



Efeito de bioterápico na eosinofilia durante a SLMV experimental

Luciana Camillo^{1,*}; Sandra Regina Pereira de Oliveira¹; Rosa Domingues Ribeiro²; Joice Margareth de Almeida Rodolpho¹; Gabriel Henrique Gomes Caroccia¹; Sérgio de Albuquerque³; Fernanda de Freitas Anibal¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Morfologia e Patologia, Laboratório de Parasitologia, - LAP-DMP-UFSCar;

² Universidade de Franca –UNIFRAN;

³ Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas, – DACTB-FCFRP-USP.

RESUMO

O *Toxocara canis* (Tc) é um parasito pertencente ao filo Nematódeo que possui como hospedeiro definitivo os cães. O homem é hospedeiro paratênico e contamina-se acidentalmente ao ingerir ovos contendo larvas infectantes (L3) do parasito, as quais são liberadas e atravessam a mucosa intestinal, atingem a circulação. Durante este processo migratório, antígenos de excreção e secreção (TES) são liberados provocando intensa reação inflamatória, do tipo Th2, caracterizando a síndrome, denominada Larva Migrans Visceral (SLMV). As principais características desta doença crônica são as eosinofilias sanguínea e tecidual persistentes. Desse modo, torna-se importante a busca por terapias que contribuam com a redução dos quadros inflamatórios com intensa eosinofilia. Assim, o uso deste bioterápico, produzido a partir do extrato antigênico de ovos e larvas de (Tc), e seu efeito no recrutamento de leucócitos totais, células mononucleares e eosinófilos no sangue, para o espaço broncoalveolar e para a cavidade peritoneal de camundongos infectados pelo (Tc) foi investigado. Foram utilizados camundongos fêmeas (Swiss), divididos nos grupos: Controle (C), Infectado (Tc), Imunizado (Im+Tc) e Tratado (Tc+Bio). Os animais Tc, Im+Tc e Tc+Bio receberam 500 ovos/animal por gavagem. Posteriormente, os animais foram eutanasiados no 18º dia da infecção e o número das células nos compartimentos foi determinado. Os resultados obtidos demonstraram que, Im+Tc, assim como nos Tc+Bio tiveram redução significativa dessas células nos compartimentos analisados quando comparados grupo Tc. Assim, sugeriu-se que a bioterapia modulou negativamente o recrutamento de células inflamatórias, principalmente eosinófilos no sangue, pulmão e intestino demonstrando um potencial anti-inflamatório desse bioterápico na SLMV experimental.

Palavras-chave: *Toxocara canis*. SLMV. Eosinofilia. Bioterápico.

Autor correspondente: Luciana Camillo, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Morfologia e Patologia, Rod. Washington Luis, km 235; caixa postal 676. São Carlos, SP. E-mail: lucianacamillo@gmail.com; ffanibal@ufscar.br

INTRODUÇÃO

Síndrome da Larva Migrans Visceral

O termo Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) foi introduzido pela primeira vez por Beaver (1952), em analogia à Síndrome da Larva Migrans Cutânea, para definir uma situação clínica que acometia crianças com sintomas pulmonares, hepatomegalia e eosinofilia persistente, decorrentes do processo migratório da larva de *Toxocara canis* pelos diversos órgãos. Em 1969, o autor restringiu a denominação da SLMV, mais propriamente para situações decorrentes à infecção parasitária, desencadeada pela migração e persistências de larvas de nematódeos por período prolongado em tecidos de humanos, onde as mesmas permanecem imaturas e não completam seu ciclo biológico (Beaver *et al.*, 1969).

O *Toxocara canis* é um representante do filo Nematoda, que possui como hospedeiro definitivo os cães e o *Toxocara cati* os gatos. A toxocaríase é transmitida a esses animais pela ingestão de ovos infectantes presentes no solo ou alimentos contaminados; pela ingestão de larvas infectantes em tecidos de animais que funcionam como hospedeiros paratênicos; pela migração transplacentária; passagem da larva através do leite na lactação dos filhotes e ingestão de larvas no estágio tardio (L4) ou adultos imaturos (L5) presentes nos vômitos e fezes de filhotes contaminados (Glickman & Schantz, 1981).

O homem é um hospedeiro paratênico do *Toxocara canis* e se contamina pela ingestão acidental de ovos larvados encontrados no meio ambiente. Estes, uma vez ingeridos, resultam na liberação das larvas infectantes no intestino delgado, as quais atravessam a mucosa intestinal e pela via linfática atingem a circulação porta e o fígado. Do fígado dirigem-se aos pulmões, por meio da circulação sanguínea. Além disso, ocorre penetração ativa das larvas na parede do intestino dando início a um processo de migração errática que faz com que as larvas continuem, através dos tecidos do hospedeiro, migrando até se encistarem em algum tecido e/ou morrerem. Durante o processo de migração, as larvas de *T. canis* induzem

uma síndrome característica, denominada de Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) (Beaver *et al.*, 1952). Em hospedeiros não habituais como o homem, as larvas não sofrem ecdises e nem crescem, mas permanecem vivas durante semanas ou até meses, porém não completam o ciclo. Em primatas infectados experimentalmente, já foi observado que larvas de *T. canis* permanecem vivas nos tecidos por um período de dez anos (Neves *et al.*, 2005). O grau de infecção parasitária, o estado nutricional do hospedeiro, a intensidade da resposta inflamatória, a localização tecidual das larvas e a sensibilização do hospedeiro por antígenos próprios das larvas, são fatores considerados determinantes na gravidade com que a SLMV pode acometer os seres humanos. Estes fatores podem ou não estar associados, os quais podem favorecer os indivíduos a apresentarem desde a forma assintomática até as manifestações clássicas da síndrome. Os sintomas mais frequentes são hepatomegalia, dor abdominal, febre, diminuição do apetite, agitação, manifestações pulmonares diversas como tosse e chiado no peito (Jacob *et al.*, 2000; Magnaval *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2005), e ainda, quadros de anemia, asma e rinite (Figueiredo *et al.*, 2005). Alterações cutâneas mais comumente associadas à SLMV são os quadros urticariformes e exantema nodular, podendo ser encontrado também quadro purpúrico (Jacob & Oselka, 1991).

A lesão típica produzida pelas larvas de *Toxocara canis* é o granuloma alérgico, sendo encontrado principalmente no fígado e pulmões de indivíduos infectados. No centro destes, encontra-se a larva do parasito, bem como tecido necrótico, com degeneração fibróide, cercados por eosinófilos e monócitos. Os órgãos mais afetados, por ordem de frequência, são o fígado, os pulmões, o cérebro, os olhos e os gânglios (Rey, 2001; Brown, 1977). Pode ocorrer ainda, comprometimento do sistema nervoso central com crises convulsivas focais ou generalizadas, distúrbio do comportamento e aumento de eosinófilos no líquido cefalorraquidiano. Outros sintomas evidenciados são miocardite, artrite, miosite, pleurite, meningite, dor abdominal e vários sintomas alérgicos, sendo muitas vezes decorrentes da resposta imunológica exacerbada (Dao & Virmani, 1986; Bruart *et al.*, 1987; Bethel, 1988; Rey, 1991; Chieffi, 1987).

Resposta imune à Toxocara canis

O acometimento de um organismo pelo parasita *T. canis* desencadeia um processo inflamatório em seu hospedeiro. É caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, causados devido à migração de células inflamatórias como linfócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos (Abbas *et al.*, 1997). Durante o processo de inflamação, células locais ou o plasma favorecem diferentes mediadores, os quais podem ser ampliados ou modificados por mediadores liberados pelas células inflamatórias que migraram ao local da inflamação (Benjamini *et al.*, 2002).

Infecções helmínticas envolvem diversos mecanismos de defesa devido ao tamanho e à diversidade metabólica dos parasitos, que são antigenicamente complexos (Machado *et al.*, 2003). A elevada prevalência relatada na população mundial demonstra que os helmintos estão envolvidos com sofisticados mecanismos moleculares, de escape, invasão e supressão do sistema imune do hospedeiro (Maizels *et al.*, 1984).

A larva de *Toxocara canis* apresenta certa habilidade em sobreviver em seu hospedeiro por muitos meses, ocasionando a estimulação de linfócitos T helper 2 (Th2) e conseqüentemente a produção de IgE e eosinofilia por longos períodos (Buijs *et al.*, 1997). Estudos têm demonstrado que os antígenos liberados pelas larvas de *T. canis*, parecem ser importantes na evasão do sistema imune pelo parasito (Hallack & Cunha, 1996; Altchek *et al.*, 2003). Na fase de migração as larvas liberam produtos metabolicamente ativos e antigênicos denominados antígenos de secreção-excreção (TES), estes constituem uma mistura de proteínas glicosiladas com proteases. Estas por sua vez, contribuem para que as larvas sejam recobertas por uma espécie de cápsula de colágeno, favorecendo um elaborado mecanismo de escape contra a reação do hospedeiro (Hallack & Cunha, 1996; Altech *et al.*, 2003; Despommier, 2003). Verifica-se também, a presença de uma fração alergênica responsável pela estimulação de eosinófilos, o que explica a eosinofilia persistente, característica dessa infecção. À medida que a infecção evolui, há a organização das células inflamatórias ao redor das larvas e seus metabólitos, constituindo assim, uma reação granulomatosa, caracterizada por centro necrótico contendo a larva, e circundado por células multinucleadas, neutrófilos, monócitos e por grande número de eosinófilos. (Hallack & Cunha, 2005).

A superfície do *T. canis* é reconhecida como uma estrutura dinâmica que se modifica completa e rapidamente, funcionando como nova fonte para altas concentrações de antígenos. Com isto, a maior resposta do hospedeiro aos antígenos inclui eosinofilia marcante e hiperglobulinemia (Kayes, 1984; Rayes & Lambertucci, 1999). A eosinofilia encontrada em pacientes com SLMV pode estar envolvida tanto no mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasita, como na reação inflamatória tecidual. O mecanismo pelo qual os eosinófilos lesam ou matam nematódeos, pode depender da deposição de grânulos na superfície larvária. Nesse mecanismo, os antígenos de secreção e excreção (TES) podem representar fatores importantes na aderência de eosinófilos à superfície larvária (Jacob & Oselka, 1991). Sendo assim, as manifestações clínicas e patológicas da SLMV são resultantes do dano tecidual direto causado pela migração larvária ou pela ação de seus metabólitos somados à resposta inflamatória gerada pelo hospedeiro (Beaver *et al.*, 1952).

Tratamento com bioterápico

Os bioterápicos são, segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira, preparações medicamentosas, de

uso homeopático, obtidas a partir de produtos biológicos, quimicamente indefinidos: secreções, excreções, tecidos e órgãos, patológicos ou não, produtos de origem microbiana e alérgenos (Brasil, 1997). Com outras palavras, o Manual de Normas Técnicas descreve os bioterápicos como sendo produtos não quimicamente definidos que servem de matéria-prima para preparações bioterápicas de uso homeopático (Manual de Normas Técnicas, 2003).

Os bioterápicos são considerados medicamentos homeopáticos por serem preparados de acordo com a farmacotécnica homeopática, sofrendo diluição e dinamização. Entretanto, o método é chamado de Isoterapia ou Isopatia, visto que não segue a Lei dos Semelhantes, mas a Lei dos Iguais. Na Isopatia, é empregado o próprio agente etiológico, visando uma reação terapêutica. Nos modelos de isopatia, deve haver uma identidade estrita entre a substância diluída e a substância tóxica desafiante (Almeida, 2008).

Para as preparações das formas farmacêuticas derivadas, a farmacotécnica homeopática emprega três escalas, de acordo com a proporção entre os insumos ativos e inertes: a decimal, a centesimal e a cinquenta milesimal (Brasil, 1997). Essa escala foi criada por Hahnemann e seus símbolos são C, ^a, nenhuma indicação ou CH [Centesimal Hahnemanniana] (Fontes, 2005). Para a homeopatia, quanto mais diluído, mais eficaz é o medicamento, uma vez que a diluição seguida de sucussão, ou seja, a dinamização é a responsável pelo aumento da força medicamentosa da substância (César, 2003).

A literatura é escassa em trabalhos que demonstrem os efeitos benéficos da bioterapia no tratamento de doenças infecciosas, principalmente nas parasitoses. Atualmente encontramos menos de duas centenas de artigos relacionados ao tratamento bioterápico e destes, menos de vinte evidenciam o seu uso em doenças causadas por parasitas. Dentre os trabalhos encontrados nenhum relata o uso de bioterápico para o controle da eosinofilia persistente durante a SLMV. Neste sentido, avaliamos se o bioterápico produzido a partir de ovos e lavas de *T. canis* apresenta efeito imunomodulador durante a infecção por *T. canis*, uma vez que, a busca por alternativas que modulem e favoreçam a diminuição dos efeitos de processos crônicos, principalmente modulando a eosinofilia persistente, é de grande valia no controle de diversas desordens inflamatórias.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, pesando entre 15 e 18 gramas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Os animais foram divididos em 4 grupos, contendo 7 animais/grupo: Controle (não infectados e não tratados), Infectado com *T. canis* (Tc), Tratado (infectados e posteriormente tratados com o bioterápico) e Imunizado (tratados com o bioterápico e posteriormente infectados), em dois experimentos independentes.

Obtenção dos ovos larvados de T. canis

Os ovos foram obtidos de fêmeas do parasito recuperadas de cães jovens através da administração de óleo mineral (4mL) com cloridrato de piperazina (100 mg/kg). Os cães doadores foram oriundos do recolhimento rotineiro do Centro de Zoonoses de Municipal Ribeirão Preto, SP. As fêmeas dos parasitos recuperadas foram dissecadas para extração de seus úteros, os quais foram divulsionados em placas de Petri, contendo formalina 2%. O material foi filtrado em gaze para obtenção dos ovos e armazenado em solução de formalina em placas de Petri, deixados à temperatura ambiente até alcançarem o estágio infectante (L3) (Gomes de Moraes, 1971).

Preparação do Bioterápico

Os ovos mantidos em formalina foram lavados com PBS 1 X por 3 vezes e centrifugados a 1500 rpm durante 3 minutos. Esse extrato total de *T. canis* foi utilizado como solução bruta para a produção do bioterápico que foi feito sob a supervisão da professora Dra. Rosa Domingues Ribeiro de acordo com protocolo já padronizado. A técnica utilizada consiste em colocar o extrato contendo ovos e larvas de *Toxocara canis* (10%) em maceração usando solução hidroalcoólica 70% durante 06 horas. Posteriormente o material foi filtrado para obtenção da Solução Mãe. Logo após foram realizadas sucessivas diluições (1/100) em álcool 70% até a obtenção de uma solução 14CH. Em seguida, diluiu-se a 1/100 em solução hidroalcoólica 30% para obtenção da solução 15CH.

Infecção dos camundongos com ovos de T. canis

Os camundongos foram infectados com ovos contendo larvas (L3) de *T. canis* por via oral (gavagem) com 500 ovos/0,5 mL salina, empregando-se cânulas apropriadas.

Tratamento dos camundongos

Os grupos experimentais foram organizados de forma a ter um grupo controle sem infecção, sem tratamento e sem imunização; um grupo apenas infectado com 500 ovos/animal de *T. canis*. Os camundongos imunizados receberam 4 doses diárias do bioterápico, sendo 5 gotas em cada dose, durante 10 dias. Após esses 10 dias, foi feito um intervalo de 7 dias e a infecção (desafio) foi realizada. O grupo que recebeu o tratamento foi infectado e 1 hora depois iniciou a administração do bioterápico. O tratamento foi realizado de forma que 4 doses diárias de 5 gotas foram administradas durante 18 dias. Após esse período os animais foram eutanasiados, as amostras coletadas e as análises foram realizadas.

Obtenção das células do lavado broncoalveolar (LBA), peritoneal (LCP) e do sangue

No tempo 18 dias após de infecção, os animais foram eutanasiados. As técnicas de lavagem broncoalveolar e peritoneal foram utilizadas para recuperação de células da cavidade pulmonar (LBA) e peritoneal (LCP). Para

obtenção do LBA utilizou-se 1,0 mL de solução salina tamponada (PBS), contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato) empregando cânulas de polietileno introduzidas na parte superior da traquéia, o procedimento foi repetido duas vezes, totalizando um volume final de 2 mL. Para o lavado da cavidade peritoneal (LCP) foi utilizado 2 mL de PBS, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato), empregando uma agulha intraperitonealmente. O sangue foi obtido após sangria total dos animais por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa contendo Heparina.

Contagem diferencial e total de células do lavado broncoalveolar (LBA), peritoneal (LCP) e do sangue

A contagem diferencial foi feita nos esfregaços sanguíneos e em lâminas preparadas em citocentrífuga (LBA e LCP) (Serocito Mod. 2400-Fanem). A coloração foi feita com o corante Panótico-Laborclin. Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando microscopia de luz com aumento final de 1000x. O número total de células/mm³ nos diferentes compartimentos foi determinado empregando solução de Turk (Violeta de Genciana 0.002 g, Ácido Acético 3%) para a lise das hemáceas, na diluição 1:20 e posteriormente foram realizadas as contagens em câmara de Neubauer.

Análise Estatística

Os gráficos foram dispostos no programa GraphPad Prism, onde os grupos foram comparados quanto ao perfil de células inflamatórias nos diferentes compartimentos estudados. As análises foram dispostas em resultados expressos com média ± EPM. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram submetidos ao método de análise de variância Two-ANOVA. Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad InStat (San Diego, Califórnia, USA). A significância estatística foi estabelecida em valores de p<0,05.

RESULTADOS

Avaliação do perfil celular durante a infecção por T. canis após a imunização e o tratamento com o bioterápico

A contagem total e diferencial de células por mm³ foi determinada no período de 18 dias após a infecção por *T. canis* no sangue, lavado da cavidade peritoneal (LCP) e lavado broncoalveolar (LBA). O objetivo foi avaliar a resposta celular à infecção, nos diferentes compartimentos, em animais tratados ou não com o bioterápico e em animais imunizados por ele, analisando o recrutamento celular e classificando os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular contra a infecção, em células mononucleares e eosinófilos após o tratamento ou não, e após a imunização.

Efeito do bioterápico no número de células no sangue de animais infectados com T. canis

A figura 1 representa a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue de camundongos dos grupos Controle (C), Infectado (Tc), Imunizado (Im+Tc) e Tratado

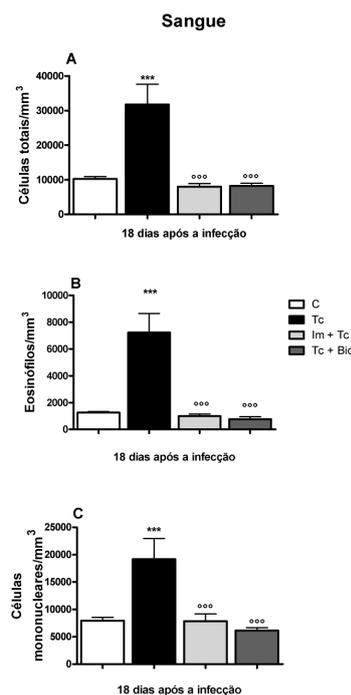


FIGURA 1: Contagem total e diferencial de leucócitos totais/mm³ (A); eosinófilos/mm³ (B) e células mononucleares/mm³ (C) no sangue, no 18º dia após a infecção. Os dados representam a média ±EPM (n = 5-7 animais). * p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo Tc quando comparado com o grupo C. ° p < 0,05 °° p < 0,01 °°° p < 0,001 representam a diferença significativa dos grupos Im+Tc e Tc+Bio quando comparados com o grupo Tc, usando o teste two-ANOVA.

Lavado da cavidade peritoneal

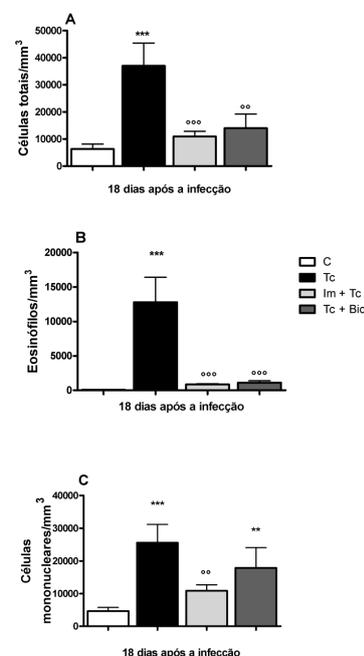


FIGURA 2: Contagem total e diferencial de leucócitos totais/mm³ (A), eosinófilos/mm³ (B) e células mononucleares/mm³ (C) no LCP, no 18º dia após a infecção. Os dados representam a média ±EPM (n = 5-7 animais). * p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo Tc quando comparado com o grupo C. ° p < 0,05 °° p < 0,01 °°° p < 0,001 representam a diferença significativa dos grupos Im+Tc e Tc+Bio quando comparados com o grupo Tc, usando o teste two-ANOVA.

(Tc+Bio). Foi observado nesses animais que, houve significativo aumento de células totais (1A), eosinófilos (1B) e células mononucleares (1C) nos animais do grupo Tc em relação ao grupo C. Observamos também diminuição significativa no número de células totais (1A), eosinófilos (1B) e células mononucleares (1C) nos grupos Im+Tc e Tc+Bio quando comparados somente ao grupo Tc.

Efeito do bioterápico no recrutamento de células inflamatórias para a cavidade peritoneal de animais infectados com T. canis

A figura 2 representa o perfil das células inflamatórias recuperadas do lavado da cavidade peritoneal (LCP) de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

Nossos dados mostram que houve significativo aumento de células totais (2A), de eosinófilos (2B) e de células mononucleares (2C) nos animais do grupo Tc quando comparados ao grupo C. A imunização com o bioterápico favoreceu diminuição significativa no número de células totais (2A) e eosinófilos (2B) nos animais dos grupos Im+Tc e Tc+Bio quando comparados ao grupo Tc. Os animais que receberam tratamento com o bioterápico apresentaram apenas diminuição no número de células totais (2A) e eosinófilos (2B), mas não foi observado diferença significativa no número de células mononucleares em relação ao grupo Tc (2C).

Efeito do bioterápico no recrutamento de células inflamatórias para espaço broncoalveolar (LBA) de animais infectados com T. canis

A figura 3 representa o perfil das células inflamatórias recuperadas do lavado broncoalveolar (LBA) de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Nesse compartimento, observou-se significativo aumento de células totais (3A), de eosinófilos (3B) e de células mononucleares (3C) nos animais do grupo infectado em relação aos animais do grupo controle. Observa-se também, diminuição significativa no número de células totais (3A), eosinófilos (3B) e células mononucleares (3C) nos grupos Im+Tc e Tc+Bio quando comparados ao grupo infectado no espaço alveolar desses animais.

DISCUSSÃO

A Síndrome da Larva Migrans Visceral (SLMV) é considerada uma infecção helmíntica de distribuição mundial, acometendo indivíduos em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. A infecção por *T. canis*, em diferentes organismos, promove uma reação inflamatória sistêmica, caracterizada por eosinofilia marcante e disseminada (Beaver *et al.*, 1952; Faccioli *et al.*, 1996; Anibal *et al.*, 2007).

A participação dos eosinófilos como células efetoras na destruição do parasito é dada principalmente pela ação tóxica de seus grânulos citoplasmáticos (Moqbel & Lacy, 1999), sendo esta função importante para danificar organismos não fagocitáveis, como por exemplo, os

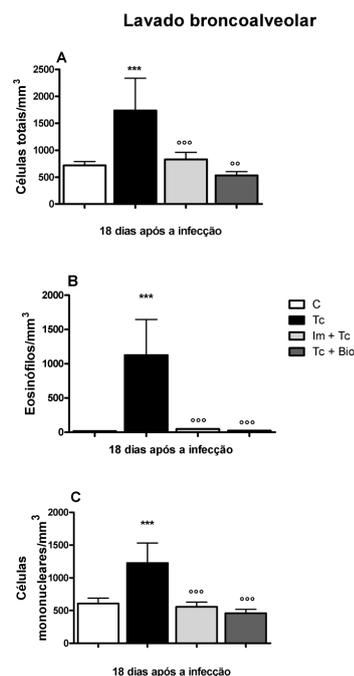


FIGURA 3: Contagem total e diferencial de leucócitos totais/mm³ (A), eosinófilos/mm³ (B) e células mononucleares/mm³ (C) no LBA, no 18º dia após a infecção. Os dados representam a média ±EPM (n = 5-7 animais). * p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo Tc quando comparado com o grupo C. ° p < 0,05 °° p < 0,01 °°° p < 0,001 representam a diferença significativa dos grupos Im+Tc e Tc+Bio quando comparados com o grupo Tc, usando o teste two-ANOVA.

helminthos em fase de migração tecidual (larvas) (Jacob, 2000). Uma grande variedade de distúrbios está associada com eosinofilia (Mendes *et al.*, 2000; Wardlaw, 1994), no entanto, em nosso meio, esse aumento encontra-se relacionado principalmente com as helmintíases intestinais, bem como, com os processos alérgicos e a asma. Neste contexto, a busca de novas terapias que possam minimizar estes sintomas torna-se importante.

A busca por alternativas menos convencionais no tratamento de doenças vem ganhando espaço na medicina contemporânea. E estudos onde há possibilidade de entendimento no âmbito da resposta do hospedeiro frente a patógenos parasitas vêm sendo uma linha de pesquisa de nosso grupo. Os primeiros relatos da utilização de bioterápicos ocorreram em 1676, sendo que nestes estudos, Robert Fludd preparou o bioterápico a partir do escarro tuberculoso visando o tratamento da tuberculose (Labre, 2001). Outros dados da literatura revelam poucos estudos que utilizaram bioterápicos feitos a partir de alguns causadores de doenças parasitárias: como o *Trypanosoma cruzi* (Ribero *et al.* 1983) e *Brucella melitensis* (Almeida, 1997). Berchieri e colaboradores utilizaram bioterápicos a partir da bactéria *Salmonella enteritidis*, a qual é responsável por infecções em aves e está também associada à salmonelose humana (Berchieri *et al.*, 2006). No entanto, não foram encontrados estudos que demonstrassem os

efeitos de bioterápicos durante infecções helmínticas, principalmente aquelas causadas por nematoides, como o *Toxocara canis*.

Outros estudos mostraram a importância de realizar novas investigações sobre a eficácia de bioterápicos preparados a partir de agentes infecciosos e agentes parasitários no processo de imunização, visto que alguns profissionais da saúde têm adequado algumas vacinas pelos mesmos (Neill, 1993). Visando essa compreensão, nosso modelo experimental, através da resposta imune celular pode contribuir com resposta ao tratamento com bioterápico a partir de ovos de *T. canis*, buscamos duas alternativas de estudo. A primeira em que animais receberam o bioterápico, sem previa infecção e é desafiado com o parasita, e a outra, em que animais após serem infectados recebem o bioterápico como opção de tratamento, buscando avaliar se esse tratamento favorece a modulação eosinofílica durante a infecção. Objetivando avaliar a resposta celular frente à migração das larvas de *T. canis*, nos diferentes compartimentos estudados, observando o recrutamento celular e classificando os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular contra a infecção, estudamos duas opções de uso para bioterápicos na SLMV. Nossos dados referentes ao número de células totais e células mononucleares demonstraram aumento destes tipos celulares, em animais infectados e sem tratamento/imunização, quando comparados a animais controles (figuras 1, 2 e 3), dados esses que corroboram que outros autores (Beaver *et al.*, 1952; Faccioli *et al.*, 1996; Anibal *et al.*, 2007).

Estudos recentes de nosso grupo demonstram que no 18º dia após infecção com *T. canis*, há um aumento significativo no número de células totais e células mononucleares no sangue, no espaço broncoalveolar e na cavidade peritoneal de animais infectados com *T. canis* (Oliveira *et al.*, 2013, Rodolpho *et al.*, 2013) e (Oliveira *et al.*, 2013, Rodolpho *et al.*, 2013). Carlos *et al.*, 2011 também observaram aumento de células mononucleares na cavidade peritoneal de animais infectado com *T. canis*, corroborando com nossos achados. Neste contexto, assim como Anibal, (2007), podemos sugerir que existem diferentes populações de células residentes ou recrutadas para o espaço broncoalveolar e para a cavidade peritoneal, além dos eosinófilos característicos dessa síndrome. Esse perfil celular diverso favorece eventos e proporcionam a liberação de diferentes mediadores envolvidos nesse recrutamento como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, como leucotrienos, pelas células presentes nesse processo. Assim, foi determinante para nosso estudo a avaliação do 18º dia após infecção em que ocorrem os principais eventos durante a resposta inflamatória induzida pelo *T. canis*.

O intenso processo inflamatório é característico de diversas patologias associadas às doenças parasitárias, como SLMV (Beaver *et al.*, 1952), esquistossomose mansônica (Cheever *et al.*, 2002), ascariíose (Rey, 2001) dentre outros. E a principal célula envolvida na

fisiopatogênese dessas doenças é o eosinófilo. A infecção por *T. canis*, em diferentes organismos, promove uma reação inflamatória sistêmica, caracterizada por intenso infiltrado de eosinófilos (Beaver *et al.*, 1952; Faccioli *et al.*, 1996; Anibal *et al.*, 2007), tendo estas células importante participação na destruição organismos não fagocitáveis, como por exemplo, os helmintos em fase de migração tecidual (Jacob, 2000). A busca por alternativas que possibilitem a modulação negativa do acúmulo de eosinófilos é de grande valia. Estudos demonstraram que o aumento significativo do número de eosinófilos, durante a SLMV, atinge seu pico no 18º dia após infecção (Faccioli *et al.*, 1996; Anibal *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013). Em nosso estudo, os dados referentes ao número de eosinófilos também demonstraram aumento deste tipo celular, em animais apenas infectados com *T. canis* nos diferentes compartimentos analisados (Figura 1B, 2B e 3B). Deste modo, nossos resultados corroboram com estudos, os quais demonstraram o aumento de eosinófilos durante a SLMV em diferentes modelos como cobaias (Faccioli *et al.*, 1996), camundongos de diferentes linhagens como C57BL/6 (Takamoto *et al.*, 1998) e Balb/c (Anibal *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013; Rodolpho, *et al.*, 2013).

A prévia estimulação do sistema imunológico muitas vezes favorece uma resposta mais rápida e adequada aos tratamentos de diferentes doenças. Por isso, nesse estudo foi importante avaliar além do tratamento pós infecção, os efeitos da imunização utilizando o bioterápico preparados a partir de ovos e larvas de *T. canis*, o que faz deste estudo inédito na literatura para terapia alternativa da SLMV. Em relação aos procedimentos relacionados à imunização e ao tratamento com o bioterápico, verificamos que houve uma redução significativa no número de eosinófilos no 18º dia após a infecção nos diferentes compartimentos, ou seja, sangue, LCP e LBA (figuras 1B, 2B e 3B). A migração de eosinófilos para os diferentes tecidos é dependente de uma gama de fatores, como moléculas de adesão, citocinas, leucotrienos, entre outros (Anibal *et al.*, 2007). Neste sentido, de acordo com os dados analisados, podemos sugerir que a administração do bioterápico promoveu efeito imunomodulador, associado à administração prévia e/ou tratamento com o bioterápico neste modelo. Ressaltamos, porém, que outras análises, como a quantificação de citocinas, devem ser realizadas para melhor compreender estes resultados. Dessa forma, sugerimos que o tratamento e a imunização com o bioterápico produzido a partir de ovos e larvas de *T. canis* parecem interferir na ativação da resposta celular em camundongos da linhagem Swiss, reduzindo significativamente o número de células inflamatórias no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal (Figuras 1, 2 e 3) nesse modelo experimental. No entanto, essa inibição ocorre por vias ainda não conhecidas. Dessa forma, este estudo sugere que o uso do bioterápico apresenta um efeito com ação imunomodulatória durante a Síndrome da Larva Migrans Visceral experimental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto pela doação dos vermes adultos do parasito *Toxocara canis*.

ABSTRACT

Biotherapeutic effect in eosinophilia during experimental VLMS

The *Toxocara canis* (Tc) is a parasite that belongs to the nematode phylum and has dogs as definitive host. The men can be accidentally contaminated by ingesting eggs containing infective larvae of the parasite. These larvae, when ingested, pass through the intestinal mucosa, reach the portal circulation and migrate through different tissues of the host. During this process, excretory-secretory antigens (TES) are released causing an intense inflammatory reaction, the Th2 type, characterizing the syndrome, called Visceral Larva migrans (VLMS). The main features of this chronic disease are blood and tissue eosinophilias. Thus, it is important to search for therapies that may contribute to the reduction of inflammatory conditions with intense eosinophilia. In this study, we investigated the use of a biotherapeutic produced from the antigenic extract from eggs and larvae (Tc) and its effect on the recruitment of total leukocyte, mononuclear cells and eosinophils in blood, bronchoalveolar space and peritoneal cavity of mice infected with (Tc). Female mice (Swiss) were used divided in three groups: control (C), Infected (Tc) Immunized (Im + Tc) and Treaty (Tc + Bio). The animals Tc, Im + Tc and Tc + Bio received 500 eggs / animal by gavage. Subsequently, the animals were euthanized on day 18 after infection and the number of cells in the compartments was determined. Our results showed that, Im + Tc, as in Tc + Bio had reduced these cells in compartments analyzed compared to Tc group. Thus, it was suggested that the biotherapy negatively modulated the recruitment of inflammatory cells, particularly eosinophils in blood, lung and intestine demonstrating an anti-inflammatory potential of the biotherapeutic in the experimental VLMS.

Keywords: Eosinophils. Biotherapeutic. VLMS. *Toxocara canis*.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Effector mechanisms of immune response. JN: - Cellular and molecular Immunology. Third edition, United States of America: W. B. Saunders Company, 1997.

Abe Jacob CM, Oselka GW. Toxocariase na infância. *Pediatria*. 1991;13:48-55.

Almeida CMC. Nosódios: Uma revisão crítica. 1997. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) - Instituto Hahnemanniano do Brasil, 1997.

Almeida RL, Campos MC, Herrera HM, Bonamin LV, Fonseca AH. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Homeopathy*. 2008;97(2):65-9.

Anibal FF, *et al*. Impact of MK886 on eosinophil counts and phenotypic features in toxocariasis. *Scand J Immunol*. 2007;65(4):344-52.

Altchek J, Nallar M, Conca M, Biancardi M, Freilij H. Toxocariasis: aspectos clínicos y de laboratorio em 54 pacientes. *Ana Pediatría*. 2003;58:425-31.

Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas. Manual de normas técnicas para farmácia homeopática. 3. ed. São Paulo; 2003.

Beaver P, Snyder H, Carrera G, Dent J, Lafferty J. Chronic eosinophilia due to visceral larvae migrans. *Pediatrics*, 1952;9(1):7-19.

Beaver PC. Nature of visceral larva migrans. *J Parasitol*. 1969;55(1):3-12.

Benjamini E, Coico R, Sunshine G. *Imunologia*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Berchieri A. *et al*. Evaluation of isopathic treatment of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Homeopathy*. 2006; 95:94-7.

Bethel RG. Arthritis and arthralgia associated with toxocaral infestation. *Br. Med J (Clin Res)*, 1988;283:729.

Brasil. Ministério da Saúde. Farmacopéia Homeopática Brasileira. 2 ed. Parte I, São Paulo: Atheneu Editora, 1997.

Brown HW. *Parasitologia Clínica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1977.

Bruart J, Remacle P, Henneghien C, Jonckheer J. Pleural effusion and *Toxocara canis*. *Rev Mal Resp*. 1987;4(1):35-7.

Buijs J, Borsboom G, Rentig M, Hilgersom WJA, Vanwueringen JC, Jansen G, *et al*. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: A cross-sectional study among elementary school children. *Eur Respir J*. 1997;10(7):1467-75.

César AT. *Dinamização. Cultura Homeopática*. 2003;5:25-41.

Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2002;97:917-40.

Chieffi PP. Síndrome de larva migrans visceral: aspectos biológicos e clínico epidemiológicos. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1987;20(Sup I):166-7.

Dao AH, Virmani RV. Visceral larva migrans involving the myocardium: report of two cases and review of literature. *Pathol Pediatr*. 1986;6(4):449-56.

- Carlos D, Machado ER, de Paula L, Sá-Nunes A, Sorgi CA, Jamur MC, Oliver C, Lima WT, Faccioli LH. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B4 production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(4):319-326.
- Despommier D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):265-72.
- Faccioli LH, *et al.* IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a Visceral Larva Migrants Syndrome. *Mediators Inflamm.* 1996;5(1):24-9.
- Figueiredo S, Taddei J, Menezes J, Novo N, Silva E, Cristóvão H, *et al.* Clinical-epidemiological study of toxocariasis in a pediatric population. *J Pediatr (Rio J).* 2005; 81(2):126-32.
- Fontes OL. Farmácia Homeopática: Teoria e Prática. 2 ed. São Paulo: Manole, 2005.
- Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev.* 1981;3:230-50.
- Gomes de Moraes, R. Parasitologia Médica. São Paulo: Atheneu; 1971.
- Hallack KA, Cunha RMC. Larva migrans visceralis. In: Veronesi R; Focaccia, R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996:1429-32.
- Kalkofen VP. Hookworms of dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract,* 1987;17:1341-54.
- Jacob CMA, Oselka GW. Toxocariase na infância. *Pediatrics (São Paulo).* 1991; 13(2):48-55.
- Jacob CMA. Síndrome da larva migrans visceral por *Toxocara canis* (Toxocariasis). In: Tonelli E, Freire LMS. Doenças infecciosas da infância e da adolescência. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2000:1421-31.
- Kayes SG. Spleen cell response in experimental murine toxocariasis. *J Parasitol.* 1984;70(4):522-9.
- Labre P. Homéopathie Vétérinaire chez les Ovins, Bovins et Caprins. Villeurbanne: Formation et Edition en Médecines Naturelles Vétérinaires; 2001. 280p.
- Machado AB, Achkar ME. Visceral larva migrans: case report. *An Bras Dermatol.* 2003;78(2):215-9.
- Magnaval J, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol.* 2001;39:1-11.
- Maizels RM, Savigny D, Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol.* 1984;6:23-37.
- Mendes DM, Camargo MF, Aun VV, Fernandes MFM, Aun WT, de Mello JF. Eosinofilia. *Rev Bras Alerg Immunopatol.* 2000;23:84-91.
- Moqbel R, Lacy P. Exocytotic events in eosinophils and mast cells. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:1017-22.
- Naveira JB. Aspectos da biologia dos eosinófilos. *Rev Bras Maraliolog Doenças Trop.* 1960;12:103-07.
- Neill H. Homeopathic nosodes. *Vet Record.* 1993;133(2):48.
- Neves DP. Parasitologia Humana. 11.ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.
- Oliveira SRP. Avaliação do efeito do extrato etanólico bruto de *Harpagophytum procumbens* em camundongos infectados com *Toxocara canis* [Dissertação – Mestrado] Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFSCar; 2013.
- Rayes AA, Lambertucci JR. The association of human toxocariasis and pyogenic abscesses. *Rev Soc Bras Med. Trop.* 1999;32(4):425-38.
- Rey L. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1991.
- Rey L. Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- Ribeiro RD. *et al.* Comportamento de tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, inoculados endovenosamente em camundongos normais e tratados com bioterápicos. *Rev Homeopatia.* 1983;157:14-18.
- Rodolpho JMA. Avaliação das moléculas Cd 80, CD 86 e MHCII em eosinófilos durante a Síndrome da larva migrans visceral [Dissertação – Mestrado] Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFSCar; 2013.
- Takamoto M, Isobe M, Sugane K. The role of ICAM/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4 interactions on T helper 2 cytokine production by lung T cell of *Toxocara canis* infected mice. *Immunology.* 1998;95:419-26.
- Wardlaw AJ, Symon FS, Walsh GM. Eosinophil adhesion in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 94(6 part 2):1163-72.

Recebido em 3 de março de 2013

Aceito em 3 de maio de 2013