

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FOSFATO DE LEVAMISOL NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE DE CAPRINOS

Verena Gottardello Marrafon¹

Ronaldo Gomes Gargano¹, Camila Freitas Batista²

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

1 – Universidade Paulista campus Campinas – Swift

2 – Universidade Cruzeiro do Sul

E-mail: verenagotta@hotmail.com

Objetivos

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de um protocolo de imunoestimulação utilizando fosfato de levamisol na apoptose e necrose de neutrófilos e monócitos sanguíneos de caprinos hígidos.

Métodos e Procedimentos

Foram selecionadas quatro cabras da raça Saanen (peso: 69,3 ± 2,45 kg) para avaliar o efeito do fosfato de levamisol injetável a 18,8 %, na dose de 2,5 mg/kg e aplicado pela via subcutânea em três dias consecutivos, seguidos de três dias sem aplicação e mais três dias de aplicação (PAULINO; HUEZA, 2006).

As cabras foram submetidas a análise hematológica e coproparasitológica antes e após o protocolo de levamisol. Para o exame hematológico foi coletado sangue pela venopunção com tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA, usando o aparelho Mindray BC2800vet (Mindray, Shenzhen) e o diferencial de leucócitos no microscópio binocular Leica modelo DM750 (Leica Microsystems). Para o coproparasitológico foi retirado as fezes da ampola retal e usada a técnica de Gordon & Whitlock para quantificar a presença de ovos de *Strongyloides* sp, *Strongyloidea* e *Eimeria* sp.

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizando o protocolo da Anexina V-FITC (APOPTEST™ – FITC) para a sinalização da apoptose e o iodeto de propídio (PI) para a sinalização da necrose, de acordo com as

técnicas empregadas por Vermes, Haanen e Reutelingsperger (2000).

Após a coleta de sangue foi usado tubos de diferentes animais para adicionar 100 µL de sangue e NaCl a 0,2% e 1,6% para causar lise hipotônica das hemácias, depois foram centrifugados a 250 x g por 8 minutos a 4°C e desprezado o sobrenadante, repetindo por 3 vezes. Adicionou 100 µL de solução tampão de ligação e foram centrifugados novamente. Foi vertido 1 µL Anexina V-FITC e os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 20 minutos e mantidas no escuro, o tubo de calibração recebeu 1 µL Anexina V-FITC e incubado à 56 °C por 20 minutos. Adicionou mais 1000 µL de solução tampão de ligação e realizou a centrifugação e foi realizado a lavagem amostras e estas foram suspensas em 300 µL de tampão de ligação e a adição do iodeto de propídio foi feito antes da leitura no citômetro de fluxo.

A leitura das amostras foi realizada pelo programa BD CellQuest Pro versão 5.1 (BD Life Sciences), considerando 15.000 eventos (células). Os dados obtidos na citometria de fluxo foram analisados por meio do *software* FlowJo versão 10.7.1 Trial (BD Life Sciences).

A análise estatística foi realizada pelo programa SPSS 24 (IBM) e considerou nível de significância de 5%. Na estatística inferencial foi usado o teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade dos dados, para a viabilidade de monócitos e neutrófilos foi realizado por meio do ANOVA e *post hoc* de Sidak. Para as variáveis não paramétricas foi usado o teste de Friedman com *post hoc* de Wilcoxon. Para as comparações dependentes utilizou o teste T pareado ou teste não paramétrico de Wilcoxon.

Resultados

As cabras envolvidas no estudo estavam clinicamente saudáveis, com as funções vitais dentro do intervalo fisiológico esperado. Durante o ensaio, algumas cabras apresentaram taquipneia, bradicardia, mucosa rósea clara e aumento da ruminal, porém essas alterações não sugeriam enfermidades.

O exame hematológico e o diferencial de leucócitos revelaram que antes do protocolo três cabras apresentaram leucopenia, duas linfopenia e uma neutropenia. Na comparação antes e depois não houve diferenças significantes no hemograma.

A tabela 1 e 2 apresentam os resultados da viabilidade, necrose, apoptose e apoptose tardia dos monócitos e neutrófilos, respectivamente.

Tabela 1 – Média $\pm$ desvio padrão dos monócitos analisados pela citometria de fluxo.

Monócitos	Antes	Durante	Depois	P
Total(%)	71,8 $\pm$ 9,5	78,5 $\pm$ 10,8	68,6 $\pm$ 3,53	NS
Apoptose (%)	1,45 ^B $\pm$ 0,12	15,9 ^A $\pm$ 1,86	3,93 ^B $\pm$ 1,28	S
Apoptose tardia (%)	9,3 ^B $\pm$ 1,74	12,3 ^A $\pm$ 2,51	6,1 ^C $\pm$ 1,71	S
Necrose (%)	4,75 ^A $\pm$ 1,01	1,16 ^B $\pm$ 0,43	2,51 ^B $\pm$ 0,46	S
Viabilidade (%)	84,5 ^A $\pm$ 1,22	70,6 ^B $\pm$ 2,83	87,5 ^A $\pm$ 2,8	S

Legenda: (NS) não significativo, (S) significativo

Tabela 2 – Média $\pm$ desvio padrão dos neutrófilos analisados pela citometria de fluxo.

Neutrófilos	Antes	Durante	Depois	P
Total(%)	22,9 $\pm$ 7,7	18,8 $\pm$ 9,96	15,11 $\pm$ 5,94	NS
Apoptose (%)	31,2 $\pm$ 16,1	34,1 $\pm$ 9,67	62,4 $\pm$ 12,2	NS
Apoptose tardia (%)	68,3 ^A $\pm$ 16,15	39,7 ^A $\pm$ 12,2	11,4 ^B $\pm$ 4,52	S
Necrose (%)	0,12 $\pm$ 0,09	10,2 $\pm$ 4,62	1,63 $\pm$ 0,85	NS
Viabilidade (%)	0,37 $\pm$ 0,09	16,1 $\pm$ 8,4	24,6 $\pm$ 14,5	NS

Legenda: (NS) não significativo, (S) significativo

Os resultados revelam que não houve alteração na quantidade total de monócitos. Durante o protocolo houve aumento significativo da necrose, apoptose e apoptose tardia que causaram a diminuição da viabilidade das células. Ao final há uma queda significativa da apoptose que se iguala aos valores do início do protocolo, enquanto na apoptose tardia também ocorre uma diminuição significativa, porém menor que os valores do início do ensaio. A necrose dos monócitos diminuiu significativamente durante o estudo. Essas alterações elevam, ao final, a quantidade de monócitos viáveis.

Os dados referentes a viabilidade dos neutrófilos são apresentados na tabela 2. Apenas os valores referentes a apoptose tardia sofreram alterações significantes, onde percebe-se uma redução vertiginosa durante o ensaio. As outras variáveis não apresentaram diferenças significantes mesmo com a grande variação das médias, atribuímos a isso a grande variação dos dados analisados.

Conclusões

O estudo permite afirmar que a aplicação do fosfato de levamisol utilizando o protocolo proposto não gerou alterações significantes no número de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos totais. A aplicação do fosfato de levamisol diminuiu a apoptose tardia e a necrose nos monócitos, enquanto nos neutrófilos houve apenas a redução da apoptose tardia. A viabilidade dos monócitos se manteve igual após o final da aplicação do protocolo proposto. O número de animais e a grande variação dos dados da análise da citometria de fluxo foram as principais limitações do estudo.

Referências Bibliográficas

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167-90, 21 set. 2000.
PAULINO, C.A.; HUEZA, I.M. Agentes imunoestimulantes e imunossuppressores. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária** 4ª Ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

EVALUATION THE EFFECT OS LEVAMISOLE PHOSPHATE ON THE VIABILITY OF IMMUNE SYSTEM CELLS OF GOATS

Verena Gottardello Marrafon¹

Ronaldo Gomes Gargano¹, Camila Freitas Batista²

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

Faculdade/Universidade

1- Universidade Paulista campus Campinas – Swift

2- Universidade Cruzeiro do Sul

E-mail: verenagotta@hotmail.com

Objetive

The main goal of this study was to evaluate the effects of an immunostimulant protocol using levamisole phosphate on apoptosis and necrosis of blood neutrophils and monocytes of healthy goats.

Methods and Proceeding

Four Saanen goats (weight: 69.3 ± 2.45 kg) were selected to evaluate the effect of 18.8 % injectable levamisole phosphate at a dose of 2.5 mg/kg and applied subcutaneously on three consecutive days, followed by three days without application and three more days of application (PAULINO; HUEZA, 2006).

The goats were submitted to hematological analysis and coproparasitological before and after the levamisole protocol. For hematological examination, blood was collected by venopuncture with vacuum tubes containing anticoagulant EDTA, using the Mindray BC2800vet equipment (Mindray, Shenzhen) and the leukocyte differential in the Leica binocular microscope model DM750 (Leica Microsystems). For the coproparasitological, the feces were removed from rectal ampoule and use the Gordon & Whitlock technique to qualify the presence of eggs of *Strongyloides* sp, *Strongyloidea* e *Eimeria* sp.

For evaluation of cell's viability, Annexin V-FITC protocol (APOPTTEST™ – FITC) was used for identification of the apoptosis and propidium iodide (PI) for identification of the necrosis,

according to the technique employed by Vermes, Haanen e Reutelingsperger (2000).

After blood collection, tubes of different animals were used to add 100 μ L of blood and NaCl at 0.2% and 1.6% to cause hypotonic lysis in red blood cells, then the tubes were centrifuged at $250 \times g$ for 8 minutes at 4°C and the supernatant were despising, repeating this 3 times. 100 μ L of binding buffer solution was added and were centrifuged again. 1 μ L Annexin V-FITC was incubated at room temperature for 20 minutes and kept in the dark, the calibration tube received 1 μ L Annexin V-FITC and incubated at 56 °C for 20 minutes. It added over 1000 μ L of binding buffer solution and realized the centrifugation and washing samples was performed and these were suspended in 300 μ L of binding buffer and the addition of the propidium iodide was made before reading on the flow cytometer.

The samples were read by the BD CellQuest Pro program version 5.1 (BD Life Sciences), considering 15,000 events (cells). The data obtained in the flow cytometry were analyzed using the software FlowJo version 10.7.1 Trial (BD Life Sciences).

The statistical analysis was performed by the SPSS 24 (IBM) program and considered a significance level of 5%. In the inferential statistics was used the Shapiro Wilk test to verify the normality of the data, for the evaluation of monocytes and neutrophils was performed through the ANOVA and *post hoc* of Sidak. For the nonparametric variables, the Friedman test with Wilcoxon *post hoc* was used. For dependent comparisons, the paired

T test or Wilcoxon nonparametric test was used.

Results

The goats involved in the study were clinically healthy, with vital functions inside the expected physiological range. During the trial, some goats presented tachypnea, bradycardia, clear rose mucosa and increased ruminal, but these alterations did not suggest diseases.

The hematological exam and leukocyte differential reveal that before the protocol three goats had leucopenia, two lymphopenia and one neutropenia. In the comparison before and after there were no significant differences in the blood count.

Table 1 and 2 show the results of viability, necrosis, apoptosis and late apoptosis of monocytes and neutrophils, respectively.

Table 1 – Mean $\pm$ standard deviation of monocytes analyzed by flow cytometry.

Monocytes	Before	During	After	P
Total (%)	71,8 $\pm$ 9,5	78,5 $\pm$ 10,8	68,6 $\pm$ 3,53	NS
Apoptosis (%)	1,45 ^B $\pm$ 0,12	15,9 ^A $\pm$ 1,86	3,93 ^B $\pm$ 1,28	S
Late apoptosis (%)	9,3 ^B $\pm$ 1,74	12,3 ^A $\pm$ 2,51	6,1 ^C $\pm$ 1,71	S
Necrosis (%)	4,75 ^A $\pm$ 1,01	1,16 ^B $\pm$ 0,43	2,51 ^B $\pm$ 0,46	S
Viability (%)	84,5 ^A $\pm$ 1,22	70,6 ^B $\pm$ 2,83	87,5 ^A $\pm$ 2,8	S

Subtitle: (NS) not significant, (S) significant

Table 2 - Mean $\pm$ standard deviation of neutrophils analyzed by flow cytometry.

Neutrophils	Before	During	After	P
Total (%)	22,9 $\pm$ 7,7	18,8 $\pm$ 9,96	15,11 $\pm$ 5,94	NS
Apoptosis (%)	31,2 $\pm$ 16,1	34,1 $\pm$ 9,67	62,4 $\pm$ 12,2	NS
Late apoptosis (%)	68,3 ^A $\pm$ 16,15	39,7 ^A $\pm$ 12,2	11,4 ^B $\pm$ 4,52	S
Necrosis (%)	0,12 $\pm$ 0,09	10,2 $\pm$ 4,62	1,63 $\pm$ 0,85	NS
Viability (%)	0,37 $\pm$ 0,09	16,1 $\pm$ 8,4	24,6 $\pm$ 14,5	NS

Subtitle: (NS) not significant, (S) significant

The results show that there was no change in the total amount of monocytes. During the protocol there was a significant increase in necrosis, apoptosis and late apoptosis that caused decreased cell viability. At the end there is a significant fall in apoptosis that equals the values of the beginning of the protocol, while in late apoptosis there is also a significant decrease, but less than the values at the beginning of the assay. The necrosis of monocyte decreased significantly during the study. These changes increase, at the end, the number of viable monocytes.

The data referent of the neutrophil viability are presented in table 2. Only the values referring to late apoptosis had significant changes, where a vertiginous reduction was observed during the trial. The other variables did not present significant differences even with the large variation of the means, attributing to this the great variation of the analyzed data.

Conclusions

The study allows to affirm that the application of levamisole phosphate using the proposed protocol did not generate changes in the number of leukocytes, lymphocytes, neutrophils and total monocytes. The application of levamisole phosphate decreased late apoptosis and necrosis of monocytes, while in neutrophils there was Only a reductions in late apoptosis. The viability of monocytes remained the same after de end of the application the propoded protocol. The number of animals and the large variation of the flow cytometry analysis data were mais limitations of the study.

Bibliographic References

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, v. 243, n. 1-2, p. 167-90, 21 set. 2000.
 PAULINO, C.A.; HUEZA, I.M. Agentes imunoestimulantes e imunossuppressores In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária* 4ªEd Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.