

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITO DE VACINAS ALOPÁTICA E HOMEOPÁTICA FRENTE A
Mycobacterium spp EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS**

Marcos Antonio Rocha Cavalcanti
Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Paula Junqueira Kipnis

GOIÂNIA
2013



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Marcos Antonio Rocha Cavalcanti** E-mail: **marcoscavalcanti22@yahoo.com.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: **Instituto federal goiano- campus Urutaí** Agência de fomento: **CAPES**

País: **Brasil** UF: **BR** CNPJ: **10651417/0001-78** Sigla: **IFGoiano**

Título: **EFEITO DE VACINAS ALOPÁTICA E HOMEOPÁTICA FRENTE A Mycobacterium spp EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS** Palavras-chave: **alopatia, homeopatia, imunidade vacinal, vacina recombinante**

Título em outra língua: **EFFECT OF VACCINES AND HOMEOPATHIC Allopathic Mycobacterium spp FRONT IN DIFFERENT ANIMAL MODELS**

Palavras-chave em outra língua: **allopathy, homeopathy, immunity vaccine, recombinant vaccine**

Área de concentração: **Sanidade Animal e Tecnologia e Higiene de Alimentos** Data de defesa: (dd/mm/aaaa) **26/03/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Dinter**

Orientador(a): **Orientadora:**

Prof. Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis E-mail: **anapaula@iptsp.ufg.br**

Co-orientador(1): **Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes** E-mail: **romao@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **Prof. Dr. Cintia Silva Minafra e Rezende** E-mail: **cintia@cpa.vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

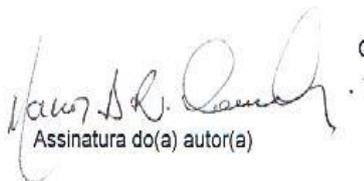
[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 23 de maio de 2013


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

MARCOS ANTONIO ROCHA CAVALCANTI

**EFEITO DE VACINAS ALOPÁTICA E HOMEOPÁTICA FRENTE A
Mycobacterium spp EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS**

Tese apresentada para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal junto
à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:
Sanidade Animal e Tecnologia e Higiene de Alimentos

Orientadora:
Prof. Dr. Ana Paula Junqueira Kipnis

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes
Prof.Dr.Cintia Silva Minafra e Rezende

GOIÂNIA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

C376e Cavalcanti, Marcos Antonio Rocha.
Efeito de vacinas alopática e homeopática frente a *Mycobacterium spp* em diferentes modelos animais [manuscrito] / Marcos Antonio Rocha Cavalcanti. - 2013.
72 f. : figs.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis;
Coorientadores: Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes, Profª.
Drª. Cintia Silva Minafra e Rezende.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.

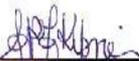
Bibliografia.

1. Bovino – Homeopatia – Vacina. 2. Bovino –
Imunização – Vacina. 3. Bovino – Vacina recombinante. I.
Título.

CDU: 636.2:615.371

MARCOS ANTÔNIO ROCHA CAVALCANTI

Tese defendida e aprovada em **26/03/2013** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior - IF Goiano - Campus Urutai



Profa. Dra. Michelle Guerreiro dos Reis – Faculdade Objetivo



Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti



Prof. Dr. Márcio Eduardo Pereira Martins - IF Goiano - Campus Urutai

Dedico à minha família: Eliane, Marcos
Júnior, Marcos Augusto, Karita, Matheus
e Fernanda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, da Universidade Federal de Goiás, por acreditar e viabilizar o Programa de Doutorado Interinstitucional UFG/IF Goiano (DINTER).

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade de realizar e concluir o Curso de Doutorado.

À minha orientadora, Ana Paula Junqueira Kipnis, que me recebeu em seu Laboratório.

Ao professor André Kipnis, pela ajuda e aprendizado.

À professora Maria Clorinda Soares Fioravanti e ao professor Romão da Cunha Nunes pelo apoio a homeopatia.

À minha amiga Monalisa Trentini, pela ajuda nos experimentos e produção dos protocolos.

Agradeço a minha família, que tanto me ensina e me inspira a continuar aprendendo e buscar a ser sempre melhor.

Aos meus amigos e colegas do doutorado pela ajuda, disposição em aprender e por tornarem o trabalho mais divertido.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia que ensinaram e compartilharam os bons e os maus momentos do meu Doutorado.

Aos Colegas do laboratório do professor André Kipnis, pela ajuda na microbiologia.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

... “Quanto mais palpável é uma verdade, mais tempo requer para conquistar o lugar a que tem direito. Os obstáculos, que se coloca em seu caminho, se devem a que essa verdade desencadeia ao seu redor um verdadeiro ódio. Pois, ela anuncia uma revolução, uma perturbação dos interesses existentes e dos lugares conquistados.”

Samuel Hahnemann

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	IX
Lista de figuras	X
Resumo geral	XI
Abstract	XII
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Micobactérias	2
1.3 Conceitos de homeopatia.....	4
1.4 Vacinas alopáticas	9
1.5 Justificativa.....	13
1.6 Objetivos	13
Referências	14
CAPÍTULO 2 – Diluições homeopáticas de <i>Mycobacterium massiliense</i> podem induzir uma resposta imune em camundongos BALB/c e reduzir a infecção	23
2.1 Introdução	25
2.2 Materiais e Métodos	26
2.2.1 Animais.....	26
2.2.2 <i>Mycobacterium massiliense</i>	27
2.2.3 Preparação da vacina homeopática bioterápica.....	27
2.2.4 Determinação da diluição de VBH a ser usada como vacina	27
2.2.5 Avaliação da eficácia do VHB	28
2.2.6 Obtenção de soro.....	29
2.2.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	29
2.3 Análise estatística	29
2.4 Resultados e Discussão	30
2.5 Conclusões.....	32
Referências	33
CAPÍTULO 3. Imuno genicidade de uma vacina composta por <i>Mycobacterium smegmatis</i> recombinante expressando a proteína de fusão CMX em bovinos do estado de Goiás, Brasil	37

3.1 Introdução	40
3.2 Materiais e métodos	42
3.2.1 Obtenção do <i>Mycobacterium smegmatis</i> recombinante.....	42
3.2.2 Animais e delineamento experimental.....	43
3.2.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	44
3.2.4 Citometria de Fluxo	44
3.2.5 Justificativa	45
3.2.6 Teste de tuberculinização intradérmica simples	45
3.2.7 Análise estatística	45
3.3 Resultados	46
3.3.1 Indução de anticorpos específicos contra a vacina após imunização com mc2 - CMX	46
3.3.2 Resposta inflamatória nos linfonodos cervicais e pré-escapulares	46
3.3.3 Teste intradérmico simples (PPD).....	47
3.4 Discussão.....	47
Referências	50
CAPÍTULO 04 – Considerações Finais	58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Unidades formadoras de colônia obtidas após o desafio dos camundongos BALB/c com <i>M. massiliense</i>	35
Figura 2. Avaliação da capacidade protetora das vacinas VBH 11cH e VBH 19cH.....	36
Figura 3. Níveis de anticorpos específicos para <i>M. massiliense</i> da classe IgG1(A) e IgG2a (B) nos camundongos BALB/c vacinados e desafiados com <i>M. massiliense</i> (10^7 UFC).	36

CAPÍTULO 3

Figura 1. Cinética dos níveis séricos de anticorpos anti- mc ² - CMX em bovinos imunizados com mc ² - CMX, mc ² e PBS.	55
Figura 2. Indução de IFN- γ por células TCD4 ⁺ . Bovinos foram revacinados 200 dias após a última imunização e os leucócitos sanguíneos foram estimulados <i>in vitro</i> com CMX.	56
Figura 3. Histopatológico do linfonodo pré- escapular de um bovino vacinado com a mc ² - CMX.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

UFC	Unidade Formadora de colônia
VBH	Vacina Bioterápica Homeopática
IFN-	Interferon-gama
IL	Interleucina
NK	Células <i>natural killer</i>
PNBCET	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da tuberculose
PPD	Derivado de proteína purificada de <i>Mycobacterium bovis</i>
TCD4	Linfócito T com marcador de superfície CD4
TCD8	Linfócito T com marcador de superfície CD8
TNF-	Fator de necrose tumoral-alfa
cH	Centesimal de Hahnemann

RESUMO GERAL

O desenvolvimento de novas vacinas no controle de várias doenças na bovinocultura vem incrementando a comercialização de animais e produtos de origem animal. Com isso testaram-se duas vacinas, uma vacina bioterápica homeopática e outra vacina alopática recombinante, utilizando micobactérias em suas formulações que posteriormente foram testadas em camundongos e bovinos. Com o objetivo de estudar o efeito profilático da vacina homeopática e a potência a ser utilizada como vacina, foi empregado um modelo de imunizações e infecções. Para tal, utilizou-se camundongos fêmeas da linhagem BALB/c as quais foram distribuídas em 15 grupos com três animais cada. Para avaliar os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos nas vacinações bioterápicas homeopáticas utilizou-se *Mycobacterium massiliense*. Os bioterápicos foram preparados a partir de micobactérias *M. massiliense*. Após as imunizações e infecções, os animais foram eutanaziados e deles colheram-se os fígados e baços, os quais foram macerados, homogeneizados, plaqueados e incubados a 37°C durante 5 dias. Em seguida, fez-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias recuperadas dos órgãos e de acordo com os resultados obtidos foram selecionadas as potências 11cH e 19cH para serem testadas como vacina, por apresentarem resultados mais homogêneos. Nos animais imunizados com 19 cH houve indução da produção de anticorpos da classe IgG2a específicos para *M. massiliense* semelhantes à (0,18 ± 0,07) infecção sozinha (0,19 ± 0,02). Para avaliar a proteção da vacina alopática, foi utilizada a micobactéria (*Mycobacterium smegmatis* mc²155 com PLA71/Fusão), em bovinos. Após as vacinações alopáticas foi coletado sangue e retirou-se o soro para o teste de ELISA. Animais que receberam a vacina viva recombinante expressando a proteína de fusão apresentaram níveis maiores de anticorpos específicos (p < 0,01). Com este estudo avaliou-se os efeitos da vacina bioterápica homeopática composta de *M. massiliense* e de vacina alopática formulada com *M. smegmatis* recombinante em diferentes modelos animais, concluindo assim que tanto as vacinas homeopáticas e vacinas alopáticas usando diferentes tipos de micobactérias podem induzir resposta imune humoral em modelo animal.

Palavras-chave: alopatia, homeopatia, imunidade vacinal, vacina recombinante.

ABSTRACT

The development of new vaccines in the control of various diseases in cattle has been increasing the marketing of animals and animal products. Thus we tested two vaccines, a biotherapy homeopathic vaccine and other recombinant allopathic vaccine, using mycobacteria in their formulations that were subsequently tested in mice and cattle. In order to study the prophylactic effect of homeopathic vaccine and the potency to be used as a vaccine, we used a model of immunizations and infections. To this end, we used mice female of BALB / c lineage which were distributed in 15 groups of three animals each. To assess the possible immune mechanisms involved in homeopathic biotherapy vaccinations we used *Mycobacterium massiliense*. The biotherapies were prepared from mycobacterial *M. massiliense*. After infections and immunizations, the animals were euthanized and their livers and spleens were harvested, macerated, homogenized, plated and incubated at 37 ° C for five days. Then we did the counting of colony forming units (CFU) of bacteria recovered from organs and according to the results obtained were selected the potencies 11cH and 19cH to be tested as vaccine, because they have shown more homogeneous results. In the animals that were immunized with 19 cH there were induction of IgG2a class antibodies specific to *M. massiliense* similar to (0.18 ± 0.07) infections alone (0.19 ± .02). To assess allopathic vaccine protection was used mycobacterium (*Mycobacterium smegmatis* mc²155 with PLA71/Fusion) in cattle. After allopathic vaccinations, blood was collected and serum was removed for ELISA test. Animals that received the recombinant live vaccine expressing protein of fusion showed greater levels of specific antibodies (p <0.01). This study evaluated the effect of homeopathic biotherapy vaccine composed of *M. massiliense* and allopathic vaccine formulated with *M. smegmatis* recombinant in different animal models, thus concluding that both vaccines and vaccines homeopathic and allopathic using different kinds of mycobacteria can induce humoral immune response in an animal model.

Keywords: allopathy, homeopathy, immunity vaccine, recombinant vaccine.

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

As iniciativas globais de vacinação vêm possibilitando a introdução de novas vacinas e salvando vidas de milhares de pessoas nos países mais pobres do mundo. A mais moderna tecnologia de biologia molecular aplicada na produção de vacinas é a denominada vacinologia reversa, desenvolvida nos últimos anos. É feito o sequenciamento do genoma do agente, a análise de suas proteínas, previstas pela bioinformática e com base nas características hidrofóbicas ou hidrofílicas, determinando-se a posição provável das proteínas dentro do microorganismo. Para melhorar o desempenho dessas vacinas vários microrganismos, como as micobactérias ambientais, vêm sendo testadas. Mesmo com essa tecnologia muitos fatores que interferem no bom desempenho da proteção contra várias doenças, ainda não foram elucidados o que indique a pesquisa de vacinas alternativas, como é caso da homeopatia, se faz necessária.

A homeopatia se estabeleceu na medicina veterinária, tanto para animais de estimação quanto para animais de produção em consequência das limitações do uso de substâncias farmacologicamente ativas em animais que produzem alimentos, especialmente no que diz respeito a resíduos de antibióticos. Embora o resultado com medicamento homeopático na veterinária tenha sido bastante satisfatório, ainda não existe evidência científica como os medicamentos homeopáticos curam ou protegem os animais, sendo este um dos temas que mais tem intrigado os homeopatas em todos os tempos.

Duas vertentes de pesquisas têm sido desenvolvidas para auxiliar na profilaxia de importantes enfermidades: na área da homeopatia o emprego de vacinas de bioterápicos; na área da alopatia, a produção de vacinas gênicas recombinantes. Ambas as vacinas que podem ser usadas para reduzir a carga global das doenças infecciosas. É o caso de algumas doenças como a tuberculose em humanos e em bovinos que ainda não têm vacina própria que possa produzir proteção duradoura. Também é importante salientar que em situações de grandes emergências, catástrofes climáticas que teve um surto de

leptospirose em Cuba, podem ser usadas as vacinas homeopáticas e alopáticas de forma concomitante, complementando suas ações.

1.2 Micobactérias

As micobactérias são bactérias não esporuladas ligeiramente curvas ou retas, entretanto formas bacilares ou filamentosas podem aparecer. A parede celular é composta por grande quantidade de lipídeos, aproximadamente de 40% do total. A estrutura da parede celular consiste de um esqueleto de peptidoglicano covalentemente ligado a cadeias de arabinogalactano esterificados na sua extremidade com ácido micólico; vários lipídeos e glicolipídeos podem estar associados à parede celular (PARISH & STOKER, 1998).

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*. O gênero *Mycobacterium* inclui o complexo *Mycobacterium tuberculosis*; o complexo *Mycobacterium avium*; outras micobactérias e numerosas espécies saprófitas presentes no solo e na água (BROSCH et al., 2002).

O complexo *M. tuberculosis* inclui *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedii*. O complexo *M. avium* inclui *M. avium subsp avium*, *M. avium subsp hominissuis*, *M. avium subsp. paratuberculosis* e *M. intracellulare*. Outras micobactérias de importância clínica são: *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans* e o *M. scrofulaceum*. (PRADO E CASTILHO, 2004).

No ano de 2012, na *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* do pesquisador J. P. Euzéby são citadas 154 espécies e 13 subespécies no gênero *Mycobacterium spp*, conforme o site www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html. Muitas espécies foram incluídas a partir do ano 2000. As últimas espécies incluídas foram: *M. paraffinicum* (TONEY et al., 2010); *Mycobacterium abscessus subsp abscessus*; *Mycobacterium abscessus subsp bolletii* (LEÃO et al., 2009) *Mycobacterium algericum* (SAHRAOUI et al., 2011); *Mycobacterium europaeum* (TORTOLI et al., 2010) e *Mycobacterium sherrisii* e *Mycobacterium orygis* (VAN INGEN et al., 2012). No grupo *chelonae-abscessus* foi identificada uma nova espécie de *Mycobacterium*

massiliense que se acreditase derivada de *M. abscessus* (ADÉKAMBI et al., 2004).

As micobactérias ambientais são conhecidas como micobactérias “atípicas” ou “micobactérias não tuberculosas” (MNT); são distintas dos agentes etiológicos responsáveis pela tuberculose e pela hanseníase (BARNES et al., 2004). A literatura refere que essas micobactérias são ambientais, mas patogênicas. Comumente, encontram-se no solo, lagos e água tratada, sendo capazes de infectar causando doenças pulmonares, infecções de ferida cirúrgica, doenças de pele e detecidos (BLANCO et al., 2002).

O genoma da micobactéria *M. massiliense* foi sequenciado (CCUG 4889) e foi demonstrado que o mesmo é diferente de outras micobactérias ambientais como é caso da *M. abscessus* (ATCC, 1997) e *M. chelonae* (ATCC 3575) (RAIOL et al., 2012). Um surto de infecções por *M. massiliense* aconteceu em Goiânia entre 2004 e 2007 e a patogenicidade desta bactéria foi testada em modelo animal. A infecção de camundongos por via endovenosa induziu a formação de granulomas, ativação de linfócitos específicos, assim como a produção de anticorpos específicos da classe IgG (SOUSA et al., 2010).

Micobactérias podem ser isoladas em seres humanos da saliva e da pele. Os componentes do grupo das micobactérias de crescimento rápido são muito resistentes a muitos antibióticos. Algumas são resistentes a desinfetantes e microbicidas clorados, mercuriais e a glutaraldeído (KATOCH, 2004; CARDOSO, et al., 2008).

Muitas propriedades das micobactérias como antigenicidade, propriedades adjuvantes, atividade anti-tumor e virulência são atribuídas aos componentes da parede celular. O complexo arabinogalactano-peptidoglicano é responsável pelas propriedades anti-tumor e adjuvantes. Muitos glicolipídeos (lipoarabinomanose) associados à parede celular são responsáveis pelos antígenos dominantes para células B. O fator corda (α - α -D trealose, 6-6 dimicolato), o qual as bactérias se arranjam em cadeias paralelas que é responsável pela virulência e também pode servir como adjuvante (McFADDEN, 1992).

A identificação de marcadores de seleção capazes de conferir resistência a antibióticos e o melhoramento das técnicas de transformação por eletroporação levaram ao uso em grande escala de micobactérias não

patogênicas como hospedeiros úteis, para o estudo da estrutura e fusão de genes micobacterianos. A espécie mais utilizada é o *Mycobacterium smegmatis*, pois é uma micobactéria saprófita, de crescimento rápido, é um importante modelo à biologia molecular de micobactérias, pois a manipulação genética de *M. tuberculosis* é bastante difícil (PARISH & STOKER, 1998).

1.3 Conceitos de homeopatia

A existência de um apelo mundial pela preservação ambiental, aliada a conscientização quanto à necessidade de uma alimentação saudável, impulsiona a busca por produtos de origem animal produzido em ambientes com a menor interferência de produtos químicos artificiais tais como: agrotóxicos, hormônios e antibióticos (BENEZ et al., 2004). Por exemplo, o uso indiscriminado de antibióticos pode afetar negativamente tanto a saúde animal, quanto a humana, assim como o ambiente (SARMAH et al., 2006), requerendo portanto o desenvolvimento de alternativas sustentáveis de produção de alimentos (SPENCER et al., 2005).

A palavra “homeopatia”, que significa tratamento pelos sintomas semelhantes, a “isoterapia” significa tratamento pelo igual ou mesma causa, independente de sua natureza orgânica ou inorgânica. O termo nosódio foi criado por Constantine Hering para designar medicamentos produzidos a partir de produtos patológicos animais e vegetais (KOSSAK-ROMANACH, 2003).

As diluições homeopáticas seguidas de dinamizações são referidas como potências que eram designadas por “c”, e que a letra maiúscula “C” não deveria ser usada, uma vez que o número romano C indica “100”. Assim, muitos prescritores antigos rotulavam suas potências 200c como “2C” (10). É atribuída a Hering a idéia de diluir as substâncias na razão de 1:10 e não mais de 1:100.

Em 1833, Hering começou a experimentar diluições na proporção de 1:10. No final da década, tanto Samuel Dubs, nos Estados Unidos, quanto Vehsemeyer, na Alemanha, começaram a produzir medicamentos nesta escala. As potências americanas foram indicadas por um ‘X’, o numeral romano para ‘10’, enquanto que as potências européias receberam a notação ‘D’ para decimal - 3X ou D3 (WINSTON, 1999).

Os nosódios e os isoterápicos foram incorporados ao conceito de “bioterápicos”, introduzido pela Farmacopeia Francesa (AMORIM et al., 2009). Os bioterápicos podem ser aplicados com função não só curativa como também preventiva, uma vez que se pode utilizar o agente etiológico de determinada doença que se pretende combater (SOARES, 1988).

A homeopatia é uma alternativa que vem sendo utilizada em animais desde o século XVIII (BENEZ, 2001). Trata-se de uma especialidade médica reconhecida pela Associação Médica Brasileira (AMB) e pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) (TEIXEIRA et al., 2004).

Os bioterápicos ou nosódios são produtos que servem de matéria-prima para as preparações dinamizadas. Esses produtos podem ser: secreções, excreções patológicas ou não, produtos de origem microbiana entre outros (ROSSI et al., 2004).

Homeopatia (do gregotransliterado *hómoios* + *páthos* = "semelhante" + "doença") é um termo criado por Christian Friedrich Samuel Hahnemann (1755-1843) e se baseia no princípio *similia similibus curantur* (semelhante pelo semelhante se cura), ou seja, o tratamento se dá a partir da diluição e dinamização da mesma substância que produz o sintoma num indivíduo saudável. A lei dos semelhantes, segundo a qual a moléstia poderia ser extinta pela aplicação de “coisas” suas semelhantes, tal qual o descrito no tratado *Da Doença Sagrada*: "A maior parte das enfermidades são curáveis pelo mesmo que as produz, porque o que para uma coisa é alimento, é corrupção para a outra" (HIPÓCRATES, 1992).

As ultradiluições são conhecidas como *ultra high dilution* (UHD), se apresentam entre as bases da terapêutica homeopática. A partir de potências equivalentes a 12 diluições seriadas centesimais, aproximadamente, não há mais presença de moléculas da substância original, pois o número de Avogadro foi ultrapassado. Contudo, várias são as evidências de que tais diluições continuem a exercer efeitos biológicos em sistemas vivos (WYNN, 1998).

Samuel Hahnemann usando as ultradiluições experimentou algumas substâncias que eram usadas como medicamentos naquela época (1796) e observou os efeitos que elas produziam no seu próprio organismo. Posteriormente essa experimentação estendeu-se para outros indivíduos sadios,

de modo que a experimentação tornou-se um dos fundamentos do conhecimento homeopático (PASCHOAL, 2005).

Hahnemann aplicou princípios éticos e humanísticos ao elaborar uma prática médica que visava estimular as forças curativas do organismo sem os efeitos nefastos das altas doses dos medicamentos (TEIXEIRA, 2007).

A utilização de medicamentos homeopáticos na Medicina Veterinária teve início com o próprio Hahnemann que, ao curar seu cavalo de uma oftalmia utilizando *Natrum muriaticum*, (sal comum) se manifestou dizendo: “Se as leis que proclamo são as da natureza, elas serão válidas para todos os seres vivos”. Deu-se início então a homeopatia veterinária (BENEZ, 2001; DIAS, 2001).

Segundo a Associação brasileira de farmacêuticos homeopatas (ABFH, 2007), os bioterápicos de estoque são obtidos a partir de secreções, excreções patológicas ou não, produtos de origem microbiana, soros e vacinas, sendo assim classificados:

- a) Bioterápicos “Codex”: obtidos a partir de soros, vacinas, toxinas ou anatoxinas, inscritos na Farmacopeia Francesa e preparados por laboratórios especializados. Como exemplo, tem-se o medicamento *influenzinum*, obtido a partir da vacina antigripal do Instituto Pasteur;
- b) Bioterápicos simples: obtidos de “vacinas estoques”, constituídas por culturas microbianas puras, lisadas e atenuadas em condições determinadas;
- c) Bioterápicos complexos: são definidos pelo seu modo de obtenção (secreções ou excreções patológicas) ou seu modo de preparação. Por exemplo, o *luensinum* que se trata do lisado de serosidades treponêmicas de cancrs sífilíticos, preparados sem adição de anti-sépticos;
- d) Bioterápicos ingleses: são, também, conhecidos por nosódios intestinais de Bach-Paterson;
- e) Bioterápicos preparados a partir de microorganismos vivos são preparados com microorganismos vivos, na escala decimal, usando como diluente o cloreto de sódio a 0,9%.

Os bioterápicos são considerados medicamentos homeopáticos por serem preparados de acordo com a farmacotécnica, sofrendo diluições e dinamizações (ALMEIDA et al., 2008).

O bioterápico mais estudado é o *Secalecornutum*, bioterápico vegetal, oriundo do centeio espigado que é parasitado por micélios de *Claviceps purpúrea*.

Este vegetal tem como, principais alcaloides a ergotina e a ergotoxina. Desta forma, é muito utilizado, como isoterápico, em indivíduos saturados pelo abuso de derivados ergotínicos; sua indicação também pode ser baseada na lei dos semelhantes, uma vez que este bioterápico foi submetido à experimentação e possui patogenesia (KOSSAK-ROMANACH, 2003).

Na França, em 1820, um veterinário homeopata utilizou um bioterápico da bactéria *Burkholderia mallei* a partir da secreção nasal de um equino portador de mormo, utilizando no tratamento de um equino doente com mormo empregando o bioterápico na diluição de 30cH, obtendo a cura desse animal (LABRE, 2001).

Em 1960, Julian, um médico homeopata francês, tornou-se um grande difusor da nosodiaterapia e escreveu a “Matéria Médica de Nosódios” na qual relatou a patogenesia de *Streptococcinum*, *Staphylococcinum* mais de 45 bioterápicos microbianos (ALMEIDA, 1997).

O uso do nosódio *Meningococcinum* (lisado de culturas de *Neisseria meningitidis* A e C, inativado pelo calor) como preventivo contra a meningite meningocócica e concluíram que o *Meningococcinum*10cH foi capaz de aumentar, significativamente, a resistência à meningite meningocócica nos indivíduos tratados. Este medicamento foi ministrado a 18.640 crianças, enquanto 6.340 crianças não o receberam. Somente quatro casos de meningite foram registrados no grupo de crianças tratadas enquanto 34 casos de meningite foram registrados no grupo que não recebeu o tratamento. Esses autores sugeriram ainda a repetição deste experimento com potências maiores, como a 30cH (CASTRO et al., 1975; SCHEPPER, 2001).

SCHEPPER (2001) descreveu em seu livro que Dr. T. A. McCann, de Ohio, na 77ª Convenção Nacional do Instituto de Homeopatia de Washington, em 1921, informou que, 24.000 casos de influenza que foram tratados alopaticamente e tiveram uma taxa de mortalidade de 28,2%, enquanto em 26.000 casos, tratados com homeopatia, a taxa de mortalidade foi de 1,05%. Estes e outros resultados clínicos têm sido relatados mostrando o sucesso da homeopatia no tratamento da gripe, sem evolução para pneumonia e baixos índices de mortalidade.

Foi estudado o comportamento de tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, inoculados endovenosamente em camundongos normais e tratados com

bioterápicos e, concluíram que, quando os animais são tratados com o mesmo bioterápico na potência de 30DH, as formas delgadas, inoculadas por via venosa, são precocemente destruídas, enquanto as largas são mais resistentes e permanecem na corrente circulatória por determinado tempo, sendo depois destruídas (RIBEIRO et al., 1983).

Tratando camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* com bioterápico preparado com o referido agente etiológico, observaram que os animais tratados apresentam redução da parasitemia, assim como maior tempo de sobrevivência, em relação ao grupo controle. Após o tratamento dos animais infectados, o xenodiagnóstico e a hemocultura revelaram resultados negativos (NASI et al., 1982).

Estes resultados foram confirmados quando os animais infectados experimentalmente, apresentaram resposta imune humoral com altos títulos de IgG (QUEIROZ, et al., 2006).

Alterando as diluições centesimais para *T. cruzi* 12DH e associando-se ao *phosphorus* 12 DH foi observado que o bioterápico modulou o sistema imune principalmente durante a fase aguda da infecção e o *phosphorus* diminuiu a patogenicidade do protozoário (ALMEIDA, 2008).

BERCHIERI et al. (2006) mostraram que um bioterápico produzido a partir da bactéria *Salmonella enteritidis*, responsável por infecções tanto em aves quanto associada na salmonelose humana, na potência de 200cH, foi capaz de reduzir a excreção de *Salmonella enteritidis* pelas aves o que levou a menor contaminação dos ovos.

BUFFA & AUBAGNA (1995) propuseram o emprego de bioterápico no tratamento de ceratoconjuntivite infecciosa bovina. Para a produção do bioterápico foi obtida a secreção ocular de animais que apresentavam sintomatologia clínica da doença, e após o tratamento foi observado que a metade dos animais tratados com bioterápico apresentou melhora do quadro clínico com recuperação total das estruturas oculares afetadas, sem recidivas.

Foi utilizado um bioterápico de *Mycoplasma spp* 30cH em um rebanho bovino com produção de leite orgânico que apresentava problemas reprodutivos e surtos esporádicos de quadros respiratórios. O medicamento foi administrado na quantidade de 10 gotas por animal na água de beber, diariamente, durante seis meses. Após uma semana do início do tratamento houve incremento da atividade

reprodutiva com aumento das inseminações artificiais e diminuição gradativa dos sintomas respiratórios (SILVA et al., 2005).

Para o controle de ectoparasitas foi utilizado em vacas leiteiras bioterápicos de carrapatos nas diluições 12cH e 30cH. Neste estudo observou-se, interferência significativa no ciclo de vida dos carrapatos coletados dos animais testados. Os testes *in vitro* apresentaram redução da massa corporal das fêmeas ingurgitadas, redução da oviposição e ovos para incubação e conseqüentemente baixa na eficiência reprodutiva desses parasitas (GAZIM et al., 2010).

1.4 Vacinas alopáticas

A variolização foi introduzida na Europa no século XVIII, para combater a varíola essa técnica difundiu-se rapidamente e teve defensores em vários países. A variolização consistia em retirar materiais das pústulas de pessoas enfermas e inoculavam na pele de um indivíduo são (DINC& ULMAN, 2007).

Edward Jenner em 1796 com a vacina contra varíola deu início a imunologia como ciência. Sem dúvida que os pioneiros da técnica de inoculação contribuíram para o conhecimento sobre as doenças infecciosas (HUYGEN, 1998).

A vacinação é a medida mais eficiente e menos dispendiosa para evitar doenças infecciosas. Apesar dos grandes benefícios das vacinas existentes, há ainda muitas doenças para as quais não existem vacinas. Com o ressurgimento da tuberculose, principalmente nos países em desenvolvimento, diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas. As vacinas de primeira geração foram o artigo de homeopatia produzido com microrganismos vivos ou atenuado, como a vacina BCG contra a tuberculose, ou mortas e inativadas como a vacina contra a *Bordetella pertussis* (BLOOM, 1989).

As vacinas desenvolvidas contra *Leishmania* empregavam produtos dos parasitas mortos que eram chamadas de vacinas de primeira geração. Estas vacinas foram testadas no homem e em cães na América do Sul e no Sudão. Elas induzem uma baixa proteção, aproximadamente 54% (PALATNIK-de-SOUSA, 2008).

Em 2006, procedeu-se, em Portugal, à substituição da vacina contra a *Bordetella pertussis* do tipo célula inteira por uma vacina de toxóide, que é produzida a partir de toxinas de bactérias, geralmente são exotoxinas que podem ser enfraquecidas ou suprimidas por produtos químicos como a formalina ou tratamento de calor, mantendo as propriedades imunogênicas (VIEIRA, et al., 2010).

A vacina DTP (difteria, tétano e pertussis) pode ser tóxica, devido ao componente pertussis presente em sua formulação. O Instituto Butantã produz e administra sua vacina DTP com sucesso há mais de 20 anos; mas sugere outras linhas de pesquisa como remover o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano responsável pela toxicidade, como inovação no processo de produção da vacina tradicional (HIGASHI et al., 2009).

A segunda geração de vacinas é constituída de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais ou sintéticas, e antígenos recombinantes (RODRIGUES JR, 2004). Neste caso, as características bioquímicas dos antígenos sintéticos ou purificados influenciam diretamente o tipo de resposta desenvolvido pela vacina. Por exemplo, STANBERRY (1991) demonstrou a importância da glicosilação das proteínas na formulação de vacinas. Nesta época foi demonstrado que o número de doses e a quantidade de proteína também alterariam o perfil da resposta imune obtida, assim como a necessidade de um adjuvante.

As terceiras gerações de vacina surgiram com a introdução de genes ou fragmentos de genes, que codificam antígenos potencialmente imunogênicos, em vetores virais ou em DNA plasmidial. As vacinas de DNA tiveram sua primeira utilização na década de 1950, quando se demonstrou que a injeção direta de DNA induzia forte resposta imune (WIKER et al., 1999).

Desenvolvimento de BCG recombinante (rBCG) baseia-se em vacinas de expressão dos principais antígenos protetores de *M. tuberculosis* já comprovada, essa abordagem promissora para melhorar o desempenho do BCG (WILKER et al., 2006). Linhagens recombinantes BCG podem ser projetadas para expressar antígenos ou fragmentos específicos, como Ag85B e complexo Ag85 complexas, uma família de proteínas 30-32 kDa (Ag85A, Ag85B e Ag85C), (MURRAY et al., 1996).

As vacinas de DNA representam uma alternativa arriscada, pois elas são construídas para codificar vários antígenos, os quais são selecionados para que não interfiram nas provas de sensibilidade cutânea. Esta seleção do antígeno usado nas vacinas de DNA está limitada pela imunogênicidade da proteína que será expressa (HUYGEN, 1998).

De maneira geral, as formulações vacinais contendo DNA são utilizadas para estimular respostas imunológicas celulares a antígenos protéicos. A injeção direta de material genético em um hospedeiro vivo faz com que uma pequena quantidade de suas células passe a produzir os produtos dos genes introduzidos. Esta expressão do gene dentro do hospedeiro tem importantes consequências imunológicas, resultando na ativação imune específica do hospedeiro contra o antígeno gene (KOPROWSKI & WEINER, 1998). A avaliação da vacina de DNA em ensaios clínicos mostrou que estas vacinas foram bem toleradas e seguras, mas a sua imunogenicidade foi inesperadamente mais baixa do que nos modelos pré-clínicos. Nos últimos anos, o progresso no aumento da eficácia da vacinação de DNA em humanos tem sido conseguido principalmente graças à melhoria dos métodos de entrega física, com electroporação muscular e bombardeamento de partículas da pele sendo atualmente predominante (STEVENSON & OTTENSMEIER, 2010).

SILVA et al. (2009) testando uma vacina de subunidade obtiveram resultados indicaram que a vacinação com subunidade protéica MPT-51/CpG oferece proteção contra a tuberculose (TB) num modelo murino de infecção. Esta observação que faz ser o antígeno MPT-51 um componente valioso para avaliar o desenvolvimento de outras vacinas para tuberculose.

Vetores vivos, como as vacinas recombinantes de *M. tuberculosis*, são candidatos à vacina e têm mostrado boa proteção em modelos animais (MOLLENKOPF et al., 2001). Entretanto, estes tipos de vacinas poderiam provocar resposta imune contra o vetor, limitando o número de vacinações (MCSHANE et al., 2004).

O *Mycobacterium smegmatis* é classificado como uma espécie saprófita que raramente causa a doença e não necessita viver em um animal. As micobactérias têm aparências enrugadas e formam um creme branco enquanto está crescendo em nutrientes acessíveis, sendo visto como lisa, plana, brilhante ou grosseiramente dobrada ou ainda finamente enrugada. Vive em camadas

agregadas de células ligadas uma a outra em uma comunidade chamada biofilme. (BROWN-ELLIOTT & WALLACE JR., 2002).

O isolamento de uma linhagem mutante de *M. smegmatis* mc²155, que apresenta alta eficiência de transformação, revolucionou a genética de micobactérias. A eficiência de transformação da *M. smegmatis* é baixa em comparação a outros hospedeiros, como a *E. coli*. (SNAPPER et al., 1990).

Essa linhagem, denominada *M. smegmatis* mc²155, além de exibir alta eficiência de transformação, não possui um sistema de restrição capaz de degradar DNAs exógenos, tendo se transformado no principal modelo experimental para a biologia molecular de micobactérias (KANA & MIZRAHI, 2004).

Porém, a estimulação da resposta imune eficaz contra determinado antígeno, depende da presença deste em quantidades suficientes e em uma forma que possa ser facilmente reconhecido pelo sistema imune. Nesse contexto, bactérias geneticamente modificadas representam uma alternativa promissora para a entrega de peptídeos vacinais (BERMUDEZ-HUMARAN et al., 2003).

Várias cepas bacterianas estão sendo utilizadas como vetores recombinantes, como *Mycobacterium bovis* BCG (STOVER et al., 1991); *Escherichia coli* (FORMAL et al., 1984); *Salmonella typhi* e *Salmonella typhimurium* (GERMANIER & FURER, 1995). No caso dos vetores bacterianos o gene heterólogo é inserido em um vetor plasmidial contendo um marcador de seleção e introduzido na bactéria pela técnica de transformação. Este irá se replicar de forma autônoma ou irá se integrar no genoma bacteriano (LUGOSI et al., 1989).

A proteína de fusão recombinante (CMX), contendo epitopos imunodominantes do Ag85C, MPT51 e proteínas HspX de *M. tuberculosis*, quando utilizada como uma vacina de subunidade em camundongos BALB/c, demonstrou ser imunogênica, pois os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a estavam mais elevados no grupo de camundongos vacinados, além disso o antígeno CMX foi capaz de ser reconhecido pela resposta humoral de pacientes com tuberculose ativa (SOUSA et al., 2012).

1.5 Justificativa

A homeopatia se estabeleceu na medicina veterinária, tanto para animais de estimação quanto para animais de produção em consequência das limitações do uso de substâncias farmacologicamente ativas em animais que produzem alimentos, especialmente no que diz respeito a resíduos de antibióticos. Embora o resultado com medicamento homeopático na veterinária tenha sido bastante satisfatório, ainda não existe evidência científica como os medicamentos homeopáticos curam ou protegem os animais, sendo este um dos temas que mais tem intrigado os homeopatas em todos os tempos.

Duas vertentes de pesquisas têm sido desenvolvidas para auxiliar na profilaxia de importantes enfermidades: na área da homeopatia o emprego de vacinas de bioterápicos; na área da alopatia, a produção de vacinas gênicas recombinantes. Ambas as vacinas que podem ser usadas para reduzir a carga global das doenças infecciosas. É o caso de algumas doenças como a tuberculose em humanos e em bovinos que ainda não têm vacina própria que possa produzir proteção duradoura. Também é importante salientar que em situações de grandes emergências, catástrofes climáticas como aconteceram nas enchentes em Cuba, podem ser usadas de forma concomitante, complementando suas ações.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

Com este estudo objetivou-se avaliar os efeitos da vacina bioterápica homeopática composta de *M. massiliense* e de vacina alopática formulada com *M. smegmatis* recombinante em bovinos.

1.6.2 Objetivos específicos

Verificar a capacidade de indução de resposta imune humoral específica contra *M. massiliense* nos camundongos vacinados com o bioterápico.

Averiguar a imunogênicidade e virulência da vacina recombinante *M. smegmatis* expressando a proteína CMX (Ag85C, MPT51, HspX) em bovinos.

Referências

1. ADÉKAMBI, T.; REYNAUD-GAUBERT, M.; GREUB,G.; GEVAUDAN, M. J.; SCOLA,B.La.;RAOULT,D.;DRANCOURT, M. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoicpneumonia, **Journal de Clinical Microbiology**, Washington, v.42 p.5493-5501, 2004.
2. ALMEIDA, C. M. C. **Nosódios: uma revisão crítica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Homeopatia) – Instituto Hahnemanniano do Brasil, Ribeirão Preto, 43 p., 1997.
3. ALMEIDA, L. R. LISBÔA, R.S.; VIANA, E.B.; MADUREIRA, R.C.,RANGEL, C. P.; FONSECA, A. H.; CUNHA, N.C. Parâmetros biológicos de fêmeas adultas *Amblyomma cajennense* alimentadas em coelhos tratados com bioterápico ultradiluído. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.33, 2008.
4. ALMEIDA, R. L.; CAMPOS, M. C.; HERRERA, H. M.; BONAMIN, L. V.; DA FONSECA, A. H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, Philadelphia, v. 97, n. 2, p. 65-69, 2008.
5. AMORIM, V. O.; FONTES, O. L. Bioterápicos. In: FONTES, O. L. **Farmácia Homeopática: teoria e prática**. 3. ed. Manole, São Paulo, p. 211-234, 2009.
6. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FARMACÊUTICOS HOMEOPATAS (ABFH). **Manual de normas técnicas para farmácia homeopática**: ampliação dos aspectos técnicos e práticos das preparações homeopáticas. 4. ed. Curitiba: ABFH, p. 90, 2007.
7. BARNES, A. I.; ROJO, S.; MORETTO, H. Prevalencia de micobacteriosis y de tuberculosis en pacientes de un hospital de referencia de la província de Córdoba. **Revista Argentina de Microbiologia**, Córdoba, v. 36, n.4, p. 170-3, 2004.

8. BENEZ, S. M. **Homeopatia 100 segredo**: aos que se trata por esta alternativa. 2. ed. São Paulo: Robe, p.177, 2001.
9. BENEZ, S. M.; JACOBS, P. H.; CAIRO, N. **Manual de homeopatia veterinária**, Ribeirão Preto, p.173, 2004.
10. BERCHIERI, A.; TURCO, W. C. P.; PAIVA, J. B.; OLIVEIRA, G. H.; STERZO, E.V. Evaluation of isopathic treatment of *Salmonella enteritidis* in poultry. **Homeopathy**, Philadelphia, v. 95, n. 2, p. 94-97, 2006.
11. BERMUDEZ-HUMARAN, L. G.; LANGELLA, P.; CORTEZ-PEREZ, N.; GRUSS, A.; TAMEZ-GUERRA, R. S.; OLIVEIRA, S. C.; SAUCEDA-CARDENAS, O.; MONTES DE OCA-LUNA, R.; LE LOIR, Y. Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine Interleukine-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production, **Infection and Immunity**, Washington, n. 71, p.1887-1896, 2003.
12. BLANCO, R. M.; INUMARU, V. T. G.; MARTINS, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n.2, p. 91-6, 2002.
13. BLOOM, B. R. New approaches to vaccine development. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.11, p. 460-466, 1989.
14. BROSCHE, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 99, p. 3684-3689, 2002.
15. BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE, R.J. Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.15, p. 716-46, 2002.

16. BUFFA, J. A.; AUBAGNA, M. D. Eficácia de los autosodes en el tratamiento de la Queratoconjuntivis infecciosa bovina. **Revista Homeopática**, São Paulo, v. 29, p. 25-27, 1995.

17. CARDOSO, A. M.; DE SOUSA, E. M.; VIANA-NIERO, C.; BORTOLI, F. B.; NEVES, Z. C. P.; LEÃO, S.C.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**, Paris, v.10, p. 1552-1557, 2008.

18. CASTRO, D. Uso do Nosódio *meningococcinum* como preventivo contra a meningite meningocócica. **Simília**, São Paulo, v. 16, n. 25, 1975.

19. DIAS, F. A. **Fundamentos da homeopatia**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p.588, 2001.

20. DINC, G.; ULMAN, Y. I. The introduction of variolation "A LA Turca" to the west by Lady Mary Montagu and turkey's contribution to this. **Vaccine**, Kidlington, v. 25, n. 21, p. 4261-4265, 2007.

21. FORMAL, S. B.; HALE, T. L.; KAPFER, C.; COGAN, J. P.; SNOY, P. J.; CHUNG, R.; WINGFIELD, M. E.; ELISBERG, B. L.; BARON, L. S. Oral vaccination of monkeys with an invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid expressing *Shigella-Flexneri* 2A somatic antigen. **Infection and Immunity**, Washington, v. 46, p. 465-469, 1984.

22. GAZIM, Z. C.; FERREIRA, F.B.P.; DA SILVA, A. V.; BOLOGNESE, K. C.; MERLIN, E.; MESSA, V.; DE JESUS, R.A.; COUTINHO, C. A.; DA SILVA, L. C. M. Efficiency of tick biotherapeutic on the control of infestation by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Dutch dairy cows. **International Journal of High Dilution Research**, West Bengal, v. 9, n. 33, p.156-164, 2010.

23. GERMANIER, R.; FURER, E. Isolation and characterization of Gal-e mutant Ty 21A of Salmonella-Typhi - Candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. **Journal of Infectious Diseases**. v.131, p. 553-558, 1995.

24. HIGASHI, H. G. ; LUNA, E. ; PRECIOSO, A. R. ; VILELA, M.M. ; KUBRUSKY, F.; DIAS, W. ; RAW, I. Acellular and "LOW" Pertussis Vaccines: adverse events and role of mutations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 51, p. 131-134, 2009.

25. HIPPOCRATES [Hipócrates] 1992. *The Sacred Disease*. With an english translation by W. H. S. Jones. Cambridge: Harvard University Press.

26. HUYGEN, K. DNA Vaccines: Application to tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 2, n.12, p. 971-978, 1998.

27. KANA, B. D.; MIZRAHI, V. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* in relation to the discovery of novel drugs and vaccines. **Tuberculosis**, v.13, n.84, p. 63- 75, 2004.

28. KATOCH, V. M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian Journal Medical Research**, Tajganj. v. 4, n. 120, p.290-304, 2004.

29. KOPROWSKI, H.; WEINER, D. B. A vacinação DNA/Vacinação genética. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Sheidelberg, v. 226, p.5-13, 1998.

30. KOSSAK-ROMANACH, A. Isoterapia. In: **Homeopatia em 1.000 conceitos**. São Paulo: Elcid, p. 399-407, 2003.

31. LABRE, P. **Homeopathie veterinaire chez les ovins, bovins et caprins**. Villeurbanne: Formation et Edition en Médecines Naturelles Veterinaires, 280 p., 2001.

LEÃO, S. C.; DUARTE, R. S. M. C. S.; LOURENÇO, M. C. S. L. DE S.; FONSECA, L. DE S.; AMORIM, E. DE L. T.; ROCHA I. L. L.; COELHO, F. S.; VIANA-NIERO, C. K. M.; GOMES, K. M.; DA SILVA, M. G. O.; LORENA, N. S. DE O, PITOMBO, M. B.; FERREIRA, R. M. C. M. H. DE O. ; GARCIA, M. H. DE O.; OLIVEIRA, G. P. DE.; LUPI, O.; VILAÇA, B. R.; SERRADAS, L. R.; CHEBABO, A.; MARQUES, E. A.; TEIXEIRA, L. M.; DALCOLMO, M.; SENNA, S. G. AND SAMPAIO J. L. M. Characterization of *Mycobacterium* from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* group is needed. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.47, n.9, p. 2691-2698, 2009.

32. LUGOSI, L.; JACOBS, W. R.; BLOOM, B. R. Genetic-transformation of BCG. **Tubercle**, Edinburgh, v. 70, n.3, p.159-170, 1989.

33. McFADDEN, J. Mycobacteria. In: **Encyclopedia of microbiology**, London, v. 3, p. 203-215, 1992.

34. MCSHANE, H.; PATHAN, A. A.; SANDER, C. R.; KEATING, S. M.; GILBERT, S. C. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boost BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. **Nature Medicine**, New York, v.10, n.11, p. 1240-1244, 2004.

35. MOLLENKOPF, H.; DIETRICH, G. and KAUFMANN, S. H. E. Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. **The Journal of Biologic Chemistry**, Padua, v.4, n.382, p.521-532, 2001.

36. MURRAY, P. J.; ALDOVINI, A.; YOUNG, R. A. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guérin strains that secrete cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences** Washington, v. 3, n. 93, p. 934-939, 1996.

37. NASI, A. M. T. T.; RIBEIRO, R. A. Emploi de biotherapie dans Le traitement soureis infectees par *trypanosoma cruzi* resultants preliminares. **Annales Homeopathiques**. Françaises, v.24, n.3, p.53-64, 1982.

38. PALATNIK-de-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, Kidlington, v.14, p.1709-1724, 2008.

39. PARISH, T.; STOKER, N. G. Eletrosporation of mycobacteria. IN: PARIH, T. STOKER, N. G (Eds) **Methods in Molecular Biology Mycobacteria protocols**, Humana Press., Totowa. v.101, p. 472, 1998.

40. PASCHOAL, R. T. 2005. 148f. **Unicismo versus Pluralismo**: a questão da prescrição de mais de um medicamento em homeopatia (Tese de Doutorado em Medicina). Universidade Estadual do Rio de Janeiro, RJ.

41. PRADO, A.C.; CASTILHO, P.F. Lay clinics and an epidemic outbreak of mycobacterium skin and soft tissue infection. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.113, p.800-801 2004.

42. RAIOL, T.; RIBEIRO, G. M.; MARANHÃO, A. Q.; BOCCA, A. L.; SILVA-PEREIRA, I.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P; BRIGIDO, M. M.; KIPNIS, A. Complete Genome of *Mycobacterium massiliense* **Journal of Bacteriology**, Washington, v.194, n.19, p. 5455, 2012.

43. RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; NASI, A. M. T. T. Comportamento de tripomastigotassanguinolas do *Trypanosoma cruzi*, inoculados endovenosamente em camundongos normais e tratados com bioterápicos. **Revista de Homeopatia**, Rio de Janeiro v. 1, n. 157, p. 14-18, 1983.

44. ROSSI, F.; AMBROSANO, E. J.; MELO, P.C.T.; GUIRADO, N.; MENDES, P. C. D.; BRÉFERE, F. A. T. Emprego da homeopatia no controle de doenças de plantas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.30, n.1, p.156-158, 2004.

45. SAHRAOUI, N.; BALLIF, M.; ZELLEG, S.; YOUSFI, N.; RITTER, C.; FRIEDEL, U.; AMSTUTZ, B.; YALA, D.; BOULAHBAL, F.; GUETARNI, D.; ZINSSTAG, J.; KELLER, P. M. *Mycobacterium algericum* sp. nov., a novel rapidly growing species

related to the *Mycobacterium terrae* complex and associated with goat lung lesions. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiol**, Washington, v. 61, n.8, p.1870-4, 2011.

46. SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p. 725-759, 2006.

47. SCHEPPER, L. D. **Hahnemann Revisited**: a textbook of classical homeopathy for the professional. United States: Full of Life Publications, Santa Fe, New Mexico, p. 572, 2001.

48. SILVA, B. D. S.; SILVA, E. B.; NASCIMENTO, I. P.; REIS, M. C. G.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. MPT-51/CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, Kidlington, v. 27, p. 4402–4407, 2009.

49. SNAPPER, S.B.; MELTON, R.E.; MUSTAFA, S.; KIESER, T.; JACBS, W.R.Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. **Molecular Microbiol**, New York, v.4, p.1914-1919, 1990.

50. SOARES, I. C. **Homeopatia: fundamentos básicos**. Ribeirão Preto: Instituto Homeopático François Lamasson, 47, p. 1988.

51. SOUSA, E. M.; BORTOLI, F. B.; AMARAL, E. P.; BATISTA, A. C.; KIPNIS, T. L.; CARDOSO, A. M.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Acute immune response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/c mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78, n.4, p. 1571-1581, 2010.

52. SOUSA, E. M.; COSTA, A. C.; TRENTINE, M. M.; ARAUJO FILHO, J. A.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in Mice and Active TB Infection. **PLoS One**, Delhi, v. 7, n. 10, p. 47781, 2012.

53. SPENCER, E. H.; FRANK, E.; MCINTOSH, N. F. Potential Effects of the Next 100 billion hamburgers Sold by McDonald's. **American Journal of Preventive Medicine**, Georgia, v. 28, n. 4, p.462–67 2005.
54. STANBERRY, L. R. Evaluation of herpes simplex virus vaccines in animals: the guinea pig vaginal model. **Reviews of Infectious Diseases**, Vienna, v.13, p. 920-3, 1991.
55. STEVENSON, F. K.; OTTENSMEIER, C.H. DNA vaccines against cancer come of age. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 264-270, 2010.
56. STOVER, C.K.; DELACRUZ, V.F.; FUERST, T.R.; BURLEIN, J.E.; BENSON, L.A., BENNETT, L. T.; BANSAL, G.P.; YOUNG, J.F.; LEE, M.H.; HATFULL, G.F., SNAPPER, S.B.; BARLETTA, R.G.; JACOBS, W.R. BLOOM, B.R. New Use of BCG for recombinant vaccines. **Nature**, New York, v.3 n.351, p.456-460, 1991.
57. TEIXEIRA, M. Z.; LIN, C. A.; MARTINS, M. A. O ensino de práticas não convencionais em saúde nas faculdades de Medicina: panorama mundial e perspectivas brasileiras. **Revista brasileira educação médica**, Manguinhos, v.1, n. 28, p. 51-60, 2004.
58. TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: prática médica humanística. **Revista Associação médica brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 6, 2007.
59. TONEY, N.; ADEKAMBI, T.; TONEY, S.; YAKRUS, M.; BUTLER, W. R. Revival and emended description of "*Mycobacterium paraffinicum*" Davis, Chase and Raymond 1956 as "*Mycobacterium paraffinicum*" sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiol**, Washington, v. 60, p. 2307-2313, 2010.
60. TORTOLI, E.; BÖTTGER, E. C.; FABIO, A.; FALSEN, E.; GITTI, Z, A.; KLENK, H. P.; MANNINO, R.; MARIOTTINI, A.; MESSINÒ, M.; PECORARI, M.; RUMPIANESI, F. *Mycobacterium europaeum* sp. nov., a scotochromogenic

species related to *Mycobacterium simiae* complex. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiol**, Washington, v.61, p.1606-1611, 2010.

61.QUEIROZ, A. O.; XAVIER, S. C. C.; FARIA, K. G.; BERNARDO, R. R.; LEITÃO, T. C. A. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30DH: um estudo *In Vivo*. **Cultura Homeopática**, v.17, p. 9-13, 2006.

62.VAN INGEN, J.; RAHIM, Z.; MULDER, A.; BOEREE, M. J; SIMEONE, R.; BROSCHE, R.; SOOLINGEN, D. V.Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 18, n. 4, 2012.

63.VIEIRA, M.; DIAS, J.G; QUEIRÓS, L.; CORREIA, A.M. Internamentos por tosse convulsa na Região Norte 2000-2006, **Acta Médica Portuguesa**, Porto, v.23, n. 4, p.605-612, 2010.

64.WILKER, H.G.; MUSTAFA, T.; MALEN, H.; RIISE, A. Vaccine approaches to prevent tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n. 3, p.243-50, 2006.

65.WYNN, S. G. Studies on use of homeopathy in animals.**Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 212, n. 5, p.719-724, 1998.

66.WINSTON, J. The faces of homoeopathy, an illustrated history of the first 200 years. **Great Auk Publishing**. Tawa, New Zealand, 1999.

CAPÍTULO 2 – Diluições homeopáticas de *Mycobacterium massiliense* podem induzir uma resposta imune em camundongos BALB/c e reduzir a infecção

Marcos Antonio Rocha Cavalcanti¹, Monalisa Martins Trentini², André Kipnis² e Ana Paula Junqueira-Kipnis^{2*}

¹: Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí.

²: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

*: Correspondence address: Rua Delenda Rezende de Melo, SN. Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas, sala 325. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Setor Universitário, Goiânia – Goiás, CEP 74605-050. Phone: 55 11 62 32096174. Fax: 55 11 62 32096363. E-mail: anapaula@iptsp.ufg.br.

Capítulo editado de acordo com as normas da Revista: Journal of Alternative and Complementary Medicine

RESUMO

Os bioterápicos homeopáticos podem ser utilizados não só como curativos, mas também preventivos, pois, podem aproveitar o agente etiológico de determinada doença que se pretende combater. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de indução de resposta imune humoral específica contra *M. massiliense* nos camundongos vacinados com bioterápico. Foi empregado o modelo de imunização e infecção experimental de camundongos isogênicos BALB/c para determinar a proteção vacinal. Após avaliação de 15 diluições centesimais foram selecionadas duas diluições que mantiveram sua ação protetora em diferentes ensaios, 11cH (décima primeira diluição) e 19c (décima nona diluição). Utilizando-se estas vacinas bioterápicas foi possível observar que tanto IgG1 quanto IgG2a foram especificamente induzidas, principalmente quando a vacina 19cH foi utilizada. Animais desafiados com *M. massiliense* quando foram vacinados com a formulação 19cH apresentaram melhor redução da infecção por *M. massiliense*. Conclui-se que, dependendo da diluição utilizada, as vacinas homeopáticas bioterápicas são capazes de induzir resposta imune específica.

Palavras-chave: altas diluições; imunidade vacinal; homeopatia; *Mycobacterium sp.*

2.1 Introdução

O mecanismo de ação do medicamento homeopático é um dos temas que mais tem intrigado os homeopatas em todos os tempos. Desde que Avogadro estabeleceu sua constante, sabe-se pela lei das probabilidades que em diluições acima de 12cH, a chance de encontrar uma molécula do soluto no solvente é zero (WASSENHOVEN, 2007).

Têm-se percebido que as diluições homeopáticas podem ser graficamente descritas como uma senoide, oscilando entre as obtenções de diluições com resultados e outras sem resultados. O que resulta na descrição por parte dos homeopatas diz “potências que não funcionam” (DAVENAS, 1998).

A curva senoidal foi demonstrada por exemplo: usando o cloreto de magnésio como um agente hidratante, e os efeitos farmacológicos neste agente não foram detectados em várias diluições, como 3cH embora o efeito hidratante foi observado em diluições mais elevadas, tais como 4cH e 17cH (PORTO, 2004).

Uma droga utilizada para o tratamento homeopático de síndromes de ansiedade é formulada a partir de *Strychnos ignatii*, uma planta da família das Loganiaceae nativa do Sudeste da Ásia. Quando utilizada em camundongos, os resultados não apresentaram compatibilidade em relação a uma curva dose/resposta, compatíveis com a hipótese de que este medicamento tem um mecanismo de regulação do sistema nervoso não-linear (MARZOTTO, 2012).

A capacidade dos medicamentos homeopáticos de afetar a resposta imune em humanos foi previamente demonstrada na literatura. Por exemplo, quando uma diluição 12cH *Staphylococcus sp* foi utilizada em indivíduos HIV-positivos, a quantidade de complexos imunes circulantes foi reduzida, e inversamente a contagem de células CD4 e CD4/CD8 foram aumentadas (DANNINGER, 2000).

Utilizando primatas não humanos a Canova que é um medicamento homeopático imunomodificador, indicado para pacientes cujo sistema imune está deprimido, estimulou indiretamente os linfócitos a produzir IFN- γ e IL-5 aumentando a imunidade dos indivíduos (COELHO, 2012).

Um bioterápico *Trypanosoma cruzi* vacina, usando modelo animal, induziu proteção em camundongos desafiados. Além disso, aumentou os níveis

de anticorpos IgG específicos, e a ausência de parasitas na corrente sanguínea, o que sugere que a vacina bioterápica foi capaz de modular resposta imune (QUEIROZ, 2006). Há evidências de que vacinas bioterápicas podem funcionar de forma semelhante às vacinas classicamente produzidas utilizando antígenos de *T. Cruzi* (BASOMBRIIO, 1982; ALMEIDA, 2008).

Em Cuba, o uso da homeopatia reduziu drasticamente a incidência da leptospirose, levando a completar o controle da epidemia. Estes resultados foram obtidos a partir do uso profilático de uma fórmula homeopática com várias estirpes de *Leptospira*. Esta estratégia resultou no controle da epidemia por causa do uso combinado de vacina salopática e homeopáticas (BRACHO, 2010).

Mycobacterium massiliense é uma bactéria do ambiente, de multiplicação rápida, associada à infecção do tecido mole após infecção por procedimento cirúrgico. Afeta indivíduos saudáveis e é capaz de infectar camundongos isogênicos quando inoculados intravenosamente (CARDOSO, et al, 2008; Sousa et al, 2010). A infecção induz a ativação de macrófagos, células dendríticas e células assassinas naturais (NK) em camundongos. Linfócitos específicos também são induzidos, levando à produção de anticorpos e citocinas. Devido à sua capacidade de infectar e induzir respostas imunitárias específicas em camundongos, *M. Massiliense* pode ser utilizado em modelo animal para testar a eficácia de vacinas bioterápicas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da vacina homeopática bioterápica na indução de uma resposta imune específica para *M. massiliense* e posterior ao desafio com o mesmo agente, avaliar a proteção induzida.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Animais

Os camundongos com oito semanas de idade, do sexo feminino BALB/cisogênicos provenientes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Universidade Federal de Goiás (Universidade Federal de Goiás - UFG)

foram utilizados neste estudo. Os animais foram acondicionados em gaiolas com água e ração *ad libitum*.

2.2.2 *Mycobacterium massiliense*

M.massiliense foi cultivado em 500 ml de meio de Mueller Hinton durante 4 dias a 37°C. A suspensão bacteriana foi posteriormente centrifugada, lavada três vezes com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) e ressuspensa em 5 ml de PBS. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram estabelecidas através de uma sequência de diluições, as quais foram posteriormente cultivadas em meio de ágar Mueller Hinton incubadas a 37°C durante 5 dias. As UFCs foram contadas, e a concentração da vacina foi determinada. As bactérias foram congeladas a -80°C até o uso.

2.2.3 Preparação da vacina homeopática bioterápica

M.massiliense foi preparado por suspensão de 10^7 UFC em 1,0 mL de soro fisiológico (tintura-mãe) e adicionando 9,0 mL de solução a 30% de álcool de cereais. A primeira diluição de vacina bioterápica homeopática (VBH) foi obtida após diluição centesimal, e sucussão (homogeneização) durante 100 vezes. Outras diluições seria das centesimais e sucussões foram conduzidos até a diluição 30cH. A primeira diluição centesimal seguida de sucussão é conhecida como a primeira diluição do VHB (centesimal 1cH= Hahnemann). As formulações homeopáticas foram preparadas por Pharmasu (Farmácia de Manipulação, Goiânia, Goiás).

2.2.4 Determinação da diluição de VBH a ser usada como vacina

Quarenta e cinco camundongos BALB/cisogênicos foram utilizados para avaliar o efeito protetor dos diferentes formulações de VBH. Os animais foram aleatoriamente divididos em 15 grupos de 3. Por conveniência, apenas as diluições ímpares foram testadas, a partir do qual 50µL foi usado para injetar por via subcutânea, nos camundongos. O esquema de vacinação foi realizada em

quatro imunizações separadas por intervalo de 7 dias entre as imunizações. Os camundongos controles foram vacinados com PBS. Quinze dias após a imunização final, os animais foram desafiados intravenosamente com 100µL de *M.massiliense* numa concentração de 10^7 UFC por animal. Após o desafio, (15 dias após a infecção), as UFCs do fígado foram determinadas por plaqueamento de diluições em série dos homogeneizados dos órgãos. As diluições 19cH e 11cH mostraram melhor reprodutibilidade das contagens de UFC, portanto, foram selecionadas e subsequentemente testadas sem experimento independente.

2.2.5 Avaliação da eficácia do VHB

Camundongos BALB / c(n = 24) foram divididos em quatro grupos (6animais por grupo): grupo 1, os animais foram inoculados com uma solução salina; no grupo2, os animais foram imunizados com VHB na diluição11cH; no grupo 3, o os animais foram imunizados com VHB na diluição19cH e no grupo 4, os animais não imunizados foram utilizados como controle da infecção (controle positivo). Quinze dias após a imunização final, os camundongos dos grupos 2, 3 e 4 foram desafiados intravenosamente com 100µL *M.massiliense* numa concentração de 10^7 UFC por animal. Camundongos do grupo 1(solução salina), não foram desafiados e serviram como controles negativos.

Os camundongos infectados com *M.massiliense* foram sacrificados por deslocamento cervical 15 dias após o desafio. Os fígados de todos os animais foram recolhidos emtubos de ensaio contendo1,0 mL de solução salina. Os órgãos foram homogeneizados em uma suspensão de células e diluições em série, homogeneizadas, foram plaqueadas em meio de Mueller Hintone incubadas a 37 °C durante 5 dias. O crescimento das micobactérias foi determinado e a UFC por fígado foram calculadas após a correção com os fatores de diluição. A proteção foi determinada por comparação de UFCs dos grupos vacinados em relação ao grupo de controle positivo (apenas infectados com *M.massiliense*). Este experimento foi repetido três vezes de forma independente.

2.2.6 Obtenção de soro

As mostras de sangue de todos os animais foram obtidas por punção retro-orbital 15 dias pós-desafio. As amostras foram incubadas durante 1 hora a 37°C e centrifugadas a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos para retirar o coágulo e separar o soro. As amostras foram armazenadas a -20 ° C até à sua utilização.

2.2.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Noventa e seis placas de poliestireno poços (Costar) foram utilizadas para este teste. A placa foi revestida com proteínas de *M.massiliense* (10 µg/mL) em tampão de carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) e incubada a 4°C durante 16 horas. As placas foram subsequentemente lavadas com PBS e bloqueadas durante 2 horas a 37°C com tampão carbonato /bicarbonato contendo 1% de gelatina. Subsequentemente, soros diluídos a 1/8 e 1/16 foram adicionados e as placas foram incubadas durante 2 horas a 37°C. Anticorpos conjugados à biotina anti-IgG1 e IgG2a (Pharmingen) foram adicionados às placas (diluição 1:5000). As placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C. Solução de estreptavidina peroxidase e em PBS 1% de gelatina diluídas a 1:1000, foram adicionados e as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C. O anticorpo ligado a enzima foi revelado utilizando o peróxido de hidrogénio e orto-fenilendiamina em tampão de citrato, pH 4,5, e a reação foi parada utilizando ácido sulfúrico 4N. As placas foram lavadas 6 vezes entre cada passo com PBS Tween 20, 0,05%. A absorvância foi lida a 492nm em leitor de ELISA (Multiskan ThermoLabsystem).

2.3 Análise estatística

Os resultados foram tabulados em Excel (version 2007) and Prism 4 software (Graphpad Software 4.0). Para verificar a diferença entre os grupos

foram usados o teste não-paramétrico (Mann Whitney U) seguido de t de Student. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás, protocolo número: 001/07.

2.4 Resultados e Discussão

Os camundongos foram imunizados com as vacinas homeopáticas (VHB) e desafiados com *M.massiliense*, como mostrado na Figura 1. Apenas as diluições ímpares entre 1cH e 30cH foram utilizadas. Quando VHB foi utilizada em diferentes diluições (1cH para 30cH), houve variação nas UFCs obtidas. Em algumas diluições houve redução das bactérias do desafio e outras não. Este comportamento pode ser descrito graficamente por uma curva senóide semelhante a uma onda. Estes resultados sugerem uma quebra no paradigma conhecido para a alopatia, porque a proteção não diminui de forma linear com diluições progressivas.

Alguns estudos utilizando homeopatia também observaram efeito não linear entre diluições tanto quando a homeopatia foi utilizada para vegetais, quanto para o controle de parasitos (BONATO & PERES, 2007; GONÇALVES, 2010).

As diluições cujos resultados de proteção (UFC) foram mais homogêneos foram utilizadas a seguir para avaliar a ativação de resposta imune específica e proteção. Novamente, como mostrado no primeiro experimento (Figura 1), a VHB 19cH proporcionou melhor proteção em comparação com 11cH (Figura 2). A VHB 19cH reduziu significativamente (~50% de redução), a contagem de bactérias recuperadas de fígados de animais infectados, quando comparada com animais não vacinados, e apenas infectados com *M.massiliense*.

Para confirmar se a vacina homeopática seria capaz de induzir resposta imune protetora ao *M. massiliense*, novas imunizações foram realizadas com as VBH 11c e 19c. Após as imunizações, camundongos foram desafiados com *M. massiliense* (1×10^7 UFC). A imunização com a VBH 11c ($48 \times 10^3 \pm 60,63 \times 10^3$) favoreceu o crescimento de *M. massiliense* no fígado quando comparados com o grupo infecção (controle positivo: $43,16 \pm 15,15 \times 10^3$) e ao

grupo que recebeu a VBH 19c ($20,33 \times 10^3 \pm 14,43 \times 10^3$). Esses resultados estão detalhados na Figura 2.

O modelo experimental utilizado para testar VBH neste estudo utilizou a *M. massiliense*, porque poderia ser manipulada com menor risco de contaminação.

Estes resultados são promissores e podem oferecer motivos para estudos em seres humanos, tais como no estudos praticados em cuba no qual uma vacina bioterapêutico foi usada para controlar os surtos de leptospirose e proteger uma população de 2,3 milhões de pessoas. (BRACHO,2010).

A avaliação de diversos métodos e escala de dinamização utilizada na produção dos medicamentos homeopáticos mostraram que esses métodos não estiveram abandonados ao longo dos últimos 200 anos. É possível concluir que, de alguma maneira, todos os métodos são passíveis de apresentar resultados clínicos. O processo de diluição e agitação simples não aumenta a ação de uma substância, por outro lado, a dinamização ocorre quando estas duas operações acontecem de maneira simultânea. Quando uma substancia é diluída, considera-se que ela vai “perder sua ação”, ou que vá “perder sua força”. Se agitar qualquer substancia 100 vezes e diluir a 1%, segundo os princípios homeopáticos essa solução ficara “mais forte” do que a solução anterior (CÉSAR, 2003).

Quando foi utilizada a VBH de *M. massiliense* em diferentes diluições (1cH até 30cH) e, após quinze dias do desafio as bactérias no fígado foram enumeradas, diferentes unidades formadoras de colônias (UFC) foram encontradas para cada uma das vacinações, independente da potência de diluição. Portanto, o comportamento desencadeado pelas VBH foi diferente, de forma que algumas diluições protegeram os camundongos enquanto outras não. Esse comportamento pode ser graficamente descrito como uma senóide, lembrando uma onda, ora as diluições protegem os camundongos desafiados, ora não protegem, podendo até mesmo provocar um aumento da quantidade de bactérias recuperadas do fígado, além do inoculado (10^7 UFC) em algumas diluições.

A partir desse resultado decidiu-se avaliar se essas vacinas eram capazes de induzir resposta imune humoral específica. A presença de anticorpos

séricos da classe IgG1 e IgG2a específicos para *M. massiliense* foram avaliados em ensaio de ELISA. Na Figura 3A, observou-se que a infecção com *M. massiliense* foi capaz de induzir a produção de níveis menores de anticorpos da classe IgG1 específicos, enquanto os da classe IgG2a foram superiores. As vacinas bioterápicas, no entanto, não induziram a produção de anticorpos específicos da classe IgG1, quando comparados à infecção sozinha (Figura 3A).

A vacina bioterápica na diluição de 19c, que induziu proteção ao se desafiar os camundongos com *M. massiliense*, induziu a produção de níveis maiores de anticorpos da classe IgG2a específicos ($0,18 \pm 0,07$) que a infecção sozinha ($0,19 \pm 0,02$) (Figura 3B).

A indução de imunoglobulinas específicas da classe IgG2a favorecem a indução da produção de IFN- γ , citocina sabidamente protetora nas infecções micobacterianas (SILVA, 2009).

A possível presença desta citocina IFN- γ , que é responsável pela ativação de macrófagos e conseqüentemente da morte da micobactérias *in vivo*, favorece a pesquisas futuras utilizando vacina bioterápica de micobactérias ambientais para a prevenção de infecção por micobactérias patogênicas.

2.5 Conclusões

A vacina de bioterápico homeopática contendo *Mycobacterium massiliense* após as imunizações intradérmicas foi capaz de reduzir a quantidade de bactérias recuperadas do fígado de camundongos isogênicos desafiados bem como induzir a produção de imunoglobulinas específicas da classe IgG2a.

Fonte de Financiamento

O estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. ALMEIDA, R. L.; CAMPOS, M.C.O; HERRERA. L.V.B.; BONAMIM, L.V.; FONSECA, A. H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, v.97, p. 65-69, 2008.
2. BASOMBRIO, M. A.; BESUSCHIO, S. *Trypanosomacruzi* culture used as vaccine to prevent chronic Chagas disease in mice. **Infect. Immun**, v.36, p. 351-356, 1982.
3. BONATO, C.M.; PERES, P.G.P. Homeopatia em vegetais. In: SEMINÁRIO SOBRE CIÊNCIAS BÁSICAS EM HOMEOPATIA, **Anais**, CAV/UEDESC; EPAGRI, Lages, v.7, p.41-59, 2007.
4. BRACHO G, VARELA E, FERNANDEZ R. Large-scale application of highly-diluted bacteria for *Leptospirosis* epidemic control. **Homeopathy**, v. 99, p.156 – 166, 2010.
5. CARDOSO, A. M.; DE SOUSA, E. M.; VIANA-NIERO, C. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes Infect.** V. 10, p.1552-1557, 2008.
6. CÉSAR, A.T. Dinamização. **Revista Cultura Homeopática da Escola de Homeopatia**, v. 5, p.15-41, 2003.
7. COELHO MOREIRA, C.O; DE FÁTIMA FERREIRA BORGES DA COSTA J.; LEAL, M. F.; FERREIRA DE ANDRADE E, REZENDE AP, IMBELONI A. A.; PEREIRA CARNEIRO MUNIZ J. A, DE ARRUDA CARDOSO SMITH M, BURBANO, R.R.; DE ASSUMPTÃO, P.P. Lymphocyte proliferation stimulated by activated *Cebus apella* macrophages treated with a complex homeopathic immune response modifiers. **Homeopathy**, v.101, p.74 -79, 2012.
8. DANNINGER, T.; GALLENBERGER. K.; KRAELING, J. Immunologic changes in healthy probands and HIV infected patients after oral administration of *Staphylococcus aureus*12c: a pilot study. **British Homeopathic Journal**, v.89, p.106-115, 2000.
9. DAVENAS, E.; BEAUVAIS, F.; AMARA. J.; OBERBAUM, M.; ROBINZON, B.; MIADONNA, A.; TEDESCHI, A.; POMERANZ, B.; FORTNER, P.; BELON, P. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against. **NATURE**, v.333, p. 816-818, 1998.

10. MARZOTTO, M.; CONFORTI, A.; MAGNANI, P.; ELISABETTA, M.; ZANOLIN AND BELLA VITE P. Effects of *Ignatia amara* in mouse behavioural Models. **Homeopathy**, v.101, p.57-67, 2012.
11. WASSENHOVEN, M. V. Evidências da eficácia homeopática. **Cultura homeopática**, v.2, p. 27-31, 2007.
12. PORTO, M. E. G. Alterações de Propriedades da Água por Processos Físicos e Químicos. **Tese de doutorado**. Campinas, SP, 2004.
13. QUEIROZ, A.O.; XAVIER, S.C.C.; FARIA, K.G.; BERNARDO, R.R.; LEITÃO, T.C.A. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: Um Estudo In Vivo. **Cultura Homeopática**, v.17, p. 9-13, 2006.
14. SOUSA, E. M.; BORTOLI F. B.; AMARAL E. P., A. C. BATISTA, T. L. KIPNIS,† A. M. CARDOSO,; JUNQUEIRA-KIPNIS.; KIPNIS, A. P. Acute Immune Response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/c Mice. INFECTION AND IMMUNITY, **American Society for Microbiology**. v. 4, n.78 p. 1571–1581, 2010.
15. SILVA, B. D. S.; SILVA, E NASCIMENTO.; I. P.; REIS, M. C. G.; KIPNIS A, JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. MPT-51/CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 33, p.4402-4407, 2009.
16. GONÇALVES, P. A. de S.1, BOFF, P., CARISSIMI M. I. Preparado homeopático de losna, *Artemisia vulgaris* L., no manejo de tripes e seu efeito sobre a produção de cebola em sistema orgânico. **Revista Brasileira de Agroecologia**. Porto Alegre, v. 5, n.2, p. 16-21, 2010.

Legendas das figuras:

Figura 1. Unidades formadoras de colônia obtidas após o desafio dos camundongos BALB/c com *M. massiliense*. Animais foram vacinados com ultra diluições impares de vacina contendo *M. massiliense* e depois foram desafiados com *M. massiliense* (10^7 UFC/ por animal). Os resultados representam a média das UFCs hepáticas.

Figura 2. Avaliação da capacidade protetora das vacinas VBH 11cH e VBH 19cH. Animais foram vacinados com ultra diluições de vacina contendo *M. massiliense* e depois foram desafiados com 10^7 UFC de *M. massiliense*. Os resultados representam a média e o desvio padrão das UFCs hepáticas.

Figura 3. Níveis de anticorpos específicos para *M. massiliense* da classe IgG1 (A) e IgG2a (B) nos camundongos BALB/c vacinados e desafiados com *M. massiliense* (10^7 UFC). ELISA indireto para dosagem de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a específicas para *M. massiliense*. Os resultados representam a média e o desvio padrão das densidades óticas obtidas a 492nm. * $p < 0.05$.

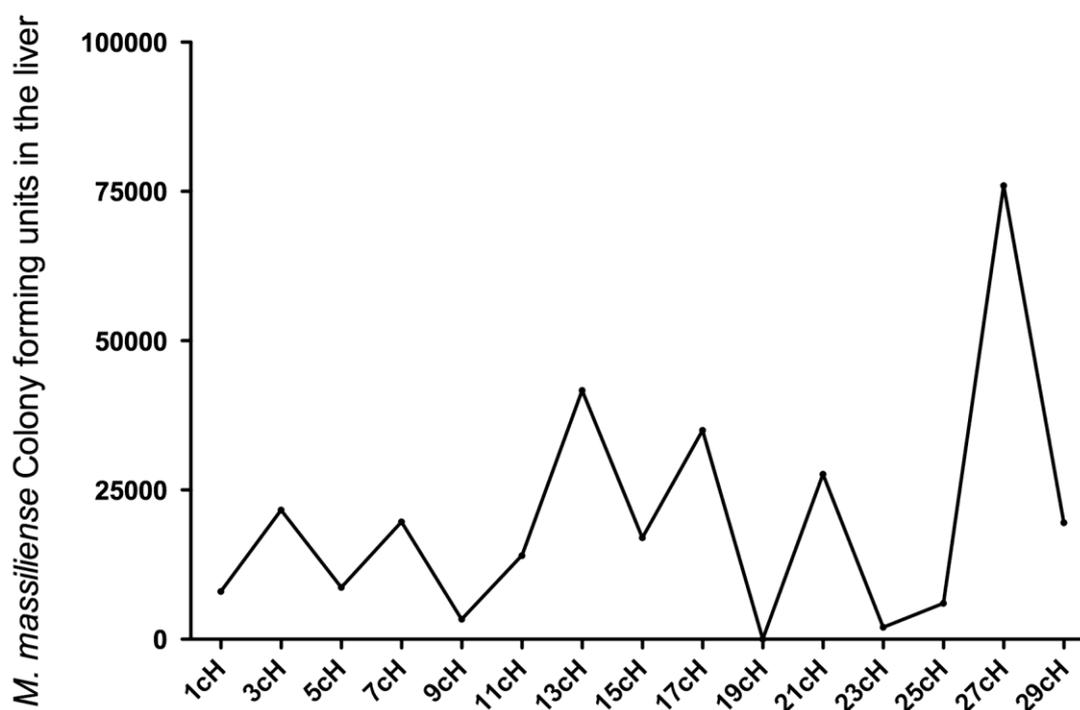


Figura 1.

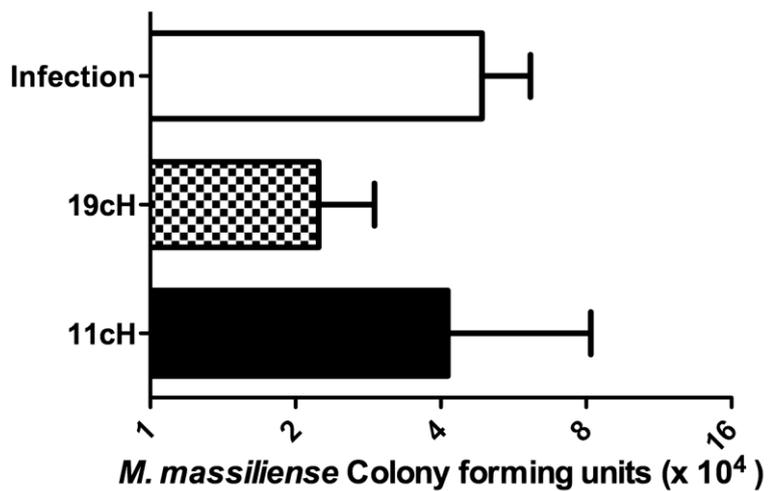


Figura 2.

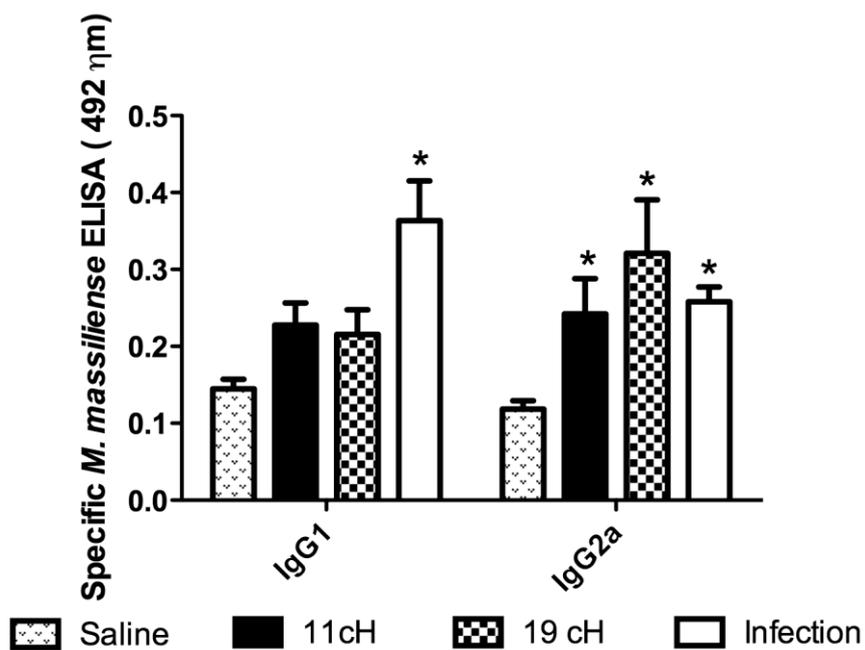


Figura 3.

CAPÍTULO 3. Imunogenicidade de uma vacina composta por *Mycobacterium smegmatis* recombinante expressando a proteína de fusão CMX em bovinos do estado de Goiás, Brasil

Silva D.A.²; Cavalcanti M.A.R.²; Muniz F.O.³; Trentini M.M.³; Junqueira-Kipnis A.P.³; Kipnis A.³

ABSTRACT.- Silva D.A.; Cavalcanti, M.A.R.; Trentini M.M.; M.A.R.; Trentini M.M.; Muniz F.O.; Junqueira-Kipnis A.P.; Kipnis A. [**Immunogenicity of *Mycobacterium smegmatis* recombinant vaccine expressing a fusion protein in cattle from Goiás State, Brazil.**] Imunogenicidade de uma vacina composta por *Mycobacterium smegmatis* recombinante expressando a proteína de fusão CMX em bovinos do Estado de Goiás, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00 (0): 00-00. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás (74605-050), Brasil, Brazil. E-mail: andre.kipnis@gmail.com

This study aimed to evaluate the immunogenicity of a recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing the CMX fusion protein, composed of immunodominant epitopes Ag85C, HspX and MPT51 of *Mycobacterium tuberculosis*, which are important mycobacteria virulence factors. A group of Nelore heifers, with age between 10 to 12 months, TST negative were immunized with four doses of a recombinant vaccine mc²- CMX (*M. smegmatis*- Ag85C-MPT51- HspX) during a period of one year. Before each immunization, blood was collected to obtain serum for antibodies analysis. Serological analysis demonstrated that mc²- CMX was able to induce a humoral response with increased levels of specific IgG antibodies against CMX. However, there was no significant increase in specific CD4⁺ and CD8⁺ IFN-γ positive T cells. Despite lymphadenomegaly observed in cervical and pre-scapular lymph nodes adjacent to the site of vaccination, the histopathological analysis demonstrated follicular hyperplasia without inflammatory infiltrate or granuloma. Animals remained negative in tuberculin test in the end of the experiments, showing no cross-reactivity with the recombinant vaccine and tuberculin protein. The results of this study suggest that mc²- CMX presents a potential to induce immune response in cattle.

INDEX TERMS: zoonosis, public health, *Mycobacterium bovis*, environmental mycobacteria, immunologic response

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Rodovia

Goiânia- Nova Veneza 131, Goiânia, GO 74001-970, Brasil. *Autor para correspondência: andre.kipnis@gmail.com

³Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Cx. Postal....., GO (74605-050), Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar em um grupo de bovinos cujos testes de tuberculinização intradérmica simples foi negativo a imunogenicidade de uma vacina contendo *Mycobacterium smegmatis* recombinante expressando a proteína de fusão CMX, composta pelos epítomos proteicos imunodominantes Ag85C, MPT51 e HspX do *Mycobacterium tuberculosis*, que são importantes fatores de virulência da bactéria. Um grupo de novilhas da raça Nelore, com idade entre 10 a 12 meses, negativas para tuberculose recebeu quatro imunizações com a vacina recombinante mc²-CMX (*M. smegmatis*- Ag85C- MPT51- HspX) durante um período de um ano. Animais controles receberam *M. smegmatis* como vacina. Antes de cada imunização foi coletado sangue dos animais para obtenção do soro e realização de ensaio imunoenzimático (ELISA). A vacinação utilizando mc²-CMX induziu aumento dos níveis de anticorpos IgG específicos anti CMX. Contudo, essa vacina não gerou populações celulares de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ específicos para CMX. Apesar da linfadenomegalia observada nos linfonodos cervicais e pré-escapulares adjacentes ao local da vacinação, nas análises histopatológicas constatou-se hiperplasia folicular sem infiltrado inflamatório ou formação de granuloma. As bezerras mantiveram-se negativas no teste de tuberculinização durante todo o experimento, mostrando que não houve reação cruzada na resposta a vacina recombinante com a tuberculina. Os resultados deste estudo sugerem que a vacina mc²-CMX apresenta um potencial em induzir resposta imunológica em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: zoonose, saúde pública, *Mycobacterium bovis*, micobactéria ambiental, resposta imunológica.

3.1 Introdução

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de grande impacto na saúde pública mundial, pois todos os anos surgem novos casos e milhões de pessoas morrem devido à infecção. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo causador da doença, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (WHO 2009).

Outra micobactéria de importância não só na saúde humana, mas também na saúde animal é o *Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *M. tuberculosis* causador de uma zoonose, a tuberculose bovina (TBb). O *M. bovis* infecta uma gama de hospedeiros comparado a outras micobactérias que compõem o complexo *M. tuberculosis* (Waters et al. 2012). Este agente infecta os seres humanos por meio da ingestão de leite não pasteurizado ou derivados contaminados com a bactéria, e pelo contato com bovinos infectados. A TBb prejudica o desenvolvimento da bovinocultura, tanto nos ramos de laticínios como de produtos cárneos, interferindo diretamente no comércio internacional dessas mercadorias. Além disso, custos com testes diagnósticos e descarte de animais positivos, já que não existe tratamento para os mesmos, perda de acordos comerciais, restrição no trânsito de animais e a manutenção de programas de controle e erradicação da doença, geram perdas econômicas significativas para a pecuária mundial (Rizzi et al. 2012, Waters et al. 2012).

Para combater a enfermidade muitos obstáculos precisam ser enfrentados haja vista que a única vacina utilizada atualmente, a BCG (bacilo de Calmette-Guérin, uma cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada), não apresenta um grau de proteção satisfatório em todas as fases da vida humana, tendo restrições ao seu uso em regiões com alta prevalência da doença (Black et al. 2002, Brandt et al. 2002, Andersen et al. 2005). Além disso, a BCG confere uma proteção variável em bovinos, onde sua eficácia depende da idade do animal, dose e cepa utilizada na vacina, esquema vacinal e via de inoculação (Buddle et al. 2003, Wedlock et al. 2007, Buddle et al. 2008, Ameni et al. 2010, Lopez-Valencia et al. 2010). Apesar de estudos prévios com bovinos vacinados com a BCG terem demonstrado uma diminuição da severidade da doença, a vacina não foi capaz de induzir uma proteção completa após desafio experimental com uma cepa virulenta

de *M. bovis* (Lopez-Valencia et al. 2010, Buddle et al. 2011, Hope et al. 2011). Uma das hipóteses que explica a baixa eficácia da BCG é a interferência de micobactérias ambientais (Brandt et al. 2002, Buddle et al. 2002, De Lisle et al. 2005). Essa teoria é fundamentada no fato de a vacinação com a BCG ser menos eficaz em regiões onde existe uma exposição prevalente a micobactérias do ambiente (Fine 1989). Além disso, outro problema do uso da BCG como vacina para bovinos é a interferência no teste da tuberculina, pois a maioria dos antígenos presentes no PPD (derivado proteico purificado de *M. bovis*), também está no BCG *M. bovis* (Vordermeier et al. 2011).

Até o momento não foi desenvolvida uma vacina capaz de proteger os bovinos contra a infecção pelo *M. bovis*, sendo preconizado o abate dos animais positivos no teste da tuberculina. No entanto, muitos estudos utilizando este modelo animal são realizados paralelamente aos estudos em camundongos e humanos. Ainda assim, os avanços alcançados pelas pesquisas para tuberculose humana são superiores aos da tuberculose bovina e, devido a essa desigualdade, a evolução no desenvolvimento de vacinas contra o *M. tuberculosis* ultrapassa a de *M. bovis*. Embora os testes em bovinos possam ser benéficos para o controle da doença em animais e humanos, a escassez de financiamento, pesquisas e o custo das instalações limitam o potencial uso deste modelo nos estudos da TBb. As análises em bovinos podem fornecer uma garantia adicional na segurança e eficácia das vacinas, por ser um sistema análogo de hospedeiro natural e patógeno diferente do modelo de descoberta de vacinas para TB humana (Waters et al. 2012).

Desta maneira, fica clara a necessidade do desenvolvimento de novas vacinas contra a tuberculose com eficácia comprovada em diferentes espécies, populações e regiões do mundo, visto que se trata de uma zoonose e um grave problema mundial de saúde pública.

O *Mycobacterium smegmatis* é um membro não patogênico da família das micobactérias, que apresenta crescimento rápido e possui uma excelente capacidade de transformação com diversos genes *in vitro* (Gicquel 1994). Devido a essas peculiaridades, muitos estudos são desenvolvidos utilizando o *M. smegmatis* como vetor para vacinas contra a tuberculose (Zhang et al. 2010, Sweeney et al. 2011).

Neste estudo foi avaliada a imunogenicidade de uma vacina *M. smegmatis* recombinante expressando a proteína de fusão Ag85C-MPT51-HspX (CMX) em um grupo de bovinos PPD negativos. A CMX é composta por epítomos proteicos imunodominantes do *M. tuberculosis* que se constituem em importantes fatores de virulência da bactéria (Almeida et al. 2008, Silva et al. 2009, Spratt et al. 2010, Backus et al. 2011, Silva et al. 2011). A imunogenicidade e antigenicidade desta proteína recombinante já foram comprovadas em modelo murino e em humanos com tuberculose ativa (Sousa et al. 2012).

3.2 Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás, protocolo 020/2008.

3.2.1 Obtenção do *Mycobacterium smegmatis* recombinante

A bactéria *M. smegmatis* mc² 155 (gentilmente cedida pela Dr. Luciana Leite do Instituto Butantan) foi cultivada em meio middlebrook 7H9 broth (Himedia) com 0,05% de Tween 80 a 37°C por três dias. Após esse período foi centrifugada e lavada com igual volume de solução gelada de glicerol 10%. Em seguida, as células eletrocompetentes foram ressuspendidas em 3 mL de glicerol 10% gelado e aliqüotadas em criotubos contendo 100µL de bactéria, os quais foram congelados a -80°C.

O plasmídeo recombinante contendo a proteína de fusão CMX (Ag85C, MPT-51 e Hsp-X) produzido pelo nosso grupo de pesquisa (pLA71/ CMX) e o plasmídeo vazio (pLA71, gentilmente cedido pela Dr Brigitte Gicquel, Instituto Pasteur, França), foram inseridos no *M. smegmatis* mc² 155 (mc²- CMX e mc²- pLA71, respectivamente) por eletroporação usando o eletroporador de pulsação (Bio-rad) a 4°C. Condições padrão de pulsação 2,5Kv, 25µF e 1000Ω foram aplicadas numa cuveta de 2mm (Bio-Rad). Os transformantes foram selecionados em meio 7H11 com canamicina (20 µg/mL). Posteriormente, os clones recombinantes crescidos na placa foram repicados em meio middlebrook 7H9 broth (Himedia) com 0,05% de Tween 80 e canamicina (20 µg/mL) e cultivados

por três dias sob agitação a 37°C. Após esse período foram lavados e estocados a -80°C. A determinação da concentração das vacinas foi realizada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) em meio 7H11 contendo canamicina. Posteriormente uma alíquota congelada foi selecionada aleatoriamente para confirmar a expressão da CMX no recombinante por meio de um western blotting utilizando anticorpos policlonais específicos para a proteína de fusão.

3.2.2 Animais e delineamento experimental

Trinta bezerras da raça Nelore com idade entre 10 a 12 meses, com teste de tuberculinização negativo, oriundas do Instituto Federal Goiano–Campus Urutaí, foram dividida em três grupos aleatoriamente. O grupo 1, mc²-CMX, recebeu 1,0mL (1x10⁷CFU/mL) de vacina (*M. smegmatis* mc²- pLA71/ CMX); o grupo 2, mc², recebeu 1,0mL (1x10⁷CFU/mL) de vacina com o plasmídeo vazio (*M. smegmatis* mc²- pLA71); o grupo 3, PBS, recebeu 1,0mL de PBS. As imunizações foram realizadas por via subcutânea e cada grupo recebeu as três primeiras doses de seu respectivo inóculo em intervalos de 21 dias.

As coletas de sangue seguiram a seguinte ordem: a primeira (nível basal-tempo zero) foi realizada antes do início das imunizações, no mesmo dia da primeira imunização. As duas coletas seguintes se nos deram mesmos dias das respectivas imunizações (segunda e terceira). A quarta coleta ocorreu 30 dias após a terceira imunização. A quinta coleta foi realizada 200 dias após a terceira imunização, quando os animais foram revacinados. A sexta coleta foi feita 15 dias após a revacinação, totalizando quatro imunizações e seis coletas em todo o experimento.

Para o ensaio imunoenzimático o sangue foi coletado em tubos a vácuo sem anticoagulante, pela punção da artéria/ veia caudal após contenção dos animais em estação, utilizando bretes hidráulicos. A obtenção do soro para o ELISA ocorreu a partir da centrifugação do sangue a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo armazenado posteriormente em freezer a -20°C.

Para o ensaio de citometria, o sangue foi coletado em tubos a vácuo com anticoagulante (heparina sódica), centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos a

4°C para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O anel leucocitário foi coletado e lavado com solução salina 0,09%. Assim, o PBMC foi tratado com solução de lise de hemácias (0,15M NH₄Cl, 10mM, KHCO₃), lavado e ressuspensionado em meio RPMI 1640 (GIBCO™) complementado com 0,15% de bicarbonato de sódio, 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina (SIGMA®), 1% de penicilina-estreptomicina (SIGMA®), 1% de piruvato de sódio (SIGMA®), 1% de aminoácidos não essenciais (SIGMA®). Em seguida, as células foram contadas em Câmara de Neubauer.

3.2.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

As placas de poliestireno de 96 poços (Santa Cruz) foram adsorvidas com o sedimento do lisado da vacina mc²- CMX (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,015 M, pH 9,8. Depois de incubadas por 18 horas em temperatura de 4°C a 8°C, as placas foram bloqueadas utilizando-se o tampão carbonato-bicarbonato e gelatina 1% por duas horas a 37°C. O soro foi diluído (1/320) em tampão PBS gelatina 0,1% e incubados por duas horas a 37°C. Após a incubação as placas foram lavadas seis vezes com PBS Tween 20 a 0,05%. Posteriormente foram acrescentados 50 µL de conjugado anti-IgG bovina (Jackson Immuno Research Laboratories, INC) na concentração de 1/10.000, diluído em PBS gelatina 0,1%. Em seguida, as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. Terminada a incubação, foram realizadas as mesmas lavagens das placas, seguidas da adição de citrato- fosfato pH 5.0, contendo 5 mg de OPD (Merck) e 20 µL de H₂O₂ a 30 V para cada 5 mL de tampão. Seguiu-se uma incubação de 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após este período, foi adicionada a solução de parada, composta por H₂SO₄ 2N. A leitura das amostras foi feita em leitora de ELISA (Multiskan Plus) a 492nm.

3.2.4 Citometria de Fluxo

10⁶ células foram estimuladas com CMX (10 µg/mL) ou com fitohemaglutinina (PHA- 1 µg/mL) por seis horas a 37°C e 5% de CO₂. Depois

deste período, as células foram incubadas com monensina (Bioscience) por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. A marcação das células foi realizada com anticorpos conjugados a fluorocromos anti moléculas membranares ou intracelulares: PE-CD8; PercP-IFN- γ ; APC-CD4, por 30 minutos, lavadas com PBS contendo 0,1% de azida sódica, fixadas e permeabilizadas com PERM FIX/ PERM WASH (BD PharMingen). A seleção de células para análise foi baseada nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) dos linfócitos. Todas as análises foram realizadas com aquisição de 50.000 eventos no Citômetro BD Biosciences FACSCanto II e os dados foram analisados no software BD FACSDiva.

3.2.5 Justificativa

Para realização da análise histopatológica, 90 dias após a última vacinação, realizou-se a biópsia dos linfonodos cervicais e pré- escapulares adjacentes ao local de aplicação da vacina. As amostras foram seccionadas e transferidas para tubos contendo formalina tamponada. Após a fixação com formol, as amostras foram submetidas ao processamento de rotina e coradas pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE) (Fischer et al. 2008) e de Fite-Faraco (Reyes Perez 1963).

3.2.6 Teste de tuberculinização intradérmica simples

Todos os animais foram submetidos ao teste de tuberculina antes do início dos experimentos e ao final das imunizações. O teste foi realizado por meio da injeção intradérmica de 0,1mg de PPD bovino (derivado proteico purificado de *M. bovis*) na região cervical média dos animais e a subsequente análise da reação de hipersensibilidade tardia foi feita 72 horas depois da inoculação (Anon, 2004).

3.2.7 Análise estatística

Os resultados foram tabulados utilizando-se os programas Excel (versão 2007) e Prisma 4 (GraphPad Software 4.0). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste ANOVA. Para comparação entre os grupos foram utilizados múltiplos testes: teste não-paramétrico Kruskal-wallis seguido de análise de Dunn's. Resultados onde o valor de p foi menor que 5% foram considerados significativos.

3.3 Resultados

3.3.1 Indução de anticorpos específicos contra a vacina após imunização com mc² - CMX

Para avaliar se a mc²- CMX foi capaz de induzir uma resposta imune humoral em bovinos, um ensaio imunoenzimático foi realizado para detectar a presença de anticorpos específicos contra a vacina. Analisando a produção dos anticorpos ao longo das imunizações nos soros das coletas 1 (tempo zero), 2 (30 dias), 3 (60 dias) e 4 (90 dias), verificou-se um aumento progressivo dos níveis de IgG nos animais imunizados com a mc²-CMX em comparação com os bovinos que receberam apenas PBS ou mc², os quais não apresentaram alteração significativa nos níveis séricos de IgG.

Indução de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ em resposta a mc²- CMX

Para analisar a capacidade da vacina mc²- CMX em induzir uma resposta imune celular, foram quantificadas as populações de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ do sangue periférico dos animais imunizados. Foi realizado um reforço nos animais com a vacina mc²- CMX 200 dias após a última imunização, com posterior coleta de sangue total para realização do ensaio de citometria de fluxo. O PBMC foi estimulado com a CMX para caracterização das células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ , onde não foi observada proliferação significativa de células TCD4⁺ (Fig. 2) e TCD8⁺ (dados não mostrados).

3.3.2 Resposta inflamatória nos linfonodos cervicais e pré-escapulares

Após a segunda imunização, os bovinos vacinados com a mc²- CMX apresentaram acentuada linfadenomegalia dos linfonodos cervicais e pré-escapulares. 90 dias após a última imunização foi então realizada a biópsia dos linfonodos e os mesmos apresentavam hiperplasia folicular, pouco edema sem a presença de células polimorfonucleares. Não houve infiltrado inflamatório ou formação de granuloma e nenhuma área de necrose foi encontrada nos cortes sequenciais dos linfonodos (Fig.3).

3.3.3 Teste intradérmico simples (PPD)

Antes do início do protocolo vacinal e ao final dos experimentos, os animais foram submetidos ao teste do PPD simples e mantiveram-se negativos.

3.4 Discussão

Neste estudo evidenciou-se a capacidade da vacina mc²- CMX em induzir anticorpos IgG específicos nos bovinos testados. Contudo, a vacina não foi capaz de estimular células TCD4⁺ e TCD8⁺ específicas, o que se refletiu na falta de resposta *in vitro* por estas células para a proteína de fusão CMX. Os linfonodos cervicais e pré-escapulares dos animais vacinados apresentaram hiperplasia folicular característica de proliferação celular. Os animais permaneceram negativos ao teste intradérmico simples ao final do experimento.

Nos últimos anos, muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de aumentar a capacidade protetora da BCG, além da busca por novos antígenos imunogênicos do *M. tuberculosis* como de outras micobactérias atípicas, com vistas ao desenvolvimento de vacinas mais eficazes.

Uma resposta vacinal efetiva contra a TB ou contra a TBb, deve ser capaz de eliminar a infecção e estabelecer uma proteção duradoura. Logo, para que uma vacina seja eficaz é imprescindível que ocorra indução de células efetoras e de memória além da produção de um nível significativo de anticorpos. Sabe-se que os anticorpos possuem um importante papel nas infecções por micobactérias, pois induzem a atividade microbicida dos macrófagos, atraem monócitos, neutrófilos e células NK para o sítio de infecção, além de ativarem células

dendríticas e macrófagos, promovendo o processamento e apresentação de antígenos por essas células (Schuurhuis et al. 2006, Geissmann et al. 2010, Kaufmann & Ottenhoff 2012).

No presente estudo constatou-se um aumento progressivo nos níveis de anticorpos IgG específicos anti CMX em bovinos que foram imunizados com a vacina mc²- CMX (Fig. 1). Apesar de os animais terem respondido inicialmente a vacina composta apenas pelo *M. smegmatis* (mc²), a diferença nos níveis de anticorpos entre os bovinos vacinados com mc²-CMX ultrapassa aquela obtida pelos vacinados com mc² após a segunda imunização (p<0,05). Estes resultados comprovam a imunogenicidade da proteína de fusão e, portanto, da vacina mc²-CMX. Pesquisas anteriores demonstraram a capacidade de uma vacina *M. smegmatis* recombinante expressando uma proteína de fusão composta pelos antígenos ESAT- 6 e CFP- 10 de *M. tuberculosis* em produzir elevados títulos de anticorpos em camundongos (Zhang et al. 2010). Outro trabalho desenvolvido por Sweeney et al. (2011) constatou a capacidade de uma vacina *M. smegmatis* mutante, que apresentava o gene *esx-3* do *M.tuberculosis*, em induzir resposta imune protetora em camundongos após desafio com Mtb. Dados que também corroboram com os resultados aqui expostos foram encontrados por Sousa et al. (2012) que, utilizando a CMX como vacina de subunidade proteica em camundongos, observaram um aumento na produção de IgG1 e IgG2a, além de elevados níveis de IgG e IgM específicos anti CMX nos soros de pessoas com tuberculose ativa. Estes achados embasam o uso do *M. smegmatis* como possível vetor para o desenvolvimento de vacinas recombinantes com capacidade de induzir imunidade protetora contra a tuberculose. Igualmente, a proteína de fusão CMX pode ser considerada como candidata na formulação de vacinas recombinantes ou de subunidade proteica, já que apresentou antigenicidade e imunogenicidade em diferentes modelos de estudo.

Como na maioria das infecções causadas por patógenos intracelulares, sabe-se que a resposta imunológica mediada por células tem um papel fundamental na proteção contra a TB (Orme et al. 1992; Cooper 2009). Os linfócitos TCD4⁺ possuem um importante papel contra o *Mycobacterium sp* por produzirem IFN- γ e TNF, citocinas cruciais na resposta imune contra infecções micobacterianas (Ottenhoff et al. 2002). Além deste grupo celular, os linfócitos

TCD8⁺ também contribuem na proteção contra a TB (Ladel et al. 1995, Ottenhoff et al. 2008), pois utilizam diversos mecanismos de ataque às células infectadas, principalmente os fagócitos que são o alvo das micobactérias, além de reconhecerem outras populações celulares não fagocíticas, como as células epiteliais que também podem ser infectadas pelo agente (Hernandez-Pando et al. 2000). Apesar da boa resposta humoral induzida pela mc²- CMX aqui evidenciada e pela CMX associada ao adjuvante CpG DNA (Sousa et al. 2012), a resposta celular específica promovida pela vacina neste estudo não foi suficiente, pois mesmo após a revacinação, não houve aumento das células TCD4⁺ (Fig. 2) e TCD8⁺ (dados não mostrados) produtoras de IFN- γ após estímulo com CMX.

Explicações para falhas em vacinas contra a tuberculose humana e animal são encontradas na literatura. Algumas pesquisas afirmam que um contato prévio com micobactérias ambientais pode diminuir a resposta imune induzida por vacinas contra a TB. Estudo realizado por BLACK et al. (2002) analisando populações do Reino Unido e do Malawi, demonstrou que essa última teve níveis menores de IFN- γ após um ano da vacinação com a BCG, e atribuíram este fato a pré-exposição da mesma a micobactérias ambientais. Esta falha da vacinação com a BCG na população do Malawi é consistente com estudos em animais onde evidenciaram que um contato prévio com outras micobactérias pode bloquear a multiplicação do BCG, bem como a indução de proteção contra a tuberculose (Orme et al. 1986, Brandt et al. 2002, Buddle et al. 2002, De Lisle et al. 2004).

Para comprovar o real potencial da vacina mc²- CMX em induzir resposta imunológica protetora em bovinos, maiores análises se fazem necessárias. É preciso avaliar o subconjunto de células T envolvidas na resposta a vacina e sua capacidade em gerar células de memória e outros mediadores inflamatórios, além de submeter os animais ao desafio experimental com *M. bovis*.

O desenvolvimento de novas terapias contra doenças infecciosas que atingem a população humana é um constante desafio para a comunidade científica. Quando se trata da tuberculose, uma zoonose que além de gerar alta mortalidade em humanos causa prejuízos na economia mundial, esses desafios se tornam ainda maiores. Logo, é necessário que as pesquisas de desenvolvimento de novas vacinas contra a TB voltem seu foco para os estudos em campo com bovinos e não se limitem as análises em animais de laboratório

que, em sua maioria, não representam a infecção em humanos de maneira fidedigna

Referências

- Almeida, C.M.C.; Júnior Vasconcelos, A.C.; Kipnis, A.; Andrade, A.L.; Junqueira-Kipnis, A.P. Humoral Immune Response of Tuberculosis Patients in Brazil Indicate Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB. *Clin Vac Immunol.* 2008 15 (3): 579- 581.
- Ameni, G.; Vordermeier, M.; Aseffa, A.; Young, D.B.; Hewinson, R.G. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 17(10): 1533– 1538.
- Andersen, P.; Doherty, T.M. The success and failure of BCG — implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005 3: 656–662
- Anon. Bovine tuberculosis erradication: uniform methods and rules. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Washington, 2004.
- Backus, K.M.; Boshoff, H.I.; Barry, C.S.; Boutureira, O.; Patel, M.K. Uptake of unnatural trehalose analogs as a reporter for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Chem. Biol.* 2011 7: 228.
- Black, G.F.; Weir, R.E.; Floyd, S.; Bliss, L.; Warndorff, D.K.; Crampin, A.C.; Ngwira, B.; Sichali, L.; Nazareth, B.; Blackwell, J.M.; Branson, K.; Chaguluka, S.D.; Donovan, L.; Jarman, E.; King, E.; Fine, P.E.M.; Dockrell, H.M. BCG-induced increase in interferon gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet.* 2002 359: 1393-1401.
- Brandt, L.; Cunha, J.F.; Olsen, A.W.; Chilima, B.; Hirsch, P.; Appelberg, R.; Andersen, P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine: Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis. *Inf. Immun.* 2002 70 (2) 672: 678.
- Buddle, B.M.; Wards, B.J.; Aldwell, F.E.; Collins, D.M.; De Lisle, G.W. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine.* 2002 20: 1126–1133.
- Buddle, B.M.; Wedlock, D.N.; Parlane, N.A.; Corner, L.A.; De Lisle, G.W.; Skinner, M.A. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infect Immun.* 2003 71: 6411- 6419.

- Buddle, B.M.; Denis, M.; Aldwell, F.E.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Wedlock, D.N. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG by a combination of systemic and oral routes. *Tuberculosis*. 2008 88: 595– 600.
- Buddle, B.M.; Aldwell, F.E.; De Lisle, G.W.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Wedlock, D.N. Low oral BCG doses fail to protect cattle against an experimental challenge with *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 2011 91: 400–405.
- Cooper, A. Cell mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2009 27: 393–422.
- De Lisle, G.W.; Wards, B.J.; Buddle, B.M.; Collins, D.M. The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis*. 2005 85: 73–79.
- Fine, P.E. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev. Inf. Dis.* 1989 11 (2): 353– 359.
- Fischer, A.H.; Jacobson, K.A.; Rose, J.; Zeller, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protocols*. 2008 doi: 10.1101/pdb.prot4986.
- Geissmann, F.; Manz, M.G.; Jung, S.; Sieweke, M.H.; Merad, M.; Ley, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010 327: 656–661.
- Gicquel, B. Towards new mycobacterial vaccines. *Dev. Bio. Stand.* 1994 82: 171–178.
- Hernandez- Pando, R.; Jeyanathan, M.; Mengistu, G.; Aguilar, D.; Orozco, H.; Harboe, M.; Rook, G.A.; Bjune, G. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*. 2000 356: 2133–2138.
- Hope, J.C.; Thom, M.L.; Mc Aulay, M.; Mead, E.; Vordermeier, H.M.; Clifford, D.; Hewinson, R. G.; Villarreal- Ramos, B. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 18: 373–379.
- Kauffman, S.H.E.; Ottenhoff, T.H.M. Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity. *Trends in Immunol.* 2012 33 (7); 373- 379.
- Ladel, C.H.; Daugelat, S.; Kaufmann, S.H. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur J Immunol.* 1995 25: 377–384

- Lopez- Valencia, G; Renteria- Evangelista, T.; Williams, J.J.; Licea- Navarro, A.; Mora-Valle, A.L.; Medina- Basuto, G. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 2010 88: 44– 49.
- Orme I.M.; Roberts, A.R.; Collins, F.M. Lack of evidence for a reduction in the efficacy of subcutaneous BCG vaccination in mice infected with nontuberculous mycobacteria. *Tubercle.* 1986 167: 41– 46.
- Orme, I.M.; Miller, E.S.; Roberts, A.D.; Furney, S. K.; Griffin, J.P.; Dobos, K.M.; Chi, D.; Rivoire, B.; Brennan, P.J. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J. Immunol.* 1992 148: 189-196.
- Ottenhoff, T.H.M.; Verreck, F.A.; Lichtenauer- Kaligis, E.G.; Hoeve, M.A.; Sanal, O.; Van Dissel, J.T. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet.* 2002 32: 97–105.
- Ottenhoff, T.H.M; Lewinsohn, D.A.; Lewinsohn, D.M. Human CD4 and CD8 T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*: antigen specificity, function, implications and applications, p 119–156. In: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA (Eds), *Handbook of tuberculosis*, 2008. Immunology and cell biology, Weinheim.
- Ottenhoff T.H.M. New pathways of protective and pathological host defense to micobactéria. *Trends in Microb.* 2012 20 (9): 419- 428
- Reyes Perez, A. Modification of the fite-faraco technique for the staining of acid-alcohol fast bacilli in histologic sections. *Rev Latinoam Anat Patol.* 1963 7: 81-85.
- Rizzi, C.; Bianco, M.V.; Bianco, F.C.; Soria, M.; Gravisaco, M.J.; Montenegro, V.; Vagnoni, L.; Garbaccio, S.; Delgado, F.; Leal, K.S.; Cataldi, A.A.; Dellagostin, O.A.; Bigi, F. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. *Plos One.* 2012 7 (12): e51396. doi:10.1371/journal.pone.0051396.
- Schuurhuis, D.H.; Van, M.N.; Ioan- Facsinay, A.; Jiawan, R.; Camps, M.; Nouta, J.; Melief, C.J.; Verbeek, J.S.; Ossendorp, F. Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine. *J Immunol.* 2006 176: 4573–4580.
- Silva, B.D.S.; Silva, E.B.; Nascimento, I.P.; Reis, M.C.G.; Kipnis, A.; Junqueira-Kipnis, A.P. MPT- 51/ CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine.* 2009 27: 4402- 4407.

- Silva, E.B.; Silva, B.D.S.; Leon, J.R.R.; Kipnis, A.; Santos, I.K.F.M.; Junqueira-Kipnis, A.P. Using BCG, MPT- 51 and Ag85 as antigens in an indirect ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis. *The Vet J.* 2011 187: 276- 278.
- Sousa, E.M.; Costa, A.C.; Trentini, M.M.; Filho, J.A.A.; Kipnis, A.; Junqueira-Kipnis, A. P. Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in mice and active TB infection. *Plos One.* 2012 7 (10) e47781 doi: 10.1371/journal.pone.0047781.
- Spratt, J.M.; Britton, W.J.; Triccas, J.A. In vivo persistence and protective efficacy of the bacille Calmette Guerin vaccine overexpressing the HspX latency antigen. *Bioengineered Bugs.* 2010 1 (1): 61-65
- Sweeney, K.A.; Dao, D.N; Goldberg, M.F.; Hsu, T.; Venkataswamy, M.M.; Tamayo, M.H.; Ordway, D.; Sellers, R.S.; Jain, P.; Chen, B.; Chen, M.; Kim, J.; Lukose, R.; Chan, J.; Orme, I.M.; Porcelli, S.A.; Jacobs, W.R. A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 2011 7 (10): 1261-1268.
- Vordermeier, M.; Gordon, S. V.; Hewinson, R. G. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Vet Microbiol.* 2011 151: 8-13
- Waters, W.R.; Palmer, M.V.; Buddle, B.M.; Vordermeier, H.M. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine.* 2012 30 (16): 2611- 2622.
- Wedlock, D.N.; Denis, M.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Buddle, B.M. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN γ post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007 118: 50– 58.
- World Health Organization. WHO Report 2009: Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva. World Health Organization; 2009.
- Zhang, H.; Peng, P.; Miao, S.; Zhao, Y.; Mao, F.; Wang, L.; Bai, Y.; Xu, Z.; Wei, S.; Shi, C. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti- mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. *Scand. J. Immunol.* 2010 72: 349-357.

Legenda das Figuras

Figura 1. Cinética dos níveis séricos de anticorpos anti- mc²- CMX em bovinos imunizados com mc²- CMX, mc² e PBS. Os animais foram imunizados com 1x10⁷ CFU/mL das vacinas, por via subcutânea. Soros obtidos em diferentes tempos após a vacinação foram avaliados em ELISA. Os pontos demonstram a densidade óptica obtida para cada animal e a barra representa média e o desvio padrão obtido para cada grupo. (n=10). *Diferença estatística entre os grupos PBS e mc²- CMX (p<0.05).

Figura 2. Indução de IFN- γ por células TCD4⁺. Bovinos foram revacinados 200 dias após a última imunização e os leucócitos sanguíneos foram estimulados *in vitro* com CMX. Foi analisada a porcentagem de células TCD4⁺IFN- γ ⁺ e não houve diferença significativa.

Figura 3. Histopatológico do linfonodo pré- escapular de um bovino vacinado com a mc²- CMX. O linfonodo foi seccionado e corado com hematoxilina e eosina (H&E) (A) e com a coloração de Fite-faraco (B) 90 dias após a última imunização do animal. Fotografia representativa do linfonodo de um bovino visualizado em um aumento de 40X.

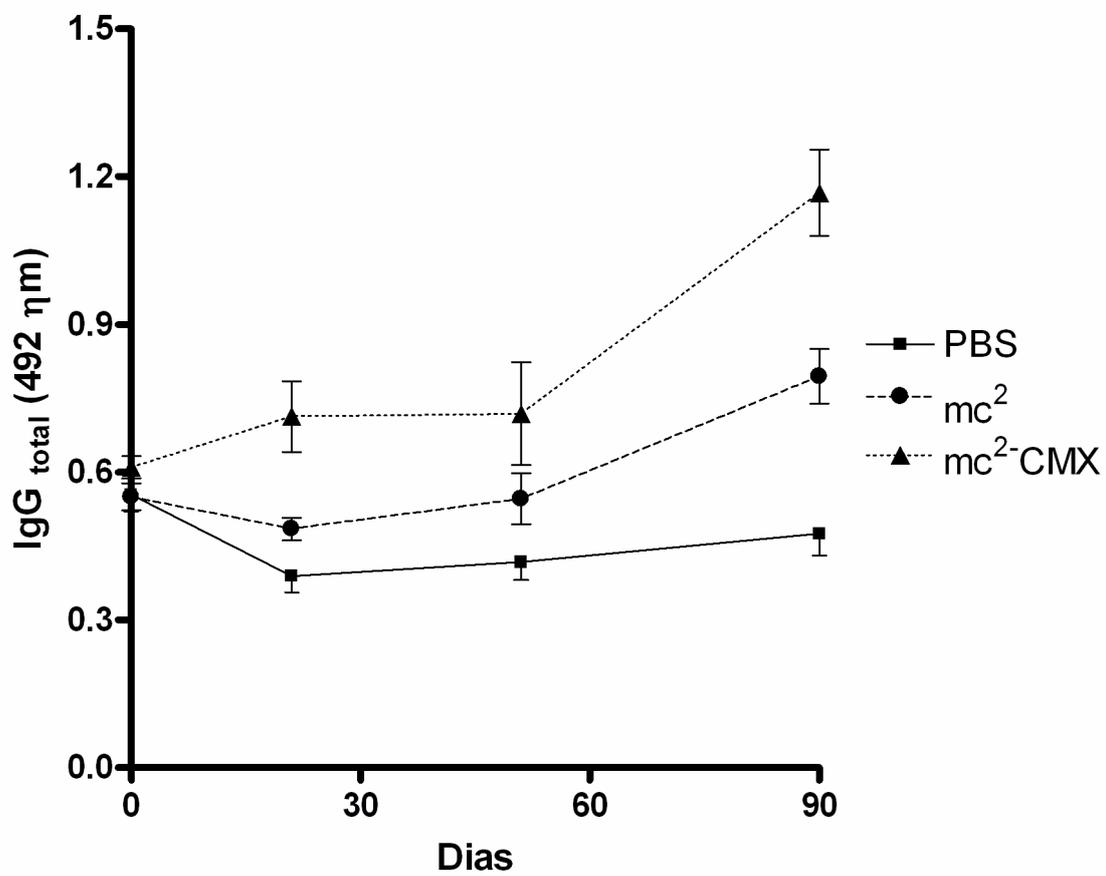


Figura 1.

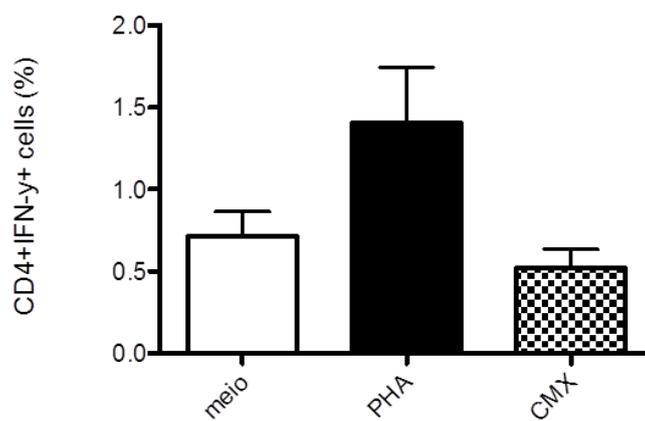


Figura 2.

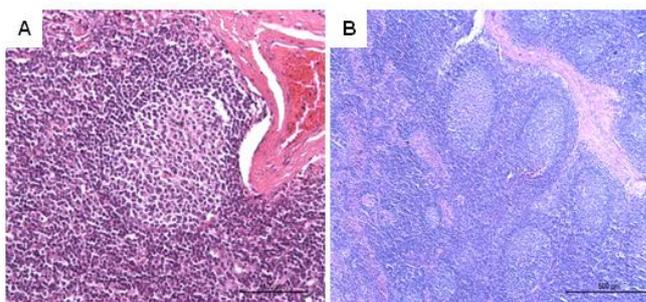


Figura 3.

CAPÍTULO 04 – Considerações Finais

Com esta tese buscou-se contemplar duas vertentes: a homeopatia e a alopatia; com a discussão de um modelo onde se utilizou as micobactérias *M. massilienses* e *M. smegmatis* em uma proposta para a construção de novas vacinas, contribuindo assim com a redução da incidência das doenças infecciosas e no combate as doenças emergentes, principalmente nos países mais pobres.

Na primeira vertente, encontra-se o mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos que é um dos temas mais comentados entre os homeopatas de todos os tempos. Relatos de casos de médicos homeopatas usando esses medicamentos levou a cura de pacientes tanto em humanos como animais, como citado na literatura.

Com a procura de uma resposta ao tratamento de vacas leiteiras que melhoram a contagem de células somáticas (CCS) após o uso de um produto homeopático comercial, iniciou-se a busca científica da resposta imunológica dos medicamentos homeopáticos, na medicina veterinária no Estado de Goiás.

A terapêutica convencional para a mastite nos bovinos é a antibioticoterapia que provoca problemas de saúde pública pela presença de seus resíduos no leite. A crescente procura de produtos lácticos de alta qualidade, o qual se espera que os alimentos sejam produzidos com o mínimo possível de resíduos, provoca uma tendência progressiva de adaptação, por parte dos produtores e das indústrias leiteiras. Tornando-se necessário desenvolvimento de técnicas preventivas para o controle da mastite. Por isso a investigação da atuação dos medicamentos homeopáticos e o refinamento nas pesquisas e as metodologias de avaliações desses produtos torna-se necessário.

Utilizando um dos princípios da homeopatia o "Princípio Similia", também conhecido como o "princípio da similitude" ou também como o "Simile", o uso da micobactéria *M. massilienses* para o preparo de um nosódio para ser usado como vacina em camundongos Balb/c, onde foi utilizado em experimentos anteriores obtendo resposta imunológica. Sendo assim poderia ser utilizado em ultra diluições seriado, neste experimento de 1cH até 30cH, onde na homeopatia tradicional utilizam-se comumente as diluições 6cH, 12cH e 30cH empiricamente, podendo essas diluições ser eficaz ou não. O propósito foi saber se essa

premissa era verdadeira, com resposta ao experimento notamos que não é bem assim, quando aplicamos um medicamento homeopático temos várias diluições que podem proteger os camundongos, quando outra não protege e outras que acabam prejudicando ainda mais, formando uma curva senóide.

Quando outros camundongos foram desafiados, agora com diluições específicas, novamente foi confirmada a proteção e a não proteção e, teste de imunoenzimático (ELISA), mostrou que a produção IgG2a caracterizando resposta humoral.

Com esses resultados, vislumbra-se a possibilidade de estudar vários medicamentos homeopáticos previamente escolhidos e investigar qual seria a melhor diluição para obter melhores resultados, definindo os tratamentos ou as prevenções mais confiáveis e mais científicas e menos empírica no contexto da homeopatia. Sendo este trabalho de grande relevância, sobretudo o qual pode indicar o medicamento similar a doença e também indicar a potência similar.

Na segunda vertente temos as vacinas alopáticas onde nas últimas duas décadas o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas da imunologia e da biologia molecular, lançou as bases de um desenvolvimento sem precedentes de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação em todo mundo.

O processo de erradicação da tuberculose bovina em vários países já é uma realidade com isso o governo implantou um programa Nacional de erradicação da brucelose e da tuberculose pensando que possa ocorrer uma barreira aos produtos brasileiros em decorrência da presença dessas enfermidades em nosso rebanho.

Portanto, a proposta de testar uma vacina contra tuberculose desenvolvida no laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas da UFG utilizando os epítomos imunodominantes, Ag85C, MPT51 e HspX de *M. tuberculosis*, em um plasmídeo (PLA71/Fusão) inserido na micro bactéria *M. Smegmatis*, em modelo animal representou uma grande oportunidade buscar solução para um problema tão importante para a pecuária bovina brasileira.

Analisando a cinética da resposta a vacina viva recombinante verificou-se um aumento no nível de anticorpos da classe IgG específicos detectados no soro dos bovinos vacinados, o que sustenta a proposta de uma nova vacina.

Um grande avanço foi obtido ao constatar que os animais apresentaram teste de tuberculização negativos após as imunizações, sugerindo que não ocorreu reação cruzada. Apesar da ausência de estímulo da imunidade celular.

Faz-se necessária a adoção de medidas que acelere novos estudos e teste novas vacinas na erradicação da tuberculose de forma a manter os importadores e abrir novos mercados consumidores.

Mesmo que já existam recursos tecnológicos para promover o diagnóstico e o controle da tuberculose novas pesquisas devem ser conduzidas para eliminar o problema de saúde pública no Brasil, por meio do desenvolvimento de novas vacinas.