Biotherapeutic 200 DH reduces cerebral parasitism in mice infected with *Toxoplasma gondii*

Caroline Felicio Braga, Gislaine Janaína Sanchez Falkowski, Neide Martins Moreira, Denise Lessa Aleixo, Silvana Marques de Araújo

State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Toxoplasmosis is a zoonosis that represents a serious public health problem, worldwide distributed. Pregnant women are part of the most risky group due to congenital sequels. The necessity of a preventive treatment for congenital infections is of great importance [1] Biotherapies, highly diluted medicines prepared with *T. gondii* according to the Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia [2], is an important prevention strategy, ensuring a safe and cheap approach to protozoan infections [3]. However, little is known about the effects of different potencies and treatment schedules.

Aim: To evaluate the effect of biotherapeutic 200DH in mice infected with *Toxoplasma 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 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 treatment schedule was of 0.1mL/single dose/ day, by gavage. 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 number of brain cysts was compared among groups using the 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 the 4.5 ± 3.3 in the BIOT-200DH group and of 9.7 ± 12.8 in the control group. It is necessary to emphasize the great variability within the control group expressed by the standard deviation.

Table 1 shows the clinical parameters evaluated during the administration of biotherapeutic and after the infection with *T. gondii*. No difference was observed among the groups, although one of the animals in the group treated with biotherapeutic 200DH died. The autopsy showed that the liver was chalky and the stomach presented hemorrhagia characteristics on the 5th day of post infection.

Figure 1: Number of brain cysts observed in Swiss male mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. Control group (treated with cereal alcohol-7%) and BIOT-200DH (200DH biotherapeutic treated with *T. gondii*).

Table 1. Clinical parameters in Swiss male mice were evaluated during the administration of biotherapeutic 200DH and within the 18-21 days after infection with 20 cysts of ME49 strain *T. gondii*, orally. Values are expressed as average $\pm$ standard deviation.

Parameters	During	treatment	After	infection
	Control	200DH	Control	200DH
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	31,72 $\pm$ 0,77	31,82 $\pm$ 1,06	31,89 $\pm$ 0,16	31,14 $\pm$ 0,81
Water Consumption (mL)	9,75 $\pm$ 1,96	8,35 $\pm$ 2,21	10,71 $\pm$ 0,97	11,50 $\pm$ 0,45
Feed intake (g)	6,78 $\pm$ 0,98	6,85 $\pm$ 1,27	7,45 $\pm$ 1,093	8,43 $\pm$ 1,245
Excreta (g)	4,70 $\pm$ 1,36	4,45 $\pm$ 0,53	4,97 $\pm$ 1,780	4,16 $\pm$ 697
Mortality (%)	0	0	0	14,3

Likewise, there was no significant difference among the average of intraocular pressure observed in the control group (8.9 ± 3.8) and the group BIOT-200DH (8.0 ± 2.6). Regarding fundoscopy, the control group presented 57.14% of the animals without changes and 42.86% with discreet subretinal hemorrhage. While in the BIOT-200DH group, 50% of the animals showed no change and 50% showed discreet subretinal hemorrhage. Compared with the results from the use of other biotherapeutic *T. gondii* potencies [4], these results indicate that mice infected with the protozoan reacted better to the potency 200DH, Although mortality. This better response may the chronic aspect of the infection and/ or the characteristics of host-parasite relationship in the infection with *T. gondii* that involves alterations in the central nervous system.

Conclusion: The highly diluted biotherapeutic 200DH *T. gondii* caused mortality in one animal in group however caused no significant difference other clinical and parasitological parameters evaluated although there was a decrease of parasitism brain of mice infected with the protozoan compared to control group.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; high dilution; biotherapeutic.

References:

- [1] Margonato F B. et al. Toxoplasmosis in pregnancy: diagnosis, treatment and importance of clinical protocol. Rev. Bras. Mater Health. Infant., Recife 2007; (7):4.
- [2] Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia: Part I - General Methods, 2nd ed, New York: Atheneu 1997.
- [3] Almeida L R. et al. Biological parameters of adult female *Amblyomma cajennense* fed rabbits treated with biotherapeutic ultradiluted. Ciênc Rural, Santa Maria 2008; (38):5.
- [4] Braga C F. et al. Screening of powers of biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* in mice pre-treated infection. I South American Congress of Pharmacy, Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010.

Bioterápico 200 DH causa redução do parasitismo cerebral em camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*

RESUMO

Introdução: A Toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, constituindo um sério problema de saúde pública. As gestantes destacam-se como o grupo de maior risco nesta infecção devido às seqüelas congênitas. A necessidade de um tratamento preventivo para a infecção congênita reveste-se de grande importância [1]. Os bioterápicos, medicamentos ultradiluídos preparados com o *T. gondii* de acordo com a Farmacopéia Homeopática Brasileira [2], podem constituir-se em importante estratégia de prevenção, garantindo uma abordagem segura e de baixo custo para infecções por protozoários [3]. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos das diferentes potências e esquemas de administração.

Objetivo: Avaliar o efeito do bioterápico 200DH em camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*.

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 de idade distribuídos em 2 grupos segundo o tratamento que receberam (bioterápico ou seu diluente): BIOT-200DH e Controle (álcool de cereais-7%). O bioterápico foi preparado com macerado de cérebro de camundongos (20 cistos *T. gondii*/100 µL-média de 242 bradizoítos/cisto), segundo Farmacopéia Homeopática Brasileira 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 0.1mL/dose única/dia, 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 avaliados. Aos 55 dias de infecção foi realizado o exame de fundo de olho (Oftalmoscópio Welch Allyn®) e medida a pressão ocular (Tonômetro TONO-PEN® XL). Após 60 dias de pós-infecção os animais foram mortos em câmara saturada de halotano, o cérebro 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 discussão: O número de cistos cerebrais foi comparado entre os grupos utilizando o teste de 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±desvio padrão - foi de 4,5±3,3

no grupo BIOT-200DH e $9,7 \pm 12,8$ no Controle. Destaca-se a grande variabilidade dentro do grupo controle expressa pelo desvio-padrão.

Figura 1: Número de cistos cerebrais observados em camundongos *Swiss*, machos cronicamente infectados pelo *Toxoplasma gondii*. Grupo Controle (tratados com álcool de cereais-7%) e BIOT-200DH (tratados com bioterápico 200DH de *T. gondii*).

A Tabela 1 apresenta os parâmetros clínicos avaliados durante a administração do bioterápico e após a infecção com *T. gondii*. Não foi observada diferença entre os grupos, embora tenha sido constatada a morte de um animal do grupo tratado com bioterápico 200DH. A necropsia revelou fígado esbranquiçado e estômago com características hemorrágicas no quinto dia de pós-infecção.

Tabela 1. Parâmetros clínicos em camundongos suíços, machos, avaliados durante a administração do bioterápico 200DH e aos 18-21 dias de infecção com 20 cistos da cepa ME49 de *T.gondii*, por via oral. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão.

Parâmetros	Durante tratamento		Após infecção	
	Controle	200DH	Controle	200DH
Temperatura (°C)	31,72 $\pm$ 0,77	31,82 $\pm$ 1,06	31,89 $\pm$ 0,16	31,14 $\pm$ 0,81
Consumo de água (mL)	9,75 $\pm$ 1,96	8,35 $\pm$ 2,21	10,71 $\pm$ 0,97	11,50 $\pm$ 0,45
Consumo de ração (g)	6,78 $\pm$ 0,98	6,85 $\pm$ 1,27	7,45 $\pm$ 1,093	8,43 $\pm$ 1,245
Excretas (g)	4,70 $\pm$ 1,36	4,45 $\pm$ 0,53	4,97 $\pm$ 1,780	4,16 $\pm$ 697
Mortalidade (%)	0	0	0	14,3

Da mesma forma, não houve diferença significativa entre a média de pressão ocular observada entre o grupo Controle ($8,9 \pm 3,8$) e o grupo BIOT-200DH ($8,0 \pm 2,6$). Quanto à fundoscopia o grupo controle apresentou-se com 57,14% dos animais sem alterações e 42,86% com hemorragia sub-retiniana discreta. Enquanto para o grupo BIOT-200DH, 50% dos animais apresentaram-se sem alterações e 50% hemorragia sub-retiniana discreta. Comparados com resultados obtidos com a utilização de outras potências do bioterápico de *T. gondii* [4], estes resultados indicam que camundongos infectados com o protozoário reagiram melhor à potência 200DH, apesar da mortalidade. Esta melhor reação talvez seja devido à cronicidade da infecção e/ou às características da relação parasito-hospedeiro na infecção pelo *T. gondii* que envolve alterações em nível de sistema nervoso central.

Conclusão: O bioterápico ultradiluído 200DH de *T. gondii* provocou mortalidade de 1 animal do grupo, porém não causou diferença significativa em outros parâmetros clínicos e parasitológicos avaliados, apesar de ter ocorrido uma diminuição do parasitismo cerebral dos camundongos infectados pelo protozoário em relação ao grupo controle.

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, Falkowski GJS, Moreira NM, Aleixo DL, Araújo SM. Biotherapeutic 200 DH reduces cerebral parasitism in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Int J High Dilution Res* [online]. 2011 [cited YYYY Month dd]; 10(36): 158-162. 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/492/503>