Effect of 7DH biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* in mice infected with the protozoan

Caroline Felicio Braga, Ricardo Nascimento Drozino, Neide Martins Moreira, Denise Lessa Aleixo, Silvana Marques de Araújo

State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Toxoplasmosis is a zoonosis caused by *Toxoplasma gondii* worldwide distributed [1]. In both, men and animals, the infection with *T. gondii* can lead to important pathologies [2]. The study of alternative treatments is important to set new therapeutic protocols, especially for the prevention of congenital toxoplasmosis.

Aim: This study evaluated the effect of a biotherapeutic 7DH *T. gondii* in mice infected with *T. gondii*.

Material and methods: The study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Estadual de Maringá – Protocol n° 036/2009. Fourteen mice were used – swiss male aged 57 days divided into two groups according to the treatment (or its diluent biotherapeutic): BIOT-200DH and Control (cereal alcohol-7%). The biotherapeutic was prepared with homogenized mouse brain (20 cysts of *T.gondii*/100µL-average 242 bradyzoites / cyst), according to the Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia [3] in laminar flow. The experiment was performed as a blind randomized controlled trial. The animals were treated for 3 days immediately prior to infection. The oral treatment schedule was of 0.1mL/4x/ day, on the first day, followed by 2x/day. Animals aged 57 – 59 days were treated with biotherapeutic and were clinically evaluated. The animals were orally infected at the age of 60 days (20 cysts ME49-*T. gondii*). Within 18-21 days of infection the clinical parameters were evaluated. On the 55th day of infection the eye fundus was examined (Ophthalmoscope Welch Allyn ®) and the intraocular pressure was measured (Tonometer TONO-PEN ® XL). After 60 days of post-infection the animals were killed in a chamber saturated with halothane, the brains were homogenized and resuspended in 1 ml of saline solution. The cysts were counted according to a rate of 25 mL of suspension, covered with 24x24 mm glass, examined in its full length.

Results and discussion: The table 1 summarizes the clinical data. There was no significant difference among the groups for clinical parameters during treatment, although it was recorded the death of an animal in the biotherapeutic 7DH group. The dead animal presented distended stomach and liquid feces in the intestine. After the infection it was observed reduction of water consumption ($p < 0.01$) and a reduction in the amount of feces ($p = 0.052$) in the group treated with biotherapeutic 7DH compared to the control group. Mice treated with biotherapeutic 7DH developed ascites on the sixth day of post-infection, exacerbating the clinical symptoms.

The number of brain cysts was compared among groups using Mann-Whitney test with 5% of significance. Although there was no significant difference among the groups ($p = 0.2943$), the results are interesting: the number of cysts - average $\pm$ standard deviation – was of 26.7 ± 38.6 in group 7DH, and of 9.7 ± 12 , 8 in the control group. The high values for the standard deviations suggests large individual variation and the necessity of a higher number of samples for further analysis.

Table 1. Clinical parameters evaluated in mice aged 57-60 days, during the administration of biotherapies and with 18-21 days of infection with cysts of ME49 strain *T. gondii*. Values are expressed as average $\pm$ standard deviation.

Parameters	During	treatment	After	infection
	Control	7DH	Control	7DH
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	31,72 $\pm$ 0,77	31,57 $\pm$ 0,73	31,89 $\pm$ 0,16	31,13 $\pm$ 0,96
Water Consumption (mL)	9,75 $\pm$ 1,96	8,80 $\pm$ 2,14	10,71 $\pm$ 0,97	6,88 $\pm$ 1,25
Feed intake (g)	6,78 $\pm$ 0,98	6,08 $\pm$ 0,68	7,45 $\pm$ 1,093	6,99 $\pm$ 1,296
Excreta (g)	4,70 $\pm$ 1,36	3,18 $\pm$ 0,40	4,97 $\pm$ 1,780	2,14 $\pm$ 1,069
Mortality (%)	0	14,3	0	0

Figure1: Number of brain cysts observed in Swiss male mice were divided into control group and a group treated with the 7DH biotherapeutic *Toxoplasma gondii*.

Regarding intraocular pressure, there was a reduction ($p < 0.05$) in the group 7DH (5.0 ± 1.0 mmHg) when compared with the infection control (8.9 ± 3.8) mmHg. Figure 2 summarizes the data for fundoscopy. Once more, the sample size makes it difficult to demonstrate statistical significance, although the biological effect is clear.

Figure 2: fundoscopic analysis of the eyes of Swiss male mice treated with biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* (Group 7DH) or not (control group) 55 days after infection with the protozoan.

Conclusion: Mice pre-infection treated with biotherapeutic 7DH, presented bigger clinical alterations, which were measured visually and statistically compared to the control group. There was a biological effect of the biotherapeutic, with an increase in the number of cysts compared to the control group, without statistical significance. The group 7DH showed a significant reduction of intraocular pressure and fundoscopic analysis showed a larger number of animals without ocular changes, without statistical significance. The sample size should be reevaluated for better data interpretation and decision on the effects of the biotherapeutic 7DH *T. gondii*.

Keywords: Biotherapeutic, prevention, toxoplasmosis

References

- [1] Dubey J P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporiasis, and cyclosporiasis. In: Palmer S A., Soulby L., Simpson D I H. Zoonoses. Oxford: Oxford University, 1998; p.948.
- [2] Tenter A M. Epidemiological importance of animals in the transmission of *Toxoplasma*. Parasitology International, 1998; (47): 82.
- [3] Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia: Part I - General Methods, 2nd ed, New York:Atheneu 1997.

Efeito de um bioterápico 7DH de *Toxoplasma gondii* em camundongos infectados com o protozoário

RESUMO

Introdução: A toxoplasmose causada pelo *Toxoplasma gondii* é uma zoonose de distribuição mundial [1]. Tanto no homem quanto em animais, a infecção pelo *T. gondii* pode levar a importantes quadros patológicos [2]. O estudo de tratamentos alternativos é importante para a instituição de novos protocolos terapêuticos, principalmente para a prevenção de toxoplasmose congênita.

Objetivos: Este trabalho objetivou avaliar a efeito de um bioterápico 7DH de *T. gondii* em camundongos infectados pelo protozoário.

Material e métodos: O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá - Parecer nº 036/2009. Foram utilizados 14 camundongos, *Swiss*, machos, com 57 dias, distribuídos em 2 grupos segundo o tratamento que receberam (bioterápico ou seu diluente): 7DH e Controle (álcool de cereais-7%). O bioterápico foi preparado com macerado de cérebro de camundongos (20 cistos *T. gondii*/100µL - média de 242 bradizoítos/cisto), segundo Farmacopéia Homeopática Brasileira [3] em fluxo laminar. O experimento foi conduzido como ensaio cego controlado, randomizado por sorteio. Os animais receberam tratamento por 3 dias consecutivos imediatamente antes da infecção. O esquema de tratamento foi de 0.1mL/4X/dia, no primeiro dia e 2X/dia na sequência, por gavagem. Entre 57-59 dias de idade os animais foram tratados com bioterápico e foram avaliados clinicamente. Aos 60 dias de idade os animais foram infectados (20 cistos cepa ME49-*T. gondii*), via oral. Entre 18-21 dias de infecção os parâmetros clínicos foram novamente avaliados. Aos 55 dias de infecção os animais foram submetidos ao exame de fundo de olho (Oftalmoscópio Welch Allyn®) e medida da pressão ocular (Tonômetro TONO-PEN® XL). Após 60 dias de pós-

infecção os animais foram mortos em câmara saturada de halotano, o cérebro foi macerado e re-suspendido em 1mL de solução salina. Foram contados os cistos presentes em alíquota de 25 µL desta suspensão, coberta com lamínula de 24 x 24 mm, examinada em toda a sua extensão.

Resultados e discussões: A tabela 1 resume os dados clínicos obtidos. Não houve diferença significativa entre os grupos para os parâmetros clínicos durante o tratamento, embora tenha sido registrada a morte de um animal do grupo bioterápico 7DH, com estômago distendido e presença de fezes mole no intestino. Após a infecção foi observado redução do consumo de água ($p<0.01$) e redução na quantidade de excretas ($p=0.052$) do grupo tratado com bioterápico 7DH em relação ao controle. Camundongos tratados com bioterápico 7DH apresentaram ascite acentuada no sexto dia de pós-infecção, exacerbando sintomas clínicos.

Tabela 1. Parâmetros clínicos avaliados em camundongos com idade entre 57-60 dias, durante a administração dos bioterápicos e com 18-21 dias de infecção com cistos da cepa ME49 de *T.gondii*. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão.

Parâmetros	Durante o tratamento		Após a infecção	
	Controle	7DH	Controle	7DH
Temperatura (°C)	31,72 $\pm$ 0,77	31,57 $\pm$ 0,73	31,89 $\pm$ 0,16	31,13 $\pm$ 0,96
Consumo de água (mL)	9,75 $\pm$ 1,96	8,80 $\pm$ 2,14	10,71 $\pm$ 0,97	6,88 $\pm$ 1,25
Consumo de ração (g)	6,78 $\pm$ 0,98	6,08 $\pm$ 0,68	7,45 $\pm$ 1,093	6,99 $\pm$ 1,296
Excretas (g)	4,70 $\pm$ 1,36	3,18 $\pm$ 0,40	4,97 $\pm$ 1,780	2,14 $\pm$ 1,069
Mortalidade (%)	0	14,3	0	0

O número de cistos cerebrais foi comparado entre os grupos utilizando Mann-Whitney com 5% de significância. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos ($p=0.2943$), os resultados são interessantes: o número de cistos – média $\pm$ desvio padrão - foi de 26,7 $\pm$ 38,6 no grupo 7DH; e 9,7 $\pm$ 12,8 no controle. Os altos valores para os desvios padrão sugerem grande variação individual com necessidade de aumento da amostragem para aprofundamento da análise.

Figura 1: Número de cistos cerebrais observados em camundongos *Swiss*, machos distribuídos em grupo controle e tratados com bioterápico 7DH de *Toxoplasma gondii*.

Com relação à pressão intra-ocular, houve redução ($p < 0.05$) no grupo 7DH ($5,0 \pm 1,0$ mmHg) em relação ao controle de infecção ($8,9 \pm 3,8$ mmHg). A figura 2 resume os dados para fundoscopia. Mais uma vez o tamanho da amostra impossibilita a demonstração de significância estatística, embora o efeito biológico seja claro.

Figura 2: Análise fundoscópica dos olhos de camundongos *Swiss*, machos tratados com bioterápico de *Toxoplasma gondii* (Grupo 7DH) ou não (Grupo Controle) 55 dias após a infecção com o protozoário.

Conclusão: Os camundongos tratados pré-infecção com bioterápico 7DH, apresentaram alterações clínicas mais intensas medidas visual e estatisticamente em relação ao controle. Foi verificado efeito biológico do bioterápico, com aumento do número de cistos em relação ao controle, sem significância estatística. O grupo 7DH apresentou redução significativa da pressão intra-ocular e na análise fundoscópica maior quantidade de animais sem alterações oculares, sem significância estatística. Deve ser repensado o tamanho da amostra para melhor interpretação dos dados e decisão sobre os efeitos da potência 7DH do bioterápico de *T. gondii*.

Palavras-chave: Bioterápico, prevenção, toxoplasmose.

Licensed to [GIRI](#)

Support: PROAP/CAPES

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

Correspondence author: Caroline Felício Braga, cfeliciobraga@gmail.com.

How to cite this article Braga CF, Drozino RN, Moreira NM, Aleixo DL, Araújo SM. Effect of 7DH biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* in mice infected with the protozoan. Int J High Dilution Res [online]. 2011 [cited YYYY Month dd]; 10(36): 147-151. Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH; 2011 Sep 04-07; Foz do Iguaçu (Brazil). GIRI and ABFH; 2011; Available from: <http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/view/484/497>