

EFEITO DO LEVAMISOLE SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA DE COBAIOS TRATADOS COM VACINA ANTIAFTOSA INATIVADA. §

José de Ângelis CÔRTEZ*
J. GUERRERO**
Cezar E. ENRIQUEZ ROZAS***
Fumio Honma ITO***
Sílvia Arruda VASCONCELLOS**
J.A.L. de SOUZA****

RFMV-A/11

CÔRTEZ, J.A.; GUERRERO, J.; ENRIQUEZ ROZAS, C.E.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A.; SOUZA, J.A.L. *Efeito do Levamisole sobre a resposta imunitária de cobaias tratadas com vacina antiaftosa inativada.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 15 (1): 087-092, 1978

RESUMO: O título de proteção de uma vacina antiaftosa trivalente (O-A-C) inativada foi restabelecido em dois grupos de 96 cobaias, um dos quais recebeu Levamisole na dose diária de 2,5 miligramas por quilo durante três dias consecutivos a partir do momento da vacinação e o outro foi utilizado como controle. A vacina foi empregada nas diluições 10-0,000, 10-0,602, 10-1,204 e 10-1,806 e os animais desafiados aos 21 dias após a vacinação com 158 DG50 do vírus "C" Waldmann da febre aftosa. Embora não tenha sido verificada uma diferença significativa entre os títulos de proteção da vacina nos dois grupos, uma análise pareada dos valores obtidos com cada uma das diluições da vacina revelou um efeito favorável do Levamisole apenas quando a vacina foi empregada na diluição 10-1,806.

UNITERMOS: Febre aftosa*; Vacinas*; Levamisole*.

INTRODUÇÃO

A proteção específica dos suscetíveis com o emprego de vacina inativada tem sido uma das principais armas empregadas no combate à febre aftosa, particularmente em países onde esta doença ocorre de forma endêmica.

O sucesso desta medida depende, fundamentalmente, da qualidade imunogênica do antígeno empregado na produção da vacina e da capacidade do hospedeiro considerado em oferecer uma resposta imunitária apreciável e duradoura frente a diferentes tipos de antígenos. A este respeito o papel da imunidade celular tem

§ Trabalho realizado em colaboração entre o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

* Professor Livre-Docente.

** Professor Assistente Doutor.

*** Auxiliar de Ensino.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

**** Sorologista do Laboratório de Febre Aftosa do Ministério da Agricultura em Barretos - S.Paulo.

sido destacado recentemente⁸, ressaltando-se a necessidade de serem desenvolvidos métodos eficazes e seguros para a indução da imunidade celular frente aos componentes de vacinas inativadas, particularmente aquelas de natureza viral⁷.

O 2-3-5-6 tetra hidro 6 fenil imido tiasol (Levamisole) é um produto químico que interfere com os mecanismos de imunidade celular^{1,3,8}, e, de acordo com a posologia adotada atua como modular ou restaurador do sistema imunitário reativando funções deprimidas notadamente em células polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos T^{1,2,3,4,16}. Aparentemente este produto atua incrementando os níveis intracelulares de Monofosfato de Guanosina cíclica (GMPc), em células nas quais este nucleosídeo encontra-se diminuído, ou o seu antagonista, o Monofosfato de Adenosina cíclica (AMPc) aumentando. O balanço GMPc/AMPc é crucial para o conveniente funcionamento do sistema imunitário³.

A utilização do Levamisole como elemento auxiliar em vacinações foi descrita para a doença de Newcastle⁶ e para a brucelose^{11,12}.

Em febre aftosa é relatado o emprego do Levamisole associado à vacinação de bovinos em um experimento que avalia os níveis de anticorpos circulantes¹³, não tendo sido, contudo, caracterizada qualquer interferência atribuível ao uso do produto em apreço.

No presente estudo objetivou-se apreciar os efeitos do Levamisole sobre a resposta imunitária de cobaios tratados com vacina antiaftosa inativada.

Admitiu-se como hipótese de nulidade (H_0) que o emprego do Levamisole em cobaios vacinados contra a febre aftosa não exerceria qualquer influência sobre a resposta imunitária desses animais. O nível de rejeição do H_0 foi fixado em 0,05.

MATERIAL E MÉTODOS

Duzentos e quarenta cobaios adultos, machos, pesando $500 \pm$ gramas foram utilizados.

A vacina antiaftosa empregada consistiu do produto comercial trivalente contendo suspensões dos vírus "O" Vallée, "A" Vallée e "C" Waldmann da febre aftosa, obtidas em cultura de células BHK, inativadas pelo Acetil Etileno Imine (AEI) e adsorvidas pelo hidróxido de Alumínio.

O vírus do desafio foi do tipo "C" Waldmann da febre aftosa, representado pelo linfa de vesículas podais de cobaios, com título infectante igual a $10^{5,25} \text{DG}_{50} / \text{ml}$, mantido à temperatura de -30°C até o momento do uso.

O levamisole foi empregado na dose diária de 2,5 miligramas por quilo de peso, aplicado pela via intramuscular, durante três dias consecutivos a partir do momento da administração da vacina. O produto foi cuidadosamente diluído para que o volume da dosificação diária, por animal, fosse de aproximadamente 0,25 mililitros.

As diluições do vírus como da vacina foram efetuadas em solução salina de EARLE e o título de proteção da vacina foi determinado segundo os princípios estabelecidos por HENDERSON e GALLOWAY⁵.

Segundo a metodologia empregada, a vacina foi submetida a diluições em progressão geométrica de razão quatro, obtendo-se as concentrações $10^{-0,000}$; $10^{-0,602}$; $10^{-1,204}$ e $10^{-1,806}$, as quais foram aplicadas, respectivamente, em grupos de 48 animais, pela via subcutânea, com uma dose de 0,5 mililitros por animal.

À medida que se procedia a vacinação, os animais eram separados, alternadamente, constituindo-se portanto dois grupos destinados a receber os tratamentos A e B.

O tratamento A consistiu na aplicação do Levamisole conforme a posologia anteriormente descrita e o tratamento B, realizado em paralelo, foi representado pelo emprego de água destilada nas mesmas condições de volume, via e frequência de aplicação indicadas no tratamento A.

Decorridos 21 dias da vacinação todos os animais sofreram agressão vírica pela via intradermo-plantar, com uma dose de 0,1 mililitros da diluição $10^{-2,25}$ do vírus, estimada para conter $100 \text{ DG}_{50} / \text{cobaio}$.

O Controle da dose de vírus realmente empregada por ocasião do desafio foi efetuado pela titulação deste, em duplicatas, utilizando-se quatro diluições seriadas de razão dez, inoculadas em grupos de seis cobaios normais com o mesmo volume e via de aplicação já referidos.

Os animais foram mantidos em observação por um período de oito dias, sendo registradas para fins de interpretação das provas, as reações de generalização constatadas a partir do terceiro dia da inocula-

ção. Os títulos tanto na vacina como no controle do vírus foram calculados pelo método de REED e MUENCH¹⁰, e o erro padrão da dose protetora 50% foi determinado segundo a fórmula desenvolvida por PIZZI⁹.

RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se agrupados na tabela abaixo:

TABELA - Resultados da prova de determinação, em cobaios, do título de proteção de uma vacina antiaftosa, expressos em termos da proporção de animais que apresentaram generalização ao desafio pelo vírus "C" Waldmann da Febre Aftosa, segundo a diluição da vacina e o tratamento empregado. S. Paulo, 1978.

TRATAMENTOS DILUIÇÃO DA VACINA	A	B
	LEVAMISOLE	PLACEBO
10 ^{-0,000}	6/24	10/24
10 ^{-0,602}	14/24	16/24
10 ^{-1,204}	15/24	13/24
10 ^{-1,806}	17/24	24/24
DP ₅₀ (log ₁₀)	0,7568	0,4656
Erro padrão da DP ₅₀	0,1509	0,1459

A tabela apresentada mostra, em valores absolutos, para cada um dos tratamentos, os resultados da prova de determinação da dose protetora 50% (DP₅₀) da vacina antiaftosa utilizada. Inclui ainda, para os mesmos tratamentos, a DP₅₀ calculada e o correspondente erro padrão, expressos em logaritmo de base dez.

Ainda com base nos valores desta tabela, verifica-se que a análise dos dados obtidos com cada uma das diluições da vacina, pelo método do Qui quadrado com correção para continuidade¹⁴, revela os seguintes resultados: 0,843; 0,089, 0,086 e 6,020, respectivamente, para as diluições 10^{-0,000}; 10^{-0,602}; 10^{-1,204} e 10^{-1,806} da vacina.

A comparação destes resultados com o valor crítico da referida estatística para um grau de liberdade, ao nível de rejeição adotado, leva-nos a admitir que apenas com a vacina diluída a 10^{-1,806} é que foi possível detectar-se estatisticamente a influência do Levamisole sobre a resposta imunitária de cobaios vacinados contra a febre aftosa.

De fato a vacina empregada na diluição mais elevada ofereceu um maior grau de proteção aos animais tratados com o Levamisole, traduzido pela menor proporção de generalizações ao desafio ocorridos no grupo A quando comparada ao grupo controle correspondente.

O título infectante, em cobaios, da suspensão de vírus empregada para o desafio, calculado com base na média aritmética dos valores obtidos em duas titulações, foi de $10^{4,45} \text{DG}_{50}/\text{ml}$, revelando que a dose de vírus efetivamente utilizada foi 158DG_{50} por animal.

DISCUSSÃO

Embora os títulos da vacina, expressos em doses protetoras 50% (DP_{50}), obtidos com cada um dos tratamentos, possam sugerir, quando tomados em termos absolutos, uma superioridade dos resultados obtidos no grupo tratado com o Levamisole, os intervalos construídos com base no erro padrão, calculados para cada um dos tratamentos apresentam uma superposição de valores, indicando que os grupos A e B não podem ser considerados como pertencentes a duas populações distintas.

Por outro lado, analisando isoladamente os resultados obtidos com o emprego de cada uma das diluições da vacina, verifica-se uma diferença de comportamento entre os tratamentos A e B somente quando a vacina foi utilizada na diluição de $10^{-1,806}$.

Esta diversidade de comportamento, expressa em termos de uma menor proporção ($p < 0,02$) de generalizações decorren-

tes do desafio, revela um maior grau de proteção conferido pela vacina diluída a $10^{-1,806}$ aos animais tratados com o Levamisole em comparação com os do correspondente grupo controle.

Tal observação parece encontrar amparo em informações anteriores no sentido de que linfócitos T são geralmente suprimidos pela injeção de pequenas doses de antígenos¹⁵. Neste caso o maior grau de proteção conferido pela vacina, empregada em sua diluição mais elevada, ao grupo de cobaios tratados com o Levamisole, poderia dever-se à ação potencializadora deste produto reativando mecanismos de imunidade celular deprimidos em consequência da reduzida dose de antígeno administrada com a vacina.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho contamos com a colaboração do Grupo Executivo Estadual de Combate à Febre Aftosa, em São Paulo, a cuja direção apresentamos nossos melhores agradecimentos.

De modo particular, queremos agradecer ao Chefe do Laboratório de Febre Aftosa do Ministério da Agricultura, em Barretos, Dr. Iracídio Marques de Souza e sua equipe pela dedicação e facilidades que nos propiciaram.

RFMV-A/11

RFMV-A/11

CÔRTEZ, I.A.; GUERRERO, J.; ENRIQUEZ-ROZAS, C.E.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A.; SOUZA, J.A.L. *The effect of Levamisole on the immune of guinea pigs treated with an inactivated foot-and-mouth, disease vaccine (FMDV)*. Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 15 (1): 087-092, 1978

SUMMARY: *The protection titer of an inactivated trivalent "O", "A" and "C" Foot-and-Mouth disease (FMD) vaccine was assayed in two groups of 96 guinea pigs, one of them received levamisole at an animal daily dose of 2,5 mg/kg during the three days starting the day of the FMD vaccination and the other one was used as control. The range of vaccine dilutions was $10^{-0,000}$, $10^{-0,602}$, $10^{-1,204}$ and $10^{-1,806}$ and the animals were challenged at 21 days after vaccination with 158DG_{50} of FMD virus type "C" Waldmann. Although no significant difference was detected between the protection vaccine titer of the two groups, a paired analysis of each vaccine dilution result revealed a favorable effect of levamisole when the vaccine was used at a dilution of $10^{-1,806}$.*

UNITERMS: *Foot-and-Mouth Disease*, Vaccines* Antibody formation Levamisole**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – BALLARINI, G. Recenti acquisizioni sulla immuno-modulazione e prospettive di applicazioni in clinica veterinaria. *Riv. Zootec.vet.*, (6): 537-42, 1976.
- 2 – FEGIES, M. & GUERRERO, J. Treatment of Toxoplasmosis with levamisole. *Trans.R. Soc.Trop.Med.Hyg.*, 71 (2): 178-179, 1977.
- 3 – GUERRERO, J. & OLIVEIRA NETO, W. de levamisole – Um modulador químico da imuno-resposta celular. *Folha Med.*, 72 (6): 611-17, 1976.
- 4 – GUERRERO, J. Immunological Modulating Influence of levamisole. In: Proceedings of the Heartworm Symposium 77. (No prelo).
- 5 – HENDERSON, W.M.; GALLOWAY, I.A.; BROOKSBY, J.B. The use of culture virus in the preparation of foot and mouth disease vaccine. *J. Hyg.*, 51: 546-58, 1953.
- 6 – KULKARNI, V.B.; MULIBAGAL, A.N.; PARANJAPE, J.B.; KHOT, J.B.; MANDA, A.V. Immunostimulating effect of tetra-misole on antibody formation against Newcastle disease virus in chicks. *Indian vet. J.*, 50 (3): 225-7, 1973.
- 7 – ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD. Inmunidade celular y resistencia a las infecciones. Ginebra, 1973, 63 p. (Serie de informes técnicos, 519).
- 8 – ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD. Coadjuvantes inmunológicos. Ginebra, 1976. 43 p. (Serie de informes técnicos, 595).
- 9 – PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed Muench (Behrens) method. *Human Biology*. 22 (3): 151-90, 1950.
- 10 – REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent end-point. *Amer.J.Hyg.*, 27 (3): 493-7 1938.
- 11 – RENOUX, G. & RENOUX, M. Effect immunostimulant d'un Imidothiazole dans l'immunization des souris contre l'infection par *Brucella abortus*. *C.R.Acad.Sc.Paris. serie D*. 272: 349-50, 1971.
- 12 – RENOUX, G. & RENOUX, M. Antigenic competition and nonspecific immunity after a rickettsial infection in mice: restoration of antibacterial immunity by Phenyl-Imidothiazole treatment. *J. Immunol.*, 109 (4): 761-5, 1972.
- 13 – SCHMIED, L.M. & ROSENBUSCH, C. Efectos del levamisole sobre el indice de suero proteccion em primovacunacion antiaftosa. *Rev. Met-vet.*, (B.Aires). 54 (6): 3-7, 1973.
- 14 – SIEGEL, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York, Mc Graw Hill, 1956. 312 p.
- 15 – TIZARD, I.R. An introduction to Veterinary Immunology. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Pa. 1977. 367 p.
- 16 – WILLOUGHBY, D.A. Levamisole in Theumatoid Arthritis. In: Forum on Immunotherapy. Published by the Royal Society of Medicine. London, 1 (2): 5-14, 1977.

Aprovado para publicação em 04-09-1978