

## EFEITOS DE IMUNOPOTENCIADORES NÃO ESPECÍFICOS NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Schistosoma mansoni*. I. LEVAMISOLE

Silvia M. L. MONTENEGRO (1), Kirte M. TEIXEIRA (2), Eridan M. COUTINHO (1), Frederico G. C. ABATH (1) &  
Alexandre B. de CARVALHO (1)

### RESUMO

Os efeitos do levamisole nas alterações histopatológicas, resistência do hospedeiro e quimiotaxia "in vivo" foram estudados na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* em camundongos da linhagem C57B1/10. O tratamento profilático resultou em um aumento no número de vermes adultos obtidos pela perfusão e também em uma taxa de mortalidade maior ( $p < 0,05$ ). As alterações histopatológicas (fígado e intestino) foram similares em todos os grupos. Uma redução significativa da quimiotaxia "in vivo" ocorreu em camundongos controles infectados, assim como naqueles submetidos a tratamento profilático com levamisole. A atividade quimiotática atingiu os mesmos níveis dos camundongos controles normais (não-infectados e não-tratados com levamisole), quando o esquema curativo foi usado. O levamisole parece aumentar a susceptibilidade de camundongos da linhagem C57B1/10 à infecção pelo *S. mansoni* quando administrado antes da infecção e normaliza a atividade quimiotática, quando dado após a infecção.

**UNITERMOS:** Levamisole; *Schistosoma mansoni*; Imunopotenciadores; Quimiotaxia.

### INTRODUÇÃO

O levamisole (1-2, 3, 5, 6 — tetrahydro — 6 fenylimidazol (2, 1b) —thiazol monohydrochloro), foi inicialmente usado como droga anti-helmíntica. Posteriormente, RENOUX & RENOUX, 1974<sup>14</sup> descobriram seu papel imunopotenciador em camundongos infectados com *Bruceella* e imunizados com eritrócitos de carneiro.

Segundo HADDEN et al., 1977<sup>8</sup>, o levamisole é uma droga com duas ações: a primeira é produzida pela metade imidazólica, que aumenta o GMP cíclico nos linfócitos T e a segunda é produ-

zida por um anel contendo enxofre e de ação desconhecida. Esta droga tem, também, a capacidade de aumentar a atividade quimiotática dos polimorfonucleares, aumentando a síntese precoce do cGMP ou protegendo as células e os leucoatraentes do processo de deativação<sup>15, 17</sup>.

Como existe ampla evidência de que a imunidade do hospedeiro ao *S. mansoni* pode ser afetada por mecanismos inespecíficos<sup>3, 5, 7, 12</sup>, foram investigados os efeitos do uso do levamisole

(1) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães — FIOCRUZ. Av. Moraes Rêgo, S/Nº. Cidade Universitária. CEP 50730 Recife, Pernambuco, Brasil.  
(2) Bolsista do CNPq.

nessa parasitose, quanto a resistência do hospedeiro, alterações histopatológicas e quimiotaxia "in vivo".

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais** — Camundongos isogênicos, machos, adultos, da linhagem C57Bl/10, com idade variando de 6-8 semanas foram obtidos do Biotério Central do CPqAM/Fiocruz. O peso médio foi de  $14,6 \pm 1,9$  g.

**Infecção** — Grupos experimentais e controles foram infectados por via percutânea com aproximadamente 90 cercárias de *Schistosoma mansoni*, durante 60 minutos.

**Droga** — O levamisole, obtido da Johnson & Johnson, (São Paulo, Brasil) foi usado para tratamentos profilático e curativo na dose de 0,1 mg/dia, administrado por via subcutânea, 7 dias antes e 7 dias após a infecção, respectivamente.

### Grupos experimentais

**Grupo 1** — Avaliação da resistência do hospedeiro. Os camundongos foram sacrificados 60 dias após a infecção e tiveram o sistema portomesentérico perfundido segundo a técnica de SMITHERS & TERRY, 1965<sup>16</sup>.

**Grupo 2** — Estudo histopatológico. Os camundongos foram sacrificados 60 dias após a infecção, o fígado e o intestino foram removidos, após exame macroscópico dos mesmos. O intestino foi dividido em três partes de igual comprimento (proximal, medial e distal) e amostras de cada uma delas, bem como do fígado, foram fixadas em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina, cortadas numa espessura de  $5 \mu\text{m}$  e coradas rotineiramente pela hematoxilinaeosina (H.E.).

**Grupo 3** — Estudo da quimiotaxia de leucócitos "in vivo". Os camundongos foram submetidos à técnica da bolha de ar de LAWMAN et al., 1984<sup>11</sup> modificada por ABATH et al., 1986<sup>1</sup> 30 dias após a infecção pelo *S. mansoni*. O quimiotático usado foi a proteína A do *Staphylococcus aureus* (Sigma), injetando-se 0,1 ml da

solução de proteína A (100 ng/ml) com 0,9 ml de ar em uma seringa de 1 ml, por via subcutânea, no dorso do camundongo. Duas horas depois a bolha era retirada, corada pelo Giemsa e examinada ao microscópio óptico<sup>1</sup>.

Todos os grupos experimentais foram subdivididos em dois sub-grupos de 20 camundongos cada um, destinados a tratamentos profilático e curativo pelo levamisole.

**Grupos Controles** — Para cada um dos grupos experimentais havia um grupo controle não tratado com levamisole. Para o grupo experimental 3, havia dois sub-grupos controles: controle 1 (camundongos não infectados com *S. mansoni* e não tratados com levamisole) e controle 2 (camundongos infectados com *S. mansoni* e não tratados com levamisole).

**Análise estatística** — Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância. O nível de probabilidade (p) considerado significativo foi de 0,05.

## RESULTADOS

### 1 — Resistência à infecção pelo *S. mansoni*

O grupo submetido a tratamento profilático apresentou maior número de vermes adultos, e maior taxa de mortalidade, comparado aos controles ( $p < 0.05$ ). Os grupos controles, não tratados e aqueles com tratamento curativo pelo levamisole tiveram comportamento semelhante (Tab. 1).

### 2 — Aspectos histopatológicos

As lesões histopatológicas observadas foram semelhantes, nos grupos experimentais e controle. As alterações hepáticas se caracterizavam por numerosos granulomas periovulares, principalmente do tipo exsudativo e presença eventual de vermes adultos de ambos os sexos em ramificações intra-hepáticas da veia porta. No intestino havia presença de ovos viáveis em todas as camadas, particularmente mucosa e submucosa, parecendo haver maior concentração de granulomas no intestino delgado, em toda a sua extensão.

### 3 — Estudo quimiotático “in vivo”

No estudo quimiotático de polimorfonucleares “in vivo”, observou-se uma redução dessa atividade no controle 2 (camundongos infectados pelo *S. mansoni* e sem tratamento pelo levamisole. Fig. 1B), bem como naqueles tratados profilaticamente (Fig. 1C). Essa quimiotaxia, contudo, voltava a atingir níveis semelhantes aos do grupo controle 1 (Fig. 1A) quando era instituído o tratamento curativo pelo imunopotenciador, com resultado estatisticamente significativo (Fig. 1D).

O estudo quimiotático dos mononucleares, todavia, não mostrou diferença entre os grupos experimentais e controles. Esses resultados acham-se demonstrados na tabela 2.

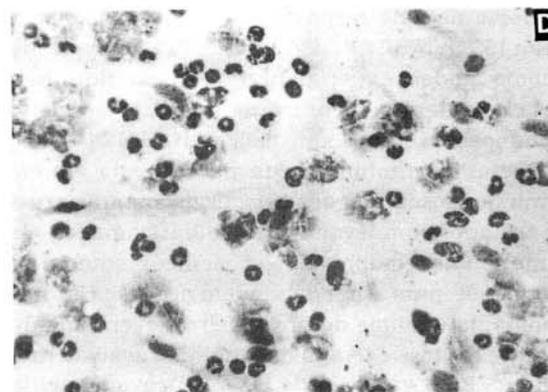
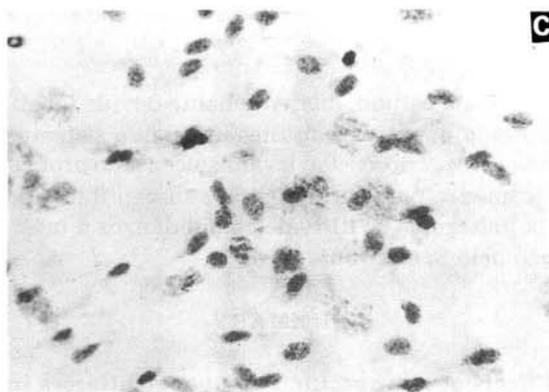
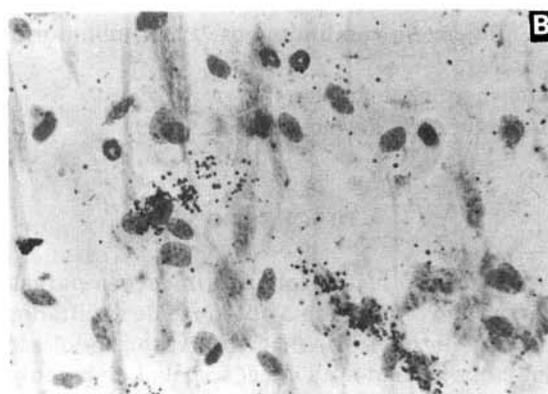
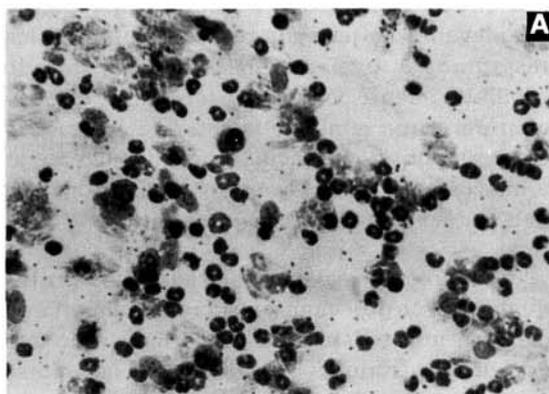


Fig. 1: A — Controle 1 da quimiotaxia (camundongos não infectados pelo *S. mansoni* e sem tratamento pelo levamisole). Presença de fibroblastos, alguns mononucleares e numerosos polimorfonucleares. B — Grupo controle 2 (camundongos infectados pelo *S. mansoni* e não tratados pelo levamisole). Presença de fibroblastos, alguns grânulos de mastócitos e raros polimorfonucleares. C — Grupo profilático da quimiotaxia (camundongos infectados pelo *S. mansoni* e tratados profilaticamente pelo levamisole). Presença de fibroblastos, raros polimorfonucleares e monócitos. D — Grupo curativo da quimiotaxia (camundongos infectados pelo *S. mansoni* e tratado curativamente pelo levamisole). Presença de fibroblastos, mononucleares e numerosos polimorfonucleares. Todas as figuras foram coradas pelo Giemsa (x 160).

TABELA 1

Mortalidade de camundongos e avaliação do parasitismo através do n° de vermes adultos de *S. mansoni* obtidos pela perfusão do sistema portomesentérico.

Grupos	Mortalidade (%)	Parasitismo
		$\bar{X} \pm D.P.$
Controle	25	27,7 $\pm$ 12,39 n = 20
Profilático	39	40,55 $\pm$ 17,99 n = 20
Curativo	22,5	24,25 $\pm$ 12,86 n = 20

n, número de camundongos,  $\bar{x}$ , média.  
D.P., Desvio Padrão.

TABELA 2

Quimiotaxia de polimorfonucleares e mononucleares utilizando como quimiotático a proteína A.

Grupos	Quimiotaxia	
	PMN	MN
	$\bar{x} \pm D.P.$	$\bar{x} \pm D.P.$
Controle 1	47,72 $\pm$ 13,91 n = 10	5,97 $\pm$ 5,32
Controle 2	14,0 $\pm$ 11,09 n = 10	3,32 $\pm$ 2,27
Profilático	23,24 $\pm$ 14,70 n = 10	4,97 $\pm$ 2,87
Curativo	31,73 $\pm$ 15,22 n = 10	3,82 $\pm$ 1,31

n, número de camundongos; PMN, polimorfonuclear.

MN, mononuclear.

$\bar{x}$ , média; D.P. desvio padrão.

## DISCUSSÃO

O uso do levamisole nas infecções parasitárias, não tem levado à obtenção de resultados consistentes. GRIMALDI, 1979<sup>6</sup>, utilizando esse imunopotenciador na infecção pela *Leishmania mexicana*, não encontrou alterações na histopatologia nem na resposta imune do hospedeiro. Em 1987<sup>13</sup>, MELENDEZ & KRETTLI, utilizando como modelo experimental o *Plasmodium berghei*, referem o encontro de um discreto efeito imunostimulante. Em 1988<sup>2</sup>, ABATH et al evidenciaram diminuição da parasitemia em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com levamisole profilaticamente. Os imunopotenciadores não específicos, como o levamisole, para atuar dependem de vários fatores como: imunidade do hospedeiro, severidade da infecção, dose e tempo de administração da droga<sup>8, 14</sup>. Essa variação de fatores provavelmente explica os resultados diferentes encontrados na literatura em diversos laboratórios<sup>2</sup>.

No presente trabalho, o levamisole não pareceu influir na redução da mortalidade e na resistência à infecção pelo *S. mansoni*, provocando,

pelo contrário, uma maior mortalidade percentual do hospedeiro e o desenvolvimento de maior número de vermes adultos nos grupos tratados profilaticamente. As alterações histopatológicas foram idênticas em todos os grupos.

Admite-se que no estudo quimiotático "in vivo" o agente usado (proteína A) exerce sua atividade ligando-se a moléculas de IgG pela sua região Fc, resultando na ativação do sistema complemento através dos fragmentos C<sub>3a</sub> e C<sub>5a</sub>, podendo tanto a via clássica como a via alternativa estarem envolvidas<sup>10</sup>. No grupo controle 2 (camundongos infectados e não tratados pelo levamisole), ocorreu uma redução significativa da quimiotaxia. Essa redução da atividade quimiotática pode ser ocasionada por distúrbios no sistema de complemento ou representar defeito dos polimorfonucleares induzidos pelo *S. mansoni*. Por outro lado, o grupo tratado curativamente pelo levamisole teve sua resposta quimiotática restaurada a níveis normais. O grupo tratado profilaticamente com levamisole não se diferenciou do grupo controle infectado não tratado com esse imunopotenciador, o que sugere ser a infecção pelo *S. mansoni* o fator responsável pela redução da resposta quimiotática.

A literatura registra resultados divergentes quanto à ação do levamisole sobre os polimorfonucleares<sup>9</sup>, mas existe uma concordância de que esta droga restaura a quimiotaxia e a fagocitose nos neutrófilos defeituosos<sup>4</sup>, o que parece também acontecer na esquistossomose mansônica experimental

Neste estudo, diferentemente do que foi observado por outros autores utilizando sistemas de protozoários<sup>2, 6, 13</sup> o levamisole, usado profilaticamente, pareceu aumentar a susceptibilidade da linhagem C57Bl/10 de camundongos à infecção pelo *S. mansoni*.

## SUMMARY

Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *Schistosoma mansoni* infection. I. Levamisole.

The effects of levamisole on the histopathological changes, host's resistance and "in vivo" chemotaxis in *Schistosoma mansoni* experi-

mental infection of C57Bl/10 inbred mice were studied. Prophylactic treatment resulted in an increase in the number of adult worms obtained by perfusion and also increased the mortality rate ( $p < 0.05$ ). The histopathological changes (liver and intestines) were similar in all the groups. A significant reduction of "in vivo" chemotaxis occurred in infected control mice as well as in those submitted to prophylactic treatment with levamisole. Chemotactic activity reached the same levels of normal control mice (non-infected and non-treated with levamisole), when the curative scheme was used. Levamisole seems to increase the susceptibility of inbred C57Bl/10 mice to the infection with *S. mansoni* when administered prior to the infection and increase the chemotactic activity to normal levels when given after infection.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Tetsuo Tashiro do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco, pela análise estatística.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABATH, F. G. C.; MONTENEGRO, S. M. L. & CARVALHO, A. B. — Modificação da técnica da bolsa de ar para mensuração da quimiotaxia "in vivo". *Ciênc. e Cult.*, 38: 1430-1433, 1986.
2. ABATH, F. G. C.; COUTINHO, E. M.; MONTENEGRO, S. M. L.; GOMES, Y. M. & CARVALHO, A. B. — The use of non-specific immunopotentiators in *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 82: 73-76, 1988.
3. CAPRON, A. & LESOIN, M. A. — Role protecteur de BCG dans la schistosomiase expérimentale a *S. mansoni*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 269: 2110-2112, 1969.
4. CHRISTOU, N. V. & MEAKING, J. L. — Neutrophil function in surgical patients: in vitro correction of abnormal neutrophil chemotaxis by Levamisole. *Surgery*, 85: 543-548, 1979.
5. FAUVE, R. M. & DODIN, A. — Influence d'une réaction inflammatoire provoquée par le BCG ou par un irritant non biodégradable sur la résistance des souris à la bilharziose. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 282: 131-134, 1976.
6. GRIMALDI FILHO, G. — Ação de agentes imunoestimuladores (BCG e Levamisole) na Leishmaniose cutânea experimental, induzida por *Leishmania mexicana* em camundongos C3H. Aspectos morfológicos e imunológicos. Salvador, 1979 (Dissertação de Mestrado — Universidade Federal da Bahia).
7. GYSIN, J. & LE CORROLLER, Y. — The effect of inflammatory reaction of the mouse on experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 62: 697, 1976.
8. HADDEN, J. W.; LOPEZ, C.; O'REILLY, R. J. & HADDEN, E. M. — Levamisole and Inosiplex antiviral agents with immunopotentiating action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 284: 139-152, 1977.
9. KLENER, R.; NEUWIRTOVÁ, O. & DONNER, L. — Effect of Levamisole (NSC 177023) on some Leukocyte functions "in vitro". *Ther. hung.*, 27: 125-128, 1979.
10. KRONVALL, G. & GEWURZ, H. — Activation and inhibition of IgG mediated complement fixation by staphylococcal protein A. *Clin. exp. Immunol.*, 7: 211-219, 1970.
11. LAWMAN, M. J. P.; BOYLE, M. D. P.; GEE, A. P. & YOUNG, M. — A rapid technique for measuring leukocyte chemotaxis in vivo. *J. Immunol. Meth.*, 64: 197-206, 1984.
12. MADDISON, S. E.; CHANDLER, F. W. & KAGAN, I. G. — The effects of pretreatment with BCG on infection with *Schistosoma mansoni* in mice and monkeys. *J. reticuloendoth. Soc.*, 24: 615, 1978.
13. MELENDEZ, E. & KRETTLI, A. U. — Effects of Levamisole on experimental infections by *Plasmodium berghei* in mice. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 20: 193-198, 1987.
14. RENOUX, G. & RENOUX, M. — Modulation of immune reactivity by phenyl imidothiazole salts in mice immunized by sheep red blood cells. *J. Immunol.*, 113: 779-790, 1974.
15. ROCHA, N. P. & FERREIRA, S. H. — Restoration by Levamisole of endotoxin-inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. *Europ. J. Pharmacol.*, 122: 87-92, 1986.
16. SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. — The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*, 55: 695-700, 1965.
17. STEIN, A. N.; DIEZ, R. A.; SEN, L. & ESTEVEZ, M. E. — Chemotactic function of polymorphonuclear leukocytes from patients with recurrent infections: partial correction by levamisole "in vitro". *Allergol. et Immunopath.*, 13: 127-134, 1985.

Recebido para publicação em 13/6/1990.  
Aceito para publicação em 01/8/1990.