal.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela amizade, pelas orientações, incentivos e ensinamentos a mim dedicados.

À todos os colaboradores que participaram deste estudo, pelo apoio, pela contribuição e pela oportunidade de me integrar e adquirir conhecimentos.

## EPÍGRAFE

O Senhor é o meu pastor e nada me faltará. Deitar-me faz em pastos verdejantes, guia-me mansamente a águas tranqüilas. Refrigera a minha alma, guia-me nas veredas da justiça por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque tu estás comigo, a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges com óleo a minha cabeça, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Salmo 23 (Bíblia Sagrada)

Efeito de medicamento produzido com cistos de *Toxoplasma gondii* em camundongos infectados com este protozoário

## RESUMO

Comparou-se em ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio, o efeito de diferentes diluições de bioterápicos de *T. gondii*. Cinquenta e seis camundongos machos, *Swiss*, 60 dias, foram distribuídos em grupos segundo o tratamento: BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30, BIOT-TG60, BIOT-TG100, BIOT-TG200, GCInf - grupo controle infectado tratado com álcool de cereais-7% e GCN - grupo controle não infectado e não tratado. Os bioterápicos foram produzidos segundo Farmacopéia Homeopática Brasileira, com macerado de cérebro de camundongos (20 cistos *T. gondii*/100 $\mu$ L). Os animais receberam tratamento por três dias consecutivos antes da infecção. Para os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60 e GCInf administrou-se 0.1mL/4X/dia, no primeiro dia e 2X/dia nos demais dias de tratamento. Para BIOT-TG100 e, BIOT-TG200 foi utilizado 0.1mL/dose única/dia. Aos 60 dias os animais foram infectados (20 cistos cepa ME49-*T. gondii*), via oral. Foram avaliados parâmetros clínicos antes, durante a administração do bioterápico e após a infecção. Foram realizada fundoscópica e tonometria ocular aos 55 dias pós-infecção. Sessenta dias após a infecção foram contados cistos cerebrais e estimado o número de bradizoítos/cisto. Foi dosado *TGF- $\beta$*  sérico (ELISA). Comparação estatística com o teste de Kruskal-wallis, 5% de significância. O número de bradizoítos por cistos foi menor ( $p < 0.05$ ) para os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG100 e BIOT-TG200 em relação ao GCInf. O número de cistos apresentou tendência à diminuição em BIOT-TG17 e BIOT-TG200 em relação ao GCInf. Durante o tratamento foram observadas diminuição do consumo de água ( $p = 0,0392$ ) e ração ( $p = 0,0225$ ) nos grupos BIOT-TG30 e BIOT-TG60 e diminuição na eliminação de excretas ( $p = 0,0021$ ) nos grupos BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60, em relação ao GCInf. Houve mortalidade de um ou dois animais nos grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60. Após a infecção foram observadas redução de peso ( $p < 0,01$ ) nos grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60 e redução na quantidade de excretas ( $p = 0.0284$ ) nos grupos BIOT-TG7 e BIOT-TG30. Animais tratados com BIOT-TG7 e BIOT-TG30 apresentaram ascite acentuada e houve uma morte no grupo BIOT-TG200. Na fundoscopia ocular 80% dos animais do grupo BIOT-TG100 não apresentaram alterações e 20% apresentaram hemorragia sub-retiniana discreta em volta do nervo óptico. Na tonometria ocular assim como nos níveis de *TGF- $\beta$*  não houve diferença entre os grupos. A comparação estatística e a observação diária revelam claramente diferença de efeito entre os bioterápicos. Os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60 apresentam alterações clínicas mais intensas em relação ao GCInf. Os grupos tratados com diluições maiores BIOT-TG100 e BIOT-TG200 proporcionaram benefícios mais efetivos, destacando o BIOT-TG200 como o medicamento de escolha por apresentar resultados mais satisfatórios, merecendo aprofundamento de estudos.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, Bioterápico, *TGF- $\beta$* .

Effect of medication produced with cysts of *Toxoplasma gondii* in mice infected with this protozoan

**ABSTRACT**

We compared the test blind, controlled, randomized by draw the effect of different dilutions of biotherapeutic *T. gondii*. 56 male mice, Swiss, 60 days, were divided into groups according to treatment: BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30, BIOT-TG60, BIOT-TG100, BIOT-TG200, GCInf - infected control group treated with alcohol cereals -7% and GCU- uninfected control group and untreated. The biotherapeutics were produced according to Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia, with macerated mice brain (20 cysts *T. gondii*/100 $\mu$ L). The animals were treated for three consecutive days prior to infection. For groups BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 and BIOT-TG60 and GCInf 0.1mL/4X/dia was administered on the first day and 2X/day remaining days of treatment. For BIOT-TG100 and BIOT-TG200 was used only 0.1mL/dose / day. At 60 days the animals were infected (strain ME49 cysts 20-*T. Gondii*), orally. Clinical parameters were evaluated before, during and after administration of biotherapeutic infection. Tonometry was performed ocular funduscopy and at 55 days post-infection. Sixty days after infection brain cysts were counted and estimated the number of bradyzoites / cyst. *TGF- $\beta$*  was dosed serum (ELISA). Statistical comparison with the Kruskal-wallis, 5% significance level. The number of cysts per bradyzoites was lower ( $p < 0.05$ ) for groups BIOT-TG7, BIOT-TG100 and BIOT-TG200 compared to GCInf. The number of cysts tended to decrease in BIOT-TG17 and BIOT-TG200 compared to GCInf. During treatment were observed decrease in water consumption ( $p = 0.0392$ ) and diet ( $p = 0.0225$ ) groups BIOT-TG30 and BIOT-TG60 and decreased excreta disposal ( $p = 0.0021$ ) groups BIOT-TG17, and BIOT-TG30, BIOT-TG60, relative to GCInf. There was a mortality rate of one or two animals in groups BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 and BIOT-TG60. After infection were observed weight reduction ( $p < 0.01$ ) in the groups BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 and BIOT-TG60 and reduction in the quantity of excreta ( $p = 0.0284$ ) in the groups BIOT-TG7 and BIOT-TG30. Animals treated with BIOT-TG7 and BIOT-TG30 showed marked ascites and there was a death in the group BIOT-TG200. In the ocular fundus 80% of group BIOT-TG100 showed no change and 20% had mild subretinal hemorrhage around the optic nerve. In ocular tonometry in the levels of *TGF- $\beta$*  there was no difference between groups. The statistical comparison and daily observation clearly shows the difference in effect between biotherapeutics. The groups BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 and BIOT-TG60 had clinical more intense compared to GCInf. The groups treated with higher dilutions BIOT-TG100 and BIOT-TG200 provided benefits more effective, highlighting the BIOT-TG200 as the drug of choice for presenting results more satisfactory, deserving further studies.

**Keywords:** Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, Biotherapeutic, *TGF- $\beta$* .

Dissertação elaborada e formatada conforme  
as normas da ABNT (capítulo I) e das  
publicações científicas (Capítulo II):

*International Journal of Experimental  
Pathology*

disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/1/%28ISSN%291365-2613>>

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	11
1.1	Histórico	11
1.2	Toxoplasmose	11
1.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.4	Epidemiologia	14
1.5	Tratamento	15
1.6	Justificativa	16
1.7	Objetivos	17
1.8	Referências	18
2	CAPÍTULO II	22
2.1	Efeito de medicamento produzido com cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos infectados com este protozoário	22
3	CAPÍTULO III	49
3.1	Conclusões	49
3.2	Perspectivas Futuras	50

## CAPÍTULO I

### 1.1 HISTÓRICO

O *Toxoplasma gondii* foi descoberto no Brasil por Alphonso Splendore (1908) ao necropsiar e analisar a morte de coelhos por paralisia. O parasito recebeu o nome de *Toxoplasma cuniculi*, na ocasião. Simultaneamente, Nicolle, Manceaux (1908) em Tunis, identificaram o parasito num roedor (*Ctenodactylus gondii*) originário do norte da África, identificando-o como *Leishmania gondii*. Em 1909, estes autores constataram que se tratava de novo protozoário e modificaram o gênero para *Toxoplasma*. O nome deriva do grego no qual *toxon* = arco e *plasma* = forma, referindo-se ao formato de lua crescente do taquizoíta (DUBEY, BEATTIE; 1988). Levantamentos sobre casos de infecção por *Toxoplasma gondii* têm sido relatados desde então. Segundo Pizzi (1997), o primeiro caso de toxoplasmose humana, menino com quadro febril e com esplenomegalia, foi descrito por CASTELLANI, em 1913. De acordo com ORÉFICE, BAHIA-OLIVEIRA (2005), o primeiro caso de toxoplasmose no Brasil foi descrito por Magarino (1927) que relatou o encontro do parasito em necrópsia de um paciente com meningoencefalite, miocardite e miosite.

Pinkerton, Weinman, em 1940, nos Estados Unidos, relataram o re-isolamento do parasito em adultos. Mas, somente após o desenvolvimento de um teste sorológico, o clássico teste do corante de Sabin & Feldman, desenvolvido em 1948, é que foi possível demonstrar a alta prevalência da toxoplasmose em todo mundo, o que contribuiu imensamente para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, possibilitando a realização de inquéritos epidemiológicos (NEVES et al., 2000). Nos anos 70, completou-se o conhecimento do ciclo biológico desse parasito através da descoberta dos estágios sexuais no intestino delgado de gatos (FRENKEL et al., 1970). Miller et al. (1972) provaram que os únicos mamíferos capazes de suportar o ciclo sexuado intestinal do *Toxoplasma gondii* e excretar os oocistos são os felinos, tanto domésticos quanto selvagens.

### 1.2 TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário apicomplexo intracelular de ciclo de vida heteroxênico, capaz de infectar uma ampla variedade de vertebrados de sangue quente e até 30% da população mundial humana (TENTER et al., 2000). O gato doméstico e outros felídeos são os

hospedeiros definitivos, e muitas espécies de vertebrados, inclusive o homem, podem servir como hospedeiros intermediários. A infecção em hospedeiros definitivos ou intermediários ocorre comumente, mas os sinais clínicos são raros (TABOADA, MERCHANT, 1997). A toxoplasmose é transmitida principalmente pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, mas também potencialmente pela ingestão de vegetais ou água contaminados com oocistos esporulados (TENTER et al., 2000).

Em humanos saudáveis, a infecção é assintomática em 70% dos casos. Em contraste, em indivíduos imunossuprimidos, tais como portadores da AIDS (Síndrome de imunodeficiência adquirida) e pacientes em uso de quimioterápicos ou imunossuppressores, a toxoplasmose aguda causa uma infecção potencialmente letal (REMINGTON, McLEOD, 1992; TENTER et al., 2000). Além disso, a toxoplasmose congênita pode causar dano fetal grave, podendo culminar em aborto espontâneo (PETERSEN et al., 2001). RAVEL 1998 salienta que quando a infecção aguda manifesta-se no primeiro trimestre de gravidez, 14% dos fetos apresentam-se infectados, no segundo 29% e no terceiro 59%. Para esse autor, 90% das mães que apresentaram infecção aguda durante a gravidez eram assintomáticas. A incidência de toxoplasmose aguda na gravidez varia de 0,06 a 1,4% (REMINGTON, 1990).

A infecção aguda em gestantes pode estar associada a lesões fetais que podem variar de formas subclínicas, morte intra-uterina ou danos no sistema nervoso central (SNC) como calcificações cerebrais, hidrocefalia, microcefalia e coriorretinite (REMINGTON et al., 2001). O recém-nato freqüentemente pode apresentar baixo peso, hepato e esplenomegalia, quadros de anemia, presença de plaquetopenia e danos oculares resultantes de processos inflamatórios da retina. Crianças aparentemente normais ao nascer podem subseqüentemente desenvolver injúrias associadas à toxoplasmose (PELLOUX et al., 2002). A retinocoroidite supostamente toxoplásmica é a causa mais comum de uveíte posterior em várias partes do mundo, incluindo regiões da Europa e Américas do Norte e do Sul (HOLLAND, 2003). A prevalência da doença ocular em pacientes infectados pelo *T. gondii* ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que o envolvimento ocular é mais freqüente e mais grave em neonatos e adultos imunocomprometidos (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002).

Na fase aguda da toxoplasmose, primeiro ocorre a produção de imunoglobulina IgM, seguida da produção de imunoglobulina IgG. A infecção pode também produzir imunoglobulina IgA, no caso da transmissão ter sido por via oral. Pela técnica de imunofluorescência, os anticorpos IgM podem ser dosados 1 a 2 semanas depois do início da infecção, alcançando um pico em 6 a 8 semanas, quando então declinam. Títulos baixos podem persistir por mais de 12 meses. O anticorpo IgG persiste por toda a vida na maioria dos

pacientes (GOLDSMITH, 1998). Em função da variedade fisiopatológica e clínica da infecção, as modalidades de diagnóstico devem ser diferenciadas em se tratando de uma reativação em indivíduos imunodeprimidos, de infecção congênita e neonatal ou infecção primária e infecção em indivíduos imunocompetentes (SPALDING et al., 2003). O diagnóstico pode ser feito pela demonstração do parasito. No entanto, a pesquisa pelo exame direto é difícil e deve, freqüentemente, ser complementada por métodos indiretos tais como inoculação em animais de laboratório, cultura celular ou técnicas sorológicas (DUBEY, BEATTIE, 1998). A reação de *Nested*-PCR tem sido considerada uma técnica mais sensível em relação a outros ensaios sorológicos (SAVVA et al., 1990). Esta reação tem sido muito útil, quando os títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, em pacientes imunocomprometidos, forem baixos ou ausentes ou em pacientes com gamaglobulinopatias, cujos títulos de anticorpos para *T.gondii* forem muito altos, mas que podem não estar causando tal condição clínica (GARCIA, BRUCKNER, 1997).

### 1.3 *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* é um patógeno intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves (SOUZA, 2010). O nome do gênero é derivado de *TOXON*, palavra grega que significa arco e que se refere à forma que os taquizoítos apresentam *in vitro* (SILVA, 2006). O *T. gondii* pertence ao reino Protista, subreino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidea, ordem Eucocciidida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidea, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma*, espécie *T. gondii* (MEIRELES, 2001). O *T. gondii* pode ser encontrado em três diferentes formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (MONTROYA, LIESENFELD, 2004).

“Taquizoíto” (taqui = rápido), estágio de rápida multiplicação em qualquer célula de um hospedeiro intermediário e em células epiteliais não intestinais dos hospedeiros definitivos (FRENKEL, 1973). O termo “taquizoíto” substitui o termo “trofozoíto” (trophicos = alimentação em grego) que era usado anteriormente. Estas formas estão presentes em grande quantidade na fase aguda da infecção no interior das células afetadas, sendo responsável pela sintomatologia característica da doença. Meireles (2001) descreve que os taquizoítos são os prováveis responsáveis pela transmissão transplacentária. Os taquizoítos medem aproximadamente 2 a 6µm e se dividem assexuadamente no interior da célula do hospedeiro por sucessivas endodogênias, uma forma de reprodução especializada onde duas células-filhas se formam no interior da célula-mãe que se rompe e libera a progênie, a qual

crece atingindo o tamanho adulto e repete o processo. A célula do hospedeiro se rompe quando não suporta mais o aumento do número de taquizoítos. As taxas de invasão e crescimento variam dependendo da cepa de *T. gondii* e o tipo de célula hospedeira (DUBEY et al, 1998).

Os bradizoítos (*brady* = lento) são morfologicamente semelhantes aos taquizoítos, mas possuem uma replicação lenta. É a forma de resistência do *T.gondii* nos tecidos, encontrada durante a fase crônica da infecção (FRENKEL, 1973). É mais delgado e mede cerca de 7 µm de comprimento por 1,5 µm de largura. São encontrados no interior dos cistos teciduais, cujo tamanho varia de 10-100 µm. DUBEY et al., (1998) relatam que cistos grandes podem conter até 3000 bradizoítos que se dividem lentamente por endodiogenia. Os cistos teciduais são característicos da fase crônica da toxoplasmose, mas podem ocasionalmente ser encontrados na fase inicial da infecção (começam a se formar entre o sexto e o oitavo dia de infecção). Em estados de imunossupressão, os cistos teciduais se rompem e os parasitos se proliferam rapidamente. Os cistos teciduais representam uma importante forma de transmissão da toxoplasmose já que persistem ao longo da vida nos tecidos dos animais infectados e podem ser ingeridos por carnívoros, incluindo os humanos. Esta forma é resistente à digestão péptica e sobrevivem várias horas após a exposição às enzimas digestivas (DUBEY et al.,1998). Após a ingestão, a parede do cisto é rompida liberando bradizoítos viáveis, capazes de invadir o trato digestivo do hospedeiro (ORÉFICE, BAHIA-OLIVEIRA, 2005).

Já o oocisto representa o estágio mais resistente de *T. gondii*, por possuir uma parede dupla bastante resistente às condições ambientais (DUBEY et al., 1998). São produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes, e eliminados imaturos juntamente com as fezes (FRENKEL et al., 1970; MILLER et al., 1972). Os oocistos medem 10 x 13 µm e possuem em seu interior dois esporocistos (6 x 8 µm), os quais contém quatro esporozoítos cada (2 x 8 µm) (FRENKEL et al., 1970). O oocisto esporulado contém oito esporozoítos e é a forma madura e infectante do oocisto, que sob condições favoráveis, pode permanecer infectivo por mais de um ano (ORÉFICE, BAHIA-OLIVEIRA, 2005).

#### **1.4 EPIDEMIOLOGIA**

A soroprevalência mundial dessa infecção em humanos é relativamente alta, podendo alcançar taxa de até 90% em algumas regiões (SOBRAL et al., 2005). Dubey (2004) destaca que a toxoplasmose ocorre em milhões de pessoas no mundo inteiro, sendo que a prevalência da infecção humana, na maioria dos países, está entre 40% e 50% e no Brasil essa taxa pode

chegar até 80%, dependendo da área estudada. Porém, a frequência da infecção é extremamente variável nas diferentes regiões do planeta. Esta variabilidade está ligada a diversos fatores, tais como padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade, procedência rural ou urbana, entre outros (AMENDOEIRA et al. 1999, SPALDING et al. 2005).

A incidência de infecção pré-natal pode variar de 1 a 120 em 10.000 nascimentos, sendo que a soro prevalência entre mulheres em idade fértil pode variar de 4 a 85% (TENTER et al., 2000). Estima-se um custo anual acima de cinco milhões de dólares com tratamentos de crianças congenitamente infectadas nos Estados Unidos (FRENKEL, 1990; GUERINA et al., 1994). A prevalência de lesões oculares no Brasil é bastante variável de acordo com a área estudada. Em estudantes da Cidade de Natal (RN), a prevalência encontrada foi de 1,2%, já em Erichim no sul do Brasil foi de 17,7%. (GARCIA et al., 2004). Um dos maiores surtos de toxoplasmose ocorreu no Brasil, em Santa Isabel do Ivaí-PR, onde, aparentemente, uma única gata com seus filhotes contaminaram o manancial de água da cidade, o que levou a infecção de mais de 500 pessoas com todas as consequências da doença, ou seja, formas congênitas e oculares (NAVARRO, 2002; DUBEY et al., 2004).

## 1.5. TRATAMENTO

Há aproximadamente 30 anos, intervenções terapêuticas têm sido usadas no tratamento da toxoplasmose aguda (DEROUIN 2001). Apesar do tratamento conseguir controlar as formas de rápida proliferação, não existe nenhuma droga capaz de eliminar os cistos teciduais latentes em humanos e animais, que se mantêm viáveis por longo período, podendo reativar a infecção (BEAMAN et al. 1992).

O tratamento antiparasitário durante a gravidez pode reduzir a transmissão ou seqüelas no feto, por isso, é muito importante identificar a doença o mais cedo possível (FULON et al. 1999). A toxoplasmose congênita é assintomática na maioria das crianças ao nascer. No entanto, se não diagnosticada e não tratada, quase todas as crianças infectadas irão desenvolver deficiências visuais ou neurológicas na idade adulta (McAULEY et al. 1994). As gestantes que apresentarem suspeita de infecção por *T. gondii* adquirida durante a gestação devem ser imediatamente tratadas com espiramicina que é ministrada para prevenir a transmissão do *T. gondii* da mãe para o feto (THIÉBAUT, 2007). A etapa seguinte deverá ser investigar a infecção do feto pelo protozoário. Se a infecção toxoplásmica fetal for confirmada, ou nas infecções adquiridas nas fases mais tardias da gestação (quando a taxa de transmissão materna

fetal é mais alta), o tratamento específico da mãe com pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico deverá ser considerado (MONTROYA, REMINGTON, 2008).

Já os pacientes imunocompetentes habitualmente são tratados quando apresentam sintomatologia extensa e prolongadas ou com comprometimento ocular ou visceral significativo (AMATO NETO et al. 1995). Uma nova droga promissora no tratamento da toxoplasmose é o Atovaquone. Estudos experimentais sugerem que essa droga tem um efeito parcial contra cistos teciduais, assim como a azitromicina (PETERSEN, 2007).

## **1.6 JUSTIFICATIVA**

A busca de um medicamento eficaz, com ausência de efeitos colaterais e de baixo custo, torna-se essencial na prevenção ou diminuição de danos da toxoplasmose. As gestantes destacam-se como o grupo de maior risco nesta infecção devido à possibilidade de infecção congênita do feto com conseqüências que podem envolver além do aborto, uma série de outras seqüelas graves. As lesões oculares constituem uma das principais complicações de indivíduos infectados congenitamente ou após o nascimento. Todas estas características oneram psicologicamente, social e economicamente não só a vida dos indivíduos infectados, como sobrecarregam o sistema de saúde, com alto custo de atenção e acompanhamento, por tempos prolongados (ALMEIDA, et al., 2008).

A necessidade de um tratamento preventivo pré-gestacional reveste-se de grande importância. Os bioterápicos (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011), medicamentos produzidos a partir do próprio *T. gondii*, podem constituir-se em importante estratégia de prevenção, garantindo uma abordagem segura e de baixo custo para infecções. Têm sido bastante utilizados como alternativa para o enfrentamento de diversos problemas de saúde pública, principalmente em medicina veterinária (ALMEIDA, et al., 2008). No entanto, até quanto nós sabemos, pouco se conhece sobre os efeitos de diferentes diluições e esquemas para sua utilização. O encontro de um medicamento que controle a infecção experimental pelo *T. gondii*, além de constituir esperança para o tratamento da toxoplasmose, contribuirá para o entendimento do mecanismo de ação de medicações ultra ou altamente diluídas.

## **1.7 OBJETIVOS**

### **GERAL**

Avaliar o efeito de medicamento produzido com cistos de *Toxoplasma gondii* em camundongos infectados com este protozoário

### **ESPECÍFICOS**

Avaliar:

- 1) Parâmetros clínicos: Mensurações da variação do peso, temperatura, consumo de água e ração, quantidade de excretas, aspecto do pêlo, aspecto das fezes, cor dos olhos, circunferência abdominal e mortalidade;
- 2) Parâmetros parasitológicos: Contagem de cistos cerebrais e estimativa de bradizoítos por cistos;
- 3) Parâmetros de fundoscopia e tonometria ocular: Análise fundoscópica e aferição da pressão intra-ocular (PIO);
- 4) Parâmetros imunológicos: Dosagem de *TGF- $\beta$* .

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.L. et al., Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, v.97, n.2, p.65-69, 2008.
- AMATO NETO, V.; SERVOLO, M.E.A.; LEVI G.C.; SEIXAS, D.M.I. Toxoplasmose. 4.ed. Sarvier, São Paulo, p. 250, 1995.
- AMENDOEIRA, M.R.R.; COSTA. T.; SPALDING, S.M. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, Rio de Janeiro, v.1, p.15-29, 1999.
- BEAMAN, M.H.; LUFT, B.J.; REMINGTON, J.S. Prophylaxis for toxoplasmosis in AIDS. **American Journal of Medicine**, v.117, p.163-4, 1992.
- BOSCH-DRIESSEN, L.H.E.; BERENDSCHOT, T.T.; ONGKOSUWITO, J.V.; ROTHOVA, A. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. **Journal Ophthalmology**, v.109, p.869-78, 2002.
- DEROUIN, F. Anti-Toxoplasmosis drugs. *Current. Opinion in investigational Drugs* 2: p.1368-1374, 2001.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v.90, p.721-726, 2004.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmose of animals and man**. Boca Raton. CRC Press. p.1- 220, 1988.
- FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 3.ed., Brasília, 2011.
- FOULON, W.; VILLENA, I.; STRAY-PEDERSEN, B.; DECOSTER, A.; LAPPALAINEN, M.; PINON, J. M.; JENUM, P. A.; HEDMAN, K.; NAESSENS, A. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact on fetal transmission and children´s sequelae at age 1 year. **American journal of obstetrics and gynecology**, v.180, n. 2, p. 410-415, 1999.

FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis in human beings. **Journal of The American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v.196, n.2, p. 240-248, 1990.

FRENKEL, J. K. Toxoplasma in and around us. **BioScience**, v.23, p.343–352, 1973.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v.167, n.3919, p.893-896, 1970.

GUERINA, N.G.; HSU, H.W.; MEISSNER, H.C.; MAGUIRE, J.H.; LYNFIELD, R.; STECHENBERG, B.; ABROMS, I.; PASTERNAK, M.S.; HOFF, R.; EATON, R. B.; GRADY, G. F.; CHEESEMAN, S. H.; MCINTOSH, K.; MEDEARIS, D. N.; ROBB, R.; WEIBLEN, B. J. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. **New England Journal of Medicine**, v.330, p.1858-1863, 1994.

GARCIA, C.A.A.; OREFICE, F.; OLIVEIRA, L.C.; GOMES, A.B.; FRANCA, M.; GARCIA FILHO, C.A.A. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in Northeastern Brazil. **Ophthalmic Epidemiology**, v.11, p.301-317, 2004.

GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D.A. **Diagnostic Medical Parasitological**, M.A.S. Press, 3ed, 1997.

GOLDSMITH, R.S. Infectious Diseases: Protozoal & Helminthic in: **Current Medical Diagnosis & Treatment**. 37th Edition Stamford, Connecticut. USA: Appleton & Lange. 1998.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. **American Journal of Ophthalmology**., v.137, p.1-17, 2003.

MARGARINO, T.C. Affinités de L' Encephalitozoon chagasi, agent étiologique d'une méningo-encéphalo-myélite congénitale avec myocardite et myosite chez l'homme. **Rendus des Seances de la Société de Biologie**, t. XCVII, p.1787, 1927

McAULEY, J.; BOYER, K. M.; PATEL, D.; METS, M.; SWISHER, C.; ROIZEN, N.; WOLTERS, C.; STEIN, L.; STEIN, M.; SCHEY, W. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis – The Chicago collaborative treatment trial. **Clinical Infectious Diseases**, v.18, p.38-72, 1994.

MEIRELES, L. R. Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo. 2001. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo-SP

MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. **Journal of Parasitology**. v.58, n.5, p.928 – 937, 1972.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. v.363, n.12, p.1965-1975, 2004.

MONTOYA, J.G.; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**. v.47, p.554-66, 2008.

NAVARRO, I. T. Toxoplasmose: Surto em Santa Isabel do Ivaí - Paraná. O pulo do Gato. v. 8, p.10-13, 2002.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 10. Ed. Atheneu, São Paulo, p. 428, 2000.

NICOLLE, C.; MANCEUAX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Rendus des Seances de la Société de Biologie**, v.148, p.369 – 372, 1908.

ORÉFICE, F.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. Toxoplasmose. In: **Uveíte Clínica e Cirúrgica: texto e atlas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, cap. 29, p.451-59, 2005.

PELLOUX, H.; FRICKER-HIDALGO, H.; PONS, J.C.; BOST-BRUT, C.; BRENIER-PINCHART, M.P.; JOUK, P.S.; AMBROISE-THOMAS, P. Congenital toxoplasmosis: prevention in the pregnant woman and management of the neonate. **Archives Pediatrics**, v. 9, n. 2, p. 206- 212, 2002.

PETERSEN, E.; POLLAK, A.; REITER-OWONA, I. Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.115-144, 2001.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal et Neonatal Medicine**. v.12, p.214-223, 2007.

PINKERTON, H.; WEINMAN, D. Toxoplasmosis infection in man. **Archives of Pathology**, v. 30, p. 374 – 392, 1940.

PIZZI, H.L. Toxoplasmosis. Argetina: Rhône Poulenc Rorer Argentina, p.91, 1997.

RAVEL, R. **Aplicações Clínicas de dados Laboratoriais**. Rio de Janeiro, 6ªed, 1998.

REMINGTON, J.S.; McLEOD, R.; DESMONTS G. TOXOPLASMOSIS. In: REMINGTON JS, KLEIN J.O., editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders. p.205 – 346, 2001.

REMINGTON, J.S.; McLEOD, R. Toxoplasmosis. **In Infectious Diseases** (GORBACH, S.L.; BARTLETT, J.G.; BLACKLOW, N.R.),.Philadelphia: WB Saunders, p.1328-1343, 1992.

REMINGTON, D.G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S; KLEIN, J. **Infectious diseases of fetus and newborn infant** Philadelphia: W.B. Saunders, p.90-195, 1990.

SABIN, A.B.; FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical Indications of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**. v.108, p.660 – 663, 1948.

SAVVA, D.; MORRIS, J.C; JOHNSON, J.D.; HOLLIMAN, R.E. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Medical Microbiology** 1990; v.32, p.25-31, 1990.

SILVA, R. C. Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pela técnica de aglutinação direta modificada. 2006.137 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-SP.

SOBRAL, C.A.Q.; AMENDOEIRA, M.R.R.; TEVA, A.; PATEL, B.N.; KLEIN, C.H. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous brazilian populations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.72, n.1, p.37-41, 2005.

SOUZA, V. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**; v.20, n. 1, p.131-143, 2010.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; RIBEIRO, L.C.; SILVEIRA, C.; GARCIA, A.P.; CAMILLO-COURA, L. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 36, n. 4, p. 483 - 491, 2003.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; KLEIN, C.H.; RIBEIRO, L.C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in south of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, p.173-177, 2005.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Infecções por protozoários e por outras causas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 1º edição. São Paulo: Manole, Cap. 68, v.1, p.1495, 1997.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p.1217-1258, 2000.

THIÉBAUT R. The SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) study group. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. **The Lancet**, v.369, p.115-22, 2007.

## CAPÍTULO II

Artigo: “EFEITO DE MEDICAMENTO PRODUZIDO COM CISTOS DE  
*Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM ESTE  
PROTOZOÁRIO”

EFEITO DE MEDICAMENTO PRODUZIDO COM CISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM ESTE PROTOZOÁRIO

**BIOTERÁPICOS DE *T. gondii* EM CAMUNDONGOS**

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Autor para correspondência: Caroline Felício Braga

cfeliciobraga@gmail.com

UEM - Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Bloco I90, Setor Parasitologia Básica.

Av. Colombo, 5.790

Jd. Universitário

Maringá - Paraná - Brasil

CEP 87020-900

Tel.: 55 (44) 3011- 4918

**Resumo:** Comparou-se em ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio, o efeito de diferentes diluições de bioterápicos de *T. gondii*. Cinquenta e seis camundongos machos, *Swiss*, 60 dias, foram distribuídos em grupos segundo o tratamento: BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30, BIOT-TG60, BIOT-TG100, BIOT-TG200, GCInf - grupo controle infectado tratado com álcool de cereais-7% e GCN - grupo controle não infectado e não tratado. Os bioterápicos foram produzidos segundo Farmacopéia Homeopática Brasileira, com macerado de cérebro de camundongos (20 cistos *T. gondii*/100 $\mu$ L). Os animais receberam tratamento por três dias consecutivos antes da infecção. Para os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 E BIOT-TG60 e GCInf administrou-se 0.1mL/4X/dia, no primeiro dia e 2X/dia nos demais dias de tratamento. Para BIOT-TG100 e, BIOT-TG200 foi utilizado 0.1mL/dose única/dia. Aos 60 dias os animais foram infectados (20 cistos cepa ME49-*T. gondii*), via oral. Foram avaliados parâmetros clínicos antes, durante a administração do bioterápico e após a infecção. Foram realizadas fundoscopia e tonometria ocular aos 55 dias pós-infecção. Sessenta dias após a infecção foram contados cistos cerebrais e estimado o número de bradizoítos/cisto. Foi dosado *TGF- $\beta$*  sérico (ELISA). Comparação estatística com o teste de Kruskal-wallis, 5% de significância. O número de bradizoítos por cistos foi menor ( $p < 0.05$ ) para os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG100 e BIOT-TG200 em relação ao GCInf. O número de cistos apresentou tendência à diminuição em BIOT-TG17 e BIOT-TG200 em relação ao GCInf. Durante o tratamento foram observadas diminuição do consumo de água ( $p=0,0392$ ) e ração ( $p=0,0225$ ) nos grupos BIOT-TG30 e BIOT-TG60 e diminuição na eliminação de excretas ( $p=0,0021$ ) nos grupos BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60, em relação ao GCInf. Houve mortalidade de um ou dois animais nos grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60. Após a infecção foram observadas redução de peso ( $p < 0,01$ ) nos grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60 e redução na quantidade de excretas ( $p=0.0284$ ) nos grupos BIOT-TG7 e BIOT-TG30. Animais tratados com BIOT-TG7 e BIOT-TG30 apresentaram ascite acentuada e houve uma morte no grupo BIOT-TG200. Na fundoscopia ocular, 80% dos animais do grupo BIOT-TG100 não apresentaram alterações e 20% apresentaram hemorragia sub-retiniana discreta em volta do nervo óptico. Na tonometria ocular assim como nos níveis de *TGF- $\beta$*  não houve diferença entre os grupos. A comparação estatística e a observação diária revelam claramente diferença de efeito entre os bioterápicos. Os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60 apresentam alterações clínicas mais intensas em relação ao GCInf. Os grupos tratados com diluições maiores BIOT-TG100 e BIOT-TG200 proporcionaram benefícios mais efetivos, destacando o BIOT-TG200 como o medicamento de escolha por apresentar resultados mais satisfatórios, merecendo aprofundamento de estudos.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, Bioterápico, *TGF- $\beta$* .

## Introdução

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório com ampla distribuição geográfica e alta prevalência sorológica mundial (Oréface 2005).

Os felídeos silvestres ou domésticos são os hospedeiros definitivos e neles o parasito realiza ciclo sexuado com multiplicação enteroepitelial que culmina com produção e

eliminação de oocistos nas fezes, contaminando o meio ambiente. Estes oocistos tornam-se infectantes após esporulação em até cinco dias, em condições favoráveis (Dubey 1977). Os hospedeiros intermediários são animais homeotérmicos incluindo o homem.

A infecção dos hospedeiros definitivos e intermediários por *T. gondii* pode dar-se por via oral com ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos; pela ingestão de cistos em tecidos de hospedeiros intermediários que serviram como alimento; e por via uterina pela transmissão transplacentária de taquizoítos. Também pode ser transmitido via produtos sanguíneos, transplantes de órgãos, ou pela ingestão de taquizoítos em leite caprino não pasteurizado (Tenter 1999).

Além da sua importância em seres humanos, a infecção congênita pelo *T. gondii* pode causar aborto em várias espécies, sejam domésticas como cães e gatos e de animais de produção como ovinos, suínos e caprinos. Além do aspecto econômico e de saúde pública humano/animal, o estudo da toxoplasmose em modelos experimentais tem a importância no conhecimento da imunopatologia da infecção congênita, no diagnóstico, nos ensaios de vacinas e estudos terapêuticos (Velge-Roussel et al. 2000).

A toxoplasmose pode produzir encefalite, abortamentos, pneumonia, enterite, miosite e ocasionalmente, coriorretinite, frequentemente associada à uveíte tanto em seres humanos como em espécies de animais (Helley 1970). Slosárková et al. 1999, revelaram em caprinos alto índice de abortos, nascimento de crias fracas e alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*. Estes autores observaram aumento de 9,4% em 1994 para 60,5% em 1996 na prevalência de animais positivos, acompanhado por desordens reprodutivas. Dados de Williams et al. 2005, revelam altos níveis de transmissão congênita pelo *T. gondii* em ovinos, com 47-48% das gestações afetadas.

Em suínos têm se verificado casos de pneumonia, encefalite e aborto causando prejuízos econômicos para as regiões que desenvolvem a suinocultura (Tenter et al. 2000).

Além dos aspectos relacionados à sanidade animal, deve-se levar em consideração o aspecto zoonótico da toxoplasmose.

A busca de um medicamento eficaz, com ausência de efeitos colaterais e de baixo custo torna-se essencial na prevenção ou diminuição de danos da toxoplasmose com consequente redução de prejuízos econômicos e comerciais. Se somado a estas características o medicamento estiver incluído na relação das substâncias liberadas para produção orgânica na agropecuária, agregar-se-ia valor aos rebanhos tratados com estas substâncias. A homeopatia é considerada uma ciência que pode ser aplicada a todos os seres vivos, seja humano, animais domésticos ou silvestres, seja vegetais ou microrganismos (Rossi et al. 2004). No Brasil, os preparados homeopáticos foram considerados insumos agrícolas orgânico-pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, em maio de 1999 (Brasil 1999).

Uma das modalidades da homeopatia é a isopatia ou isoterapia. Nela os medicamentos são denominados bioterápicos ou nosódios, que são definidos como formulações preparadas a partir de produtos biológicos, quimicamente indefinidos, tais como secreções, excreções, tecidos e órgãos patológicos ou não, bem como microrganismos causadores de infecções (Farmacopéia Homeopática Brasileira 2011). Sabe-se muito pouco sobre os efeitos destes medicamentos sobre a infecção por *T. gondii*. Tanto quanto nos foi possível pesquisar, um único trabalho está disponível (Leon et al. 1997). Neste único artigo, como não houve diferenças nas lesões entre os grupos, o critério utilizado para avaliação e comparação foi a mortalidade. O bioterápico de *Toxoplasma* D30 apresentou resultados favoráveis em relação ao grupo-controle para os grupos tratados antes da infecção e tratados em fase aguda. Quando utilizado em animais infectados com cepa diferente da utilizada no preparo do medicamento, o bioterápico *Toxoplasma* D30 não apresentou o benefício esperado. Este resultado levou os autores a concluir que para efetiva ação, deve-se sempre utilizar para preparo do bioterápico a mesma cepa utilizada para a infecção. Fica claro que a utilização de medicação altamente

diluída pode oferecer benefícios no enfrentamento da toxoplasmose, mas outros estudos devem ser realizados.

Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de diferentes diluições de bioterápico de *T. gondii*, considerando parâmetros clínicos, parasitológicos, oftalmoscópicos, e imunológicos em camundongos inoculados com o protozoário.

## **Material e Métodos**

### **Delineamento experimental**

O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio realizado em duplicata.

### **Animais**

Em cada repetição foram utilizados 56 camundongos *Swiss*, machos, com 60 dias de idade, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais chegaram ao biotério setorial de experimentação da Parasitologia com 21 dias e passaram por um período de adaptação ao ambiente de 31 dias até o início do experimento. Foram acondicionados em caixas de polipropileno (dimensão 414 x 344 x 168mm), tampadas com grade zincada com depressão central para deposição da ração e para garrafa de água. As caixas permaneceram em biotério climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas. Receberam água e ração (Nuvilab Cr-1<sup>®</sup> da Nuvital<sup>®</sup>) *ad libitum*.

### **Infecção**

A infecção foi realizada por via oral, com 20 cistos teciduais da cepa ME49 de *T. gondii*. Estes foram obtidos de macerado de cérebros de camundongos infectados, segundo protocolo de Dubey & Beattie (1988). A cepa ME49 é classificada pela análise do gene SAG-2 como pertencentes ao genótipo II (Silva et al. 2005).

### **Detecção de anticorpos anti-*T. gondii***

Para assegurar a utilização de animais sem infecção natural pelo *T. gondii* antes do experimento e confirmar a infecção com a cepa ME49 após infecção, foram pesquisados anticorpos séricos IgG anti-*T. gondii*, pelo método de aglutinação direta. O sangue dos animais foi coletado por punção do plexo venoso do seio retro orbital (Hedrich & Bullock 2004) aos 34 dias de idade e 60 dias após a infecção por punção intra cardíaca. Foram considerados positivos, resultados com título acima de 25 de acordo com Desmonts & Remington 1980. Somente animais com resultados negativos antes da infecção e positivos 60 dias após a inoculação foram incluídos neste estudo.

### **Bioterápico de *T. gondii* (BIOT-TG)**

Os bioterápicos foram produzidos com macerado de cérebro de camundongos infectados (20 cistos *T. gondii*/100µL-média de 242 bradizoítos/cisto), preparado segundo Farmacopéia Homeopática Brasileira 2011, em capela de fluxo laminar. Foi realizada análise microbiológica na matriz homeopática e na água destilada usada no preparo dos medicamentos, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá, com resultados negativos para unidades formadoras de colônias por mililitro, conforme (RDC n ° 67).

### **Grupos experimentais e tratamento**

Foram constituídos 8 grupos com 7 animais cada, alocados aleatoriamente e de forma que as médias de peso corporal dos grupos não diferissem estatisticamente. Os grupos foram distribuídos de acordo com o tratamento. Um grupo controle não tratado e não infectado foi utilizado como controle não tratado, não infectado na comparação de citocinas e alterações oculares.

Grupos:

- **BIOT-TG7**: tratado com o bioterápico de *T. gondii* na dinamização **7DH** (diluição de 1:10<sup>7</sup>);

- **BIOT-TG17** tratado com o bioterápico de *T. gondii* **17DH** (diluição 1:10<sup>17</sup>);
- **BIOT-TG30** tratado com o bioterápico de *T. gondii* **30DH** (diluição 1:10<sup>30</sup>);
- **BIOT-TG60** tratado com o bioterápico de *T. gondii* **60DH** (diluição 1:10<sup>60</sup>);
- **BIOT-TG100** tratado com o bioterápico de *T. gondii* **100DH** (diluição 1:10<sup>100</sup>);
- **BIOT-TG200** tratado com o bioterápico de *T. gondii* **200DH** (diluição 1:10<sup>200</sup>);
- **GCInf** - grupo controle infectado tratado com álcool de cereais-7%;
- **GCN** - grupo controle não infectado e não tratado.

Os animais receberam tratamento por três dias consecutivos antes da infecção. Para os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30, BIOT-TG60 e GCInf o esquema foi 0,1mL/4X/dia, no primeiro dia e 2X/dia nos demais dias de tratamento. Para BIOT-TG100, BIOT-TG200 foi utilizado 0,1mL/dose única/dia durante todo o tratamento por se tratar de alta dinamização. Segundo Julian 1983 dinamizações baixas teriam efeitos sobre "estruturas", consistindo em uma "terapia de substituição". Dinamizações médias teriam efeito de regulação sobre as cadeias funcionais e bioquímicas. Dinamizações altas teriam efeito de "informação" sobre o sistema em questão.

### **Parâmetros analisados**

Todos os animais foram avaliados clinicamente durante quatro dias consecutivos imediatamente antes do início do tratamento (53-56 dias de idade), durante a administração do bioterápico (57-59 dias de idade) e após 18-21 dias de infecção. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

**Peso** – expresso em grama, foi avaliado individualmente em balança BEL®. **Temperatura** - expressa em grau centígrado, foi medida individualmente na região anterior da coxa traseira esquerda (menor quantidade de pêlos) utilizando termômetro Icel, modelo TD-920.0387.

**Consumo de água e ração** - expressos em mililitro e grama, respectivamente. Foram avaliados coletivamente, considerando o valor inicial oferecido ao grupo subtraído do valor

medido após um dia de consumo. O valor obtido foi dividido pelo número de animais para estimar os valores individuais. **Quantidade de excretas** - expresso em grama, foi obtido pela pesagem da forração das gaiolas antes do uso subtraída do valor da pesagem obtido após um dia de uso. Foi considerado fezes e urina conjuntamente. Toda a forração limpa a ser utilizada era seca em estufa, pesada e embalada em sacos plásticos selados. **Cor dos olhos** - foram avaliados visualmente e classificados em VB: vermelho brilhante (+), VR: vermelho rosado (++) e VE: vermelho escuro (+++). **Aspecto do pêlo** - foram avaliados visualmente e classificados em normal (+), pouco eriçado (++) , eriçado (+++), muito eriçado (++++) e muitíssimo eriçado (+++++). **Aspecto das fezes** - foram avaliadas visualmente e classificadas em normal (+), não consistentes (++) e diarréicas (+++). **Circunferência abdominal** - expressa em centímetros, avaliado semanalmente após o 11º dia após a infecção, foi mesurado a região abdominal de cada animal com o auxílio de fio de barbante. **Mortalidade** - expressa em porcentagem acumulada no final do experimento, foi analisada e anotada diariamente.

**Exame de fundo de olho (Fundoscopia)** - Realizada aos 55 dias após a infecção. Para fundoscopia os animais foram contidos manualmente por fixação através da pele da região cervical dorsal, e instilada uma gota de tropicamida 1% (GENOM - Divisão de Medicamentos Oftálmicos da UNIÃO QUÍMICA NACIONAL S/A. Embu-Guaçu - São Paulo, Brasil.) em cada olho para midríase. Após 20 minutos os animais foram contidos novamente para exame de oftalmoscopia direta com aparelho PANOPTIC (Welch Allyn. Belo Horizonte - Minas Gerais, Brasil). A fundoscopia iniciou-se pelo olho direito. Foram observadas a superfície e os componentes da retina em dioptria +5 em busca de evidências de alterações, tais como processos inflamatórios, edemas, neovascularizações, hiperreflexia, papiledema ou sinais de degeneração. Sinais que poderiam estar ligadas à infecção por *T. gondii*, e serem caracterizados como toxoplasmose ocular. Todos os exames foram realizados

por um único examinador, médico veterinário, com experiência e treinamento em oftalmologia veterinária e experimental.

***Tonometria*** – A aferição da pressão intra-ocular (PIO) deu-se através de contenção manual dos animais e dessensibilização da superfície ocular através da instilação de uma gota de colírio anestésico a base de hidrocloreto de proparacaína 0,5% (ALCON - Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, SP). O equipamento utilizado para mensuração foi o TONO-PEN XL, tonômetro de aplanção digital. Foram tomadas quatro medidas de cada olho sequencialmente e observou a média entre elas apresentada pelo próprio equipamento. O procedimento foi repetido três vezes para cada olho, iniciando-se pelo olho direito para padronização da técnica.

***Contagem de cistos cerebrais e de bradizoítos/cisto*** - Aos 60 dias de pós-infecção, os camundongos foram submetidos a eutanásia com deslocamento crânio-cervical após aprofundamento anestésico com vapor de halotano (Vivas et al. 2007). O cérebro foi retirado da caixa craniana e macerado com grau e pistilo que foi ressuscitado em 1,0 mL de solução salina 0,9%. Deste volume foram examinados 25  $\mu$ L entre lâmina e lamínula em microscópio óptico para contagem dos cistos teciduais, a fresco. Foi determinado o número médio de cistos  $\pm$  desvio padrão por mililitro de macerado para cada animal. A partir deste material foram confeccionados esfregaços, corados com Giemsa para estimativa do número de bradizoítos por cisto. Foram contados os bradizoítos de todos os cistos presentes na lâmina para cada animal. O número de cistos e bradizoítos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

***Dosagem de Fator de crescimento e transformação-beta (TGF- $\beta$ )*** – O TGF- $\beta$  é uma citocina chave regulatória ligada à regulação da imunopatologia (Gaddi & Yap 2007). Para avaliação da concentração sérica da citocina utilizou-se a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) de captura, com pares de anticorpos da R&D system Inc<sup>®</sup>

(Minneapolis-USA). A técnica foi desenvolvida de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O soro foi obtido por punção cardíaca e permaneceu estocado a  $-25^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de  $100\ \mu\text{L}$  por 07 meses, do sacrifício dos animais até a realização da técnica. A concentração da citocina foi determinada com referência a curva padrão obtida com citocina murina recombinante. Os resultados foram expressos em  $\text{ng/mL}$ .

### **Análise estatística**

Os parâmetros avaliados foram comparados entre os grupos utilizando o programa *BioEstat 5.0* (Manaus-Brasil) com o teste Kruskal-Wallis com 5% de significância. Foi realizada estatística de efeito (site <http://www.uccs.edu/~lbecker/>.) utilizando-se o teste *Effect size calculators* verificando-se a intensidade do efeito de cada dinamização em relação ao grupo controle infectado. O efeito foi considerado pequeno quando foi observado resultado menor ou igual a 0,2. Médio quando foi observado resultado menor ou igual a 0,5 e grande quando foi observado resultado menor ou igual a 0,8.

### **Ética**

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, Parecer nº. 109/2011.

### **Resultados**

Quanto à avaliação clínica, antes da administração do bioterápico não foi observada diferença entre os grupos, para variação de peso, temperatura, consumo de água, consumo de ração, excretas e mortalidade, avaliados enquanto os animais estavam sadios (53-56 dias).

Durante a administração do bioterápico (Tabela 1) foi observada diminuição do consumo de água ( $p=0,0392$ ) e diminuição na quantidade de ração ( $p=0,0225$ ) nos grupos BIOT-TG30 e BIOT-TG60, e redução na eliminação de excretas ( $p=0,0021$ ) para animais dos grupos BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60, em relação ao GCInf. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças entre os grupos. Foi registrada a morte de um ou

dois animais nos grupos BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30, BIOT-TG60, com estômago e intestinos distendidos, repletos de ar e com aspecto hemorrágico. Após a infecção (Tabela 2) foi observado redução na quantidade de excretas ( $p=0.0284$ ) nos grupos BIOT-TG7 e BIOT-TG30. Não foi observada diferença na evolução da temperatura. No entanto, observou-se hipotermia no 18°. dia de infecção ( $p=0,005$ ) em todos os grupos tratados com bioterápicos. Não foram observadas diferenças para a variação do peso, consumo de água, ração, circunferência abdominal, cor dos olhos, aspecto do pêlo e das fezes para os diferentes grupos. Camundongos tratados com BIOT-TG7 e BIOT-TG30 apresentaram ascite acentuada e houve uma morte no grupo tratado com BIOT-TG200.

**Tabela 1. Parâmetros clínicos avaliados em camundongos *Swiss* 57-59 dias sadios, durante a administração do bioterápico de *T. gondii* para os diferentes grupos experimentais. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão.**

Parâmetros	BIOT-TG7	BIOT-TG17	BIOT-TG30	BIOT-TG60	BIOT-TG100	BIOT-TG200	GCInf
Variação diária de Peso (g)	-1,26 $\pm$ 0,58	-0,58 $\pm$ 0,31	0,49 $\pm$ 1,31	-1,92 $\pm$ 2,98	-1,04 $\pm$ 0,37	-0,98 $\pm$ 1,33	-0,98 $\pm$ 1,19
Temperatura(°C)	31,57 $\pm$ 0,73	31,56 $\pm$ 1,58	32,23 $\pm$ 1,63	31,35 $\pm$ 1,07	31,92 $\pm$ 0,89	31,82 $\pm$ 1,06	31,72 $\pm$ 0,77
Consumo de água (mL)	8,80 $\pm$ 2,14	8,93 $\pm$ 4,99	4,48 $\pm$ 1,28	4,23 $\pm$ 1,56	8,98 $\pm$ 1,41	8,35 $\pm$ 2,21	9,75 $\pm$ 1,96
Consumo de ração (g)	6,08 $\pm$ 0,68	5,65 $\pm$ 1,68	4,68 $\pm$ 1,36	4,30 $\pm$ 1,88	7,68 $\pm$ 1,19	6,85 $\pm$ 1,27	6,78 $\pm$ 0,98
Excretas (g)	3,18 $\pm$ 0,40	2,58 $\pm$ 0,83	2,20 $\pm$ 0,65	2,28 $\pm$ 1,14	5,90 $\pm$ 0,39	4,45 $\pm$ 0,53	4,70 $\pm$ 1,36
Mortalidade N/n (%)	1/7(14,3)	2/7(28,6)	1/7(14,3)	1/7(14,3)	0/7(0)	0/7(0)	0/7(0)

N= número de mortes. n= número total de animais no grupo

**Tabela 2. Parâmetros clínicos avaliados em camundongos *Swiss* tratados, com 18-21 dias de infecção com cistos da cepa ME49 de *T.gondii*. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão.**

Parâmetros	BIOT-TG7	BIOT-TG17	BIOT-TG30	BIOT-TG60	BIOT-TG100	BIOT-TG200	GCInf
Variação diária de Peso (g)	-0,02 $\pm$ 0,31	-0,34 $\pm$ 0,28	-0,45 $\pm$ 0,46	-0,27 $\pm$ 0,54	-0,11 $\pm$ 0,43	0,17 $\pm$ 0,77	-0,70 $\pm$ 1,26
Temperatura(°C)	31,13 $\pm$ 0,96	30,80 $\pm$ 0,97	30,80 $\pm$ 1,22	30,67 $\pm$ 1,00	31,36 $\pm$ 0,72	31,14 $\pm$ 0,81	31,89 $\pm$ 0,16
Consumo de água (mL)	6,88 $\pm$ 1,25	10,31 $\pm$ 5,08	12,44 $\pm$ 5,21	11,33 $\pm$ 0,34	11,18 $\pm$ 3,23	11,50 $\pm$ 0,45	10,71 $\pm$ 0,97
Consumo de ração (g)	6,99 $\pm$ 1,30	7,77 $\pm$ 1,98	7,78 $\pm$ 2,70	7,05 $\pm$ 1,69	8,36 $\pm$ 1,67	8,43 $\pm$ 1,24	7,45 $\pm$ 1,09
Excretas (g)	2,14 $\pm$ 1,07	4,28 $\pm$ 1,94	2,44 $\pm$ 1,09	4,86 $\pm$ 1,47	4,05 $\pm$ 1,52	4,16 $\pm$ 0,70	4,97 $\pm$ 1,78
Circunferência abdominal (cm)	10,6 $\pm$ 0,34	10,9 $\pm$ 0,31	10,6 $\pm$ 0,38	10,6 $\pm$ 0,25	10,9 $\pm$ 0,52	11,1 $\pm$ 0,34	11,0 $\pm$ 0,35
Mortalidade N/n (%)	0/6(0)	0/5(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/7(0)	1/7(14,3)	0/7(0)

N= número de mortes. n= número total de animais no grupo

Na tonometria, não houve diferença significativa entre o grupo controle e os demais grupos. Sendo que a pressão (expressos em média±desvio-padrão) observada para os diferentes grupos foi: GCN (10,3±4,0mmHg), GCInf (8,9±3,8mmHg), BIOT-TG7 (5,0±1,0mmHg), BIOT-TG17 (7,1± 0,9mmHg), BIOT-TG30 (9,8± 4,5mmHg), BIOT-TG60 (5,0± 0,9mmHg), BIOT-TG100 (8,6± 5,2mmHg) e BIOT-TG200 (8,0± 2,6 mmHg).

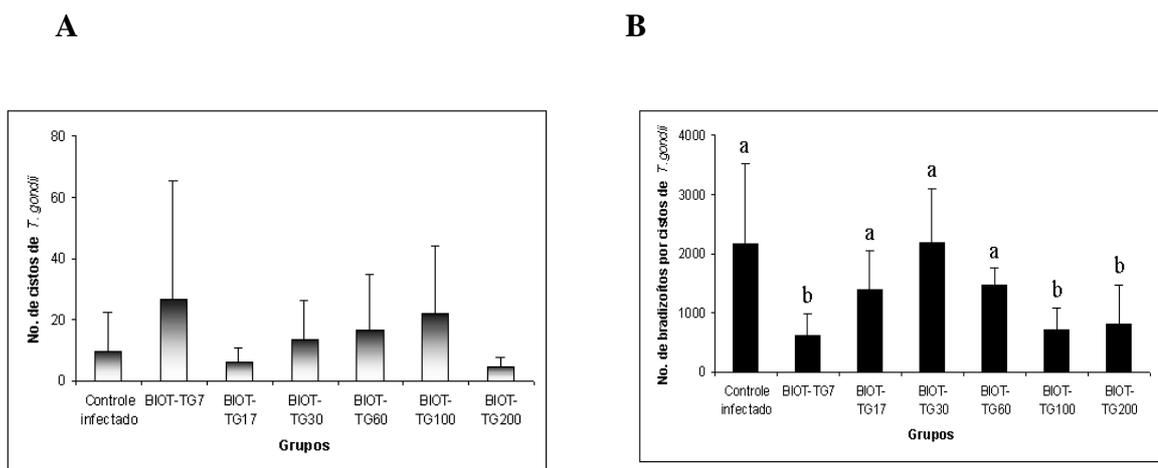
Com relação à fundoscopia ocular (Tabela 3), verificou-se que 80% dos animais do grupo BIOT-TG100 não apresentaram alterações e 20% apresentaram hemorragia sub-retiniana discreta em volta do nervo óptico. No grupo BIOT-TG200, 50% dos animais apresentou hemorragia discreta e 50% sem alterações. O grupo BIOT-TG7 apresentou 16,66% dos animais com uveíte severa. O grupo BIOT-TG30 apresentou 33,3% de uveíte severa e 33,3% de hemorragia intensa. Enquanto o grupo GCInf mostrou 57,14% sem alterações e 42,86% hemorragia discreta.

**Tabela 3. Alterações fundoscópicas observadas nos diferentes grupos após 55 dias de infecção com cistos de *T.gondii*, cepa ME49.**

Parâmetros	BIOT-TG7	BIOT-TG17	BIOT-TG30	BIOT-TG60	BIOT-TG100	BIOT-TG200	GCInf	GCN
Hemorragia* Discreta (%)	0	25	0	40	20	50	42,86	0
Hemorragia* Intensa (%)	0	0	33,3	0	0	0	0	0
Uveíte Severa (%)	16,66	0	33,3	0	0	0	0	0
Sem Alterações (%)	83,33	75	50	60	80	50	57,14	100

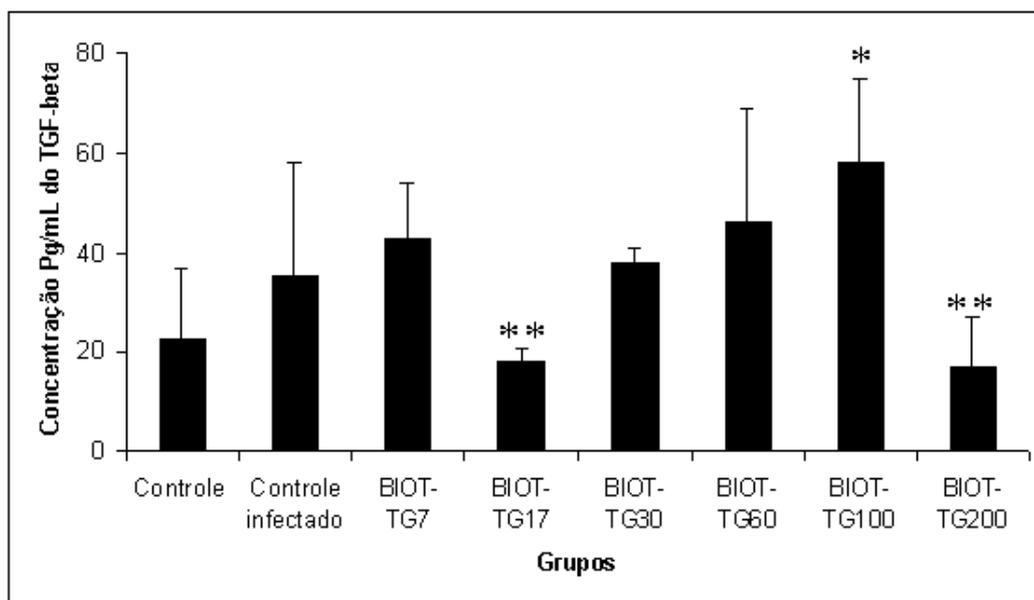
\*Sub-retiniana em volta do nervo óptico

Não foi encontrada diferença estatística no número de cistos teciduais de *T. gondii* no cérebro entre os grupos (Figura 1). No entanto foi observada tendência à diminuição de cistos nos grupos BIOT-TG17 e BIOT-TG200 em relação ao grupo controle infectado com efeito 0,38 (pequeno) e 0,55 (médio), respectivamente. A estimativa de bradizoítos por cistos de *T. gondii* apresentou diferença entre os grupos, com diminuição ( $p < 0.05$ ) na quantidade de bradizoítos nos grupos BIOT-TG7, BIOT-TG100 e BIOT-TG200 em relação ao GCInf que foi confirmada pela estatística de efeito onde foi verificado efeito grande de 1,54, 1,43 e 1,24 respectivamente para este três grupos. O grupo BIOT-TG30 apresentou aumento significativo do número de bradizoítos por cisto ( $p < 0.05$ ) em relação aos grupos BIOT-TG7 e BIOT-TG100.



**Figura 1.** Número de cistos de *T.gondii* quantificados em 25 µL de macerado de cérebro de camundongos (A) e estimativa do número de bradizoítos por cistos de *T. gondii* quantificados em 25 µL de macerado de cérebro de camundongos para os diferentes grupos (Material: esfregaços corados com GIEMSA). Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Os níveis de *TGF-β* foram diferentes entre os grupos. Animais dos grupos BIOT-TG17 e BIOT-TG200 apresentaram diminuição ( $p < 0.01$ ) da concentração dos níveis de *TGF-β* em relação ao grupo BIOT-TG100. (Figura 2).



**Figura 2.** Concentração sérica do *TGF-β* nos diferentes grupos experimentais. Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. (\*,\*\*) ( $p < 0.01$ ).

## Discussão

Este é o primeiro trabalho que mostra uma diminuição no número estimado de bradizoítos/cistos em camundongos infectados por *T. gondii* e tratados com medicamento ultradiluído. Os grupos BIOT-TG7, BIOT-TG100 e BIOT-TG200 apresentaram diminuição na estimativa de bradizoítos/cistos em relação ao GCInf. Este dado pode estar relacionado à tentativa de estabilização/proteção do organismo infectado já que também foi observada melhora clínica dos animais para alguns destes grupos (BIOT-TG100 e BIOT-TG200). Segundo Ruiz-Vega & Estevez-Salgado 2008 e Bonamin & Endler 2010 os estímulos por medicamentos ultradiluídos podem conduzir o sistema vivo a restaurar o estado de equilíbrio levando a um “estado estável”, embora nem sempre isto possa proporcionar redução da carga parasitária dos animais infectados por parasitos (Aleixo et al. 2012). Bonamin & Endler 2010 explicam que “estado estável” envolve a recuperação do sistema biológico para controlar ou normalizar parâmetros alterados. Sugerimos ser um novo estado de equilíbrio criado dentro da condição que o organismo experimenta no momento. Nesta ótica pode-se pensar que nem sempre se verifica a eliminação do parasito, mas o organismo pode criar condições de convivência para minorar as consequências de sua presença (Aleixo et al. 2012-b), processo

este denominado de imunidade concomitante (Neves 2006). Normalmente neste estado há inclusive certa dificuldade do paciente se reinfectar. É interessante perceber que o bioterápico administrado ao grupo BIOT-TG200 promoveu ao mesmo tempo diminuição significativa da estimativa do número de bradizoítos por cistos e está entre os bioterápicos que apresentaram tendência a induzir menor quantidade de cistos cerebrais em relação ao grupo controle de infecção. Em experimentos com maior número de animais esta tendência poderá traduzir-se em diferença estatística (Ferreira et al. 2011). De qualquer forma, a estimativa no número de bradizoítos por cistos foi menor nos grupos tratados com BIOT-TG7, BIOT-TG100 e BIOT-TG200 que no grupo controle de infecção. Experimentos futuros poderão avaliar além do número de bradizoítos por cistos, a viabilidade destes bradizoítos para infectar novos hospedeiros assim como variar o esquema de tratamento (Aleixo et al. 2012) para melhor aproveitar este benefício observado. A análise parasitológica e sorológica comprova que a infecção ocorreu e atingiu a fase crônica. O aprofundamento destes estudos poderá flagrar uma condição que permita a formação de cistos, mas com bradizoítos pouco viáveis ou até mesmo inviáveis. Este achado seria um passo interessante na utilização de bioterápicos como amenizadores dos danos da infecção por *T. gondii* uma vez que os prejuízos econômicos em animais causados por este parasito são significativos (Tenter et al 2000). A formação de cistos com bradizoítos menos viáveis ou mesmo inviáveis diminuiria, em longo prazo, a prevalência de animais infectados em determinada área.

Todos os grupos iniciaram o experimento nas mesmas condições clínicas, situação que juntamente com o fato de ser o ensaio cego randomizado por sorteio atesta para o cuidado dispensado à metodologia utilizada neste experimento. Este é um requisito imprescindível para a aceitação de resultados com substâncias altamente/ultradiluídas (Stock-Schröer et al. 2009). Os efeitos observados durante a administração dos bioterápicos são indicativos de estímulo da resposta biológica do hospedeiro que nas dinâmizações baixas desencadearam

reações exacerbadas no organismo, expressas por efeitos adversos, provavelmente por excesso de dose medicamentosa resultando inclusive em mortalidade. Além disso, nestes grupos os bioterápicos foram administrados durante três dias com 0,1mL/4X/dia, no primeiro dia e 2X/dia nos demais dias de tratamento. Kossak-Romanach 2003 descreve que medicamentos altamente diluídos em baixas dinamizações e em esquemas prolongados podem sensibilizar o organismo e gerar efeitos semelhantes à doença que se quer tratar. Em tratamentos com medicamentos ultradiluídos, a ação primária, pode desencadear piora inicial dos sintomas da enfermidade e esta piora é descrita como uma agravação, que é resultado da administração inadequada de doses ou de dinamização dos medicamentos (Teixeira 2008). Segundo este autor o efeito primário deve estar em consonância com o desequilíbrio orgânico e despertar uma reação homeostática. Nossos dados estão de acordo com esta afirmação. Embora a melhor condição clínica observada nos animais dos grupos BIOT-TG100 e BIOT-TG200 possa ser argumentada como consequência do tratamento ter ocorrido como dose única, produzindo conseqüentemente menor estresse, os efeitos de agravação observados nas dinamizações menores estão diretamente relacionados com os sintomas da infecção pelo *T. gondii* (ascite e emagrecimento). Somado a este fato, dados do laboratório (não apresentados) mostram que animais do grupo controle tratado com água não apresentaram diferenças significativas com o manejo diário e quantidade de doses.

Todos os grupos apresentaram emagrecimento na avaliação clínica durante o tratamento, com exceção dos animais pertencentes ao grupo BIOT-TG30, nos quais, de alguma forma, o bioterápico manteve as condições eutróficas. Os grupos tratados com dinamizações maiores (BIOT-TG100 e BIOT-TG200) embora tenham também perdido peso durante o tratamento, apresentaram melhor desempenho clínico. Diante disto, poderia ser argumentado que os animais foram tratados por gavagem e esta forma de administração do

medicamento por si só, causa estresse no animal podendo ser um dos fatores envolvidos na perda de peso observada (Frajblat et al 2008).

Após a infecção foi observado que os animais dos grupos tratados com BIOT-TG7, BIOT-TG17, BIOT-TG30 e BIOT-TG60 apresentaram sintomas clínicos da toxoplasmose constatados visual e estatisticamente em relação ao GCInf, mostrando que os bioterápicos administrados a estes grupos pré-infecção não preveniram e ainda aumentaram os efeitos da parasitose. Animais tratados com BIOT-TG200 não apresentaram perda de peso. Estes resultados indicam mais uma vez que camundongos infectados com o protozoário melhoraram sob vários aspectos no BIOT-TG 200. Picard et al 2002 constataram perda de peso inicial de 27 a 30% em camundongos Swiss infectados com 10 cistos da cepa ME49, via intraperitoneal. Até o 28º dia de observação, cerca da metade dos animais recuperaram no máximo 62% do peso, enquanto que no restante a queda manteve-se. A mortalidade observada neste grupo provavelmente esteve associada a problemas de manejo do animal no momento de inoculação do parasito, já que o animal morreu rapidamente, após a infecção. Embora os animais tratados com BIOT-TG100 não apresentaram resultados efetivos nas análises clínicas, parasitológicas e na dosagem do *TGF-β* este grupo apresentou benefícios na prevenção da toxoplasmose ocular.

Apesar de não ter sido observado diferenças significativas entre os grupos na tonometria ocular, todos os grupos infectados apresentaram diminuições da pressão intra-ocular (PIO) comparados ao grupo controle sadio. Savinova et al. 2001, descrevem que a PIO média em camundongos varia aproximadamente entre 10 e 20 mmHg, sofrendo influência da linhagem genética do animal, da idade, do horário da mensuração e da presença de patologias. No presente experimento a carga parasitária, o genótipo do parasito e a susceptibilidade genética do hospedeiro foram padronizados *a priori* e o estado do sistema imunológico é o

que pode ter sido alterado frente à ação do medicamento utilizado. Medicamentos ultradiluídos podem funcionar como imunomoduladores (Pupulin et al. 2010). Mais especificamente, bioterápicos têm ação sobre mecanismos relacionados ao sistema imunológico em infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* podendo, por exemplo, aumentar apoptose (Sandri et al. 2011), alterar perfil de citocinas e de anticorpos produzidos (Pupulin et al 2010, Almeida et al 2008).

Em relação à análise fundoscópica, todos os grupos apresentaram lesões retinianas sugestivas de toxoplasmose ocular, porém o grupo BIOT-TG100 foi o que melhor preveniu os efeitos da toxoplasmose ocular. Neste sentido vale salientar que neste trabalho, diluições maiores tenderam a proporcionar ao hospedeiro melhora clínica. Já as diluições menores como as utilizadas para os grupos BIOT-TG7 e BIOT-TG30 proporcionaram uveíte severa e hemorragia intensa.

Estes dados estão de acordo com a literatura onde alguns autores descrevem que a infecção crônica por *T. gondii* provoca alterações oculares em animais (Rathinam & Namperumalsamy 2007; Pavesio et al. 1995).

Em humanos, a manifestação clínica mais comum na fase crônica é a retinocoroidite, que ocorre em 70% a 90% das crianças infectadas verticalmente e em 2 a 30% dos pacientes infectados horizontalmente (Gilbert & Stanford 2000). Holand 1999 & Silveira et al. 1988 também enfatizam que o *T. gondii* é uma das causas mais frequentemente identificadas de uveíte e é responsável por mais de 85% dos casos de uveíte posterior do sul do Brasil.

Diante da tentativa de homeostase, apesar de não ter sido observado diferenças com o grupo GCN, os grupos BIOT-TG17 e BIOT-TG200 demonstraram tendência à diminuição dos níveis de *TGF-β*. Sandri 2011, descreve que animais tratados com bioterápicos de *T. cruzi* 17 DH apresentaram níveis de *TGF-β* diminuídos em relação ao controle, evidenciando assim uma tentativa do hospedeiro de diminuir os danos decorrentes da infecção e replicação

de *T. cruzi* com diminuição da inflamação tecidual. Segundo Okamoto et al. 1995, o *TGF-β* é uma citocina que regula inflamação de tecido sendo identificado como o principal mediador da regulação imunológica no sistema nervoso central e no olho, onde são observados cistos de *T. gondii*, e que muitas vezes podem se reativar.

Os mecanismos envolvidos na imunomodulação por medicamentos altamente diluídos ainda não foram elucidados (Elia et al. 2007). Desta forma, reforça-se a importância de aprofundamento do uso de bioterápicos e seus efeitos na relação entre o parasito e o hospedeiro. Os dados certamente contribuirão para o entendimento da ação destas substâncias e propiciarão a possibilidade do encontro de novas formas de enfrentar casos de infecções parasitárias seja em humanos ou em animais.

## **Conclusão**

O BIOT-TG7, BIOT-TG100 e BIOT-TG200, provocam diminuição no número de bradizoítos por cistos de *T. gondii*. Animais tratados com BIOT-TG17 e BIOT-TG200 apresentam tendência à redução do número de cistos cerebrais em camundongos infectados pelo *T. gondii*. O grupo BIOT-TG 200, considerando todos os parâmetros avaliados apresenta melhor desempenho no tratamento pré-infecção da toxoplasmose em camundongos. Todos os animais tratados apresentam efeitos dos bioterápicos verificados visual e estatisticamente demonstrando a importância desses achados. Em relação aos parâmetros oftalmoscópicos o BIOT-TG100 e BIOT-TG200 apresentam maior eficácia contra os danos da toxoplasmose ocular em camundongos. BIOT-TG17 e BIOT-TG200 apresentam tendência a produzir menor concentração sérica de *TGF-β*.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação Araucária e o PROAP/CAPES pelo apoio financeiro.

**Contribuição do autor****Conflitos de interesse**

Não existe conflito de interesses.

## Referências

- Aleixo DL, Ferraz FN, Ferreira EC, Lana M, Gomes ML, Filho BAA & Araújo SM (2012) Highly diluted medication reduces parasitemia and improves experimental infection evolution by *Trypanosoma cruzi*. BMC Res Notes. 5, 352.
- Aleixo DL, Veiga FK, Ferraz FN, Bonamin LV & Araújo SM (2012) Homeopathy in parasitic diseases. BMC Res Notes – Em submissão (b)
- Almeida LR, Campo MC, Herrera HM, Bonamin LV & Fonseca AH (2008) Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Br Homeopathy J. 97, 2, 65-69.
- Bonamin LV & Endler PC (2010) Animal model for studying homeopathy and high dilutions. Br Homeopathy J. 99, 37–50.
- Brasil (1999) Instrução Normativa n.7. Normas para produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Diário Oficial Republica Federativa do Brasil. Brasília, 11-14.
- Brasil MS (2007): Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N°67. Diário Oficial da União, Brasília (DF): Diário Oficial da União, Brasília (DF).
- Desmonts G & Remington JS (1980) Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: Method for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol. 11, 6, 562-568.
- Dubey JP & Beattie CP (1988) Toxoplasmosis of animals and man. BocaRaton: CRC Press; 220.
- Dubey JP (1977) *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of man and animals. In: Kreier JP (Ed). *Parasitic protozoa gregarines, haemogregarines, coccidia, plasmodia and haemoproteids*. New York: Academic Press, 3, 101-237.

Elia V, Napoli E & Germano R. (2007) The ‘‘Memory of Water’’: an almostdeciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueoussolutions. Br Homeopathy J. 96,163-169.

Farmacopéia Homeopática Brasileira (2011) Agência Nacional de Vigilância Sanitária 3.ed., Brasília.

Ferreira EC, Braga CF, Massini PF, Drozino RN, Moreira NM, Aleixo DL, Guilherme ALF & Araújo SM (2011) Homeopathy: statistical significance *versus* the sample size in experiments with *Toxoplasma gondii*. Int J High Dilution Res. 10, 36, 115-118 *Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH; 2011 Sep 04-07; Foz do Iguaçu (Brazil)*

Frajblat M, Amaral VLL & Rivera EAB (2008) Ciência em animais de laboratório. Cienc. Cult., São Paulo, 60, 2.

Gaddi PJ & Yap GS (2007) Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. Immunology and Cell Biology. 85, 155-159.

Gilbert RE & Stanford MR (2000) Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? Br. J. Ophthalmol., 84, 224-6.

Hedrich HJ & Bullock G (2004) The Laboratory Mouse. Oxford: Elsevier Science and Technology.

Helley DM (1970) Toxoplasmosis. J Small Anim. Pract. 4, 627-629.

Holland GN (1999) Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. Am J Ophthalmol.128, 502–505.

Julian O. (1983) Matéria Médica der Nosoden. Haug-Verlog Heidelberg.

Kossak-Romanach A (2003) Homeopatia em 1000 conceitos. São Paulo: ELCID.

- Leon SC, Coelho HE & Ribeiro W (1997) Avaliação do Bioterápico de *Toxoplasma* em camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*. *Pesqui. homeopática = Homeop. explorado*. 12, 2, 20-36.
- Neves DP (2006) *Parasitologia Dinâmica*. Editora Atheneu, São Paulo. 61, 465-468.
- Okamoto S, Hara Y & Streilein JW (1995) Induction of anterior chamber-associated immune deviation with lymphoreticular allogeneic cells. *Transplantation*. 59, 377-381.
- Oréfice F (2005) *Uveíte: Clínica e Cirúrgica: 2. ed Texto e Atlas*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 699-804.
- Pavesio CE, Chiappino ML, Gormley P, Setter PY & Nichols BA (1995) Acquired retinochoroiditis in hamsters inoculated with ME49 strain *Toxoplasma*. *Invest Ophthalmol Visc Sci*. 36, 2166-2175.
- Picard F, Arsenijevic D, Richard D & Deshaies Y (2002) Response of adipose and muscle lipoprotein lipase to chronic infection and subsequent acute lipopolysaccharide challenge. *Clin Diagn Lab Immunol*. 9, 771-776.
- Pupulin ART, Araújo SM, Toledo MJO, Gomes ML, Takejima E, Cuman RKN & Amado CAB (2010) Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 126, 435-440.
- Rathinam SR & Namperumalsamy P (2007) Global variation and pattern changes in epidemiology of uveitis. *Indian J Ophthalmol*. 55, 3, 173-83.
- Rossi F, Ambrosano EJ, Melo PCT, Guirado N, Mendes PCD & Bréfere FAT (2004) Emprego da homeopatia no controle de doença de plantas. *Summa Phytopathologica*. 30, 156-158.
- Ruiz-Vega G & Estevez-Salgado G (2008) Non-linearity modeling of Ultradilutions: the histamine disturbances case. In: Bonamin LV (ed). *Signal and Images, Contributions and Contradictions about High Dilution Research*. Dordrecht: Springer, 67-82.

Sandri PF (2011) Efeitos do bioterápico 17DH na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos de diferentes idades. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá.

Savinova OV, Sugiyama F, Martin JE, Tomarev SI, Paigen BJ, Smith RS & John SWM (2001) Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. BMC Genet. 2, 12.

Silva AV, Pezerico SB, Lima VY, Moretti L, Pinheiro JP & Tanaka EM (2005) Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. Vet Parasitol. 127, 1, 23-27.

Silveira C, Belfort Jr R, Burnier Jr M & Nussenblatt R (1988) Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. Am J Ophthalmol. 106, 362–364.

Slosárková S, Literák I, Skrivánek M, Svobodová V, Suchy P & Herzig I (1999) Toxoplasmosis and iodine deficiency in angora goats. Vet Parasitol. Amsterdam, 81, 89-97.

Stock-Schröer B, Albrecht H, Betti L, Endler PC, Linde K, Lüdtke R, Musial F, Wijk R, Witt C, Baumgartner S (2009). Reporting experiments in homeopathic basic research (REHBaR) – A detailed guideline for authors. Br Homeopathy J. 98, 287-298.

Teixeira MZ (2008) Pesquisa clínica em homeopatia: evidências, limitações e projetos. Pediatr. 30, 1, 27-40.

Tenter AM (1999) Current Knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. Tokai J Exp Clin Med. 23, 391.

Tenter AM, Heckeroth AR & Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 30, 1217-1220.

Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, Buzoni-Gatel D & Bout DT (2000) Intranasal Immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 Induces Protective Cells into Both NALT and

GALT Compartments. Infect. Immun. 68, 2, 969-972.

Vivas LAM, Jamel N, Refinetti AR, Silva LF, Rodrigues LV, Silva PC, Schanaider A (2007)

Anesthetic experimental device for small animal. Acta Cir Bras. 22, 3, 229-233.

Williams RH, Morley EK, Hughes JM, Duncanson P, Terry RS, Smith JE & Hide G (2005)

High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. J

Parasitology, New York. 130, 301-307.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

Deste estudo realizado para comparar o efeito de medicamento produzido com cistos de *Toxoplasma gondii* em camundongos infectados com este protozoário, concluí-se que:

- 1) BIOT-TG 200, considerando todos os parâmetros avaliados apresenta melhor desempenho no tratamento pré-infecção da toxoplasmose em camundongos;
- 2) Todos os animais tratados apresentam efeitos dos bioterápicos verificados visual e estatisticamente;
- 3) BIOT-TG7, BIOT-TG100 e BIOT-TG200, provocam diminuição no número de bradizoítos por cistos de *T. gondii*;
- 4) BIOT-TG17 e BIOT-TG200 apresentam tendência à redução do número de cistos cerebrais em camundongos infectados pelo *T. gondii*;
- 5) BIOT-TG100 e BIOT-TG200 apresentam maior eficácia contra os danos da toxoplasmose ocular em camundongos;
- 6) BIOT-TG17 e BIOT-TG200 apresentam tendência a produzir menor concentração sérica de *TGF-β*.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como perspectiva de futuros trabalhos, a utilização de diluições maiores deste medicamento, diferentes esquemas terapêuticos, aprofundamento dos estudos em análises imunológicas para evidencição de células em apoptose e avaliação de outras citocinas, contribuirão para o esclarecimento do mecanismo de ação de substâncias ultradiluídas e a dinâmica da relação hospedeiro-parasita x bioterápicos.