

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
Luziana Tavares Braga

**ATUAÇÃO DA *Momordica charantia* SOBRE A DERMATOFITOSE
PROVOCADA POR *Microsporum canis***

Fortaleza, Ceará

Julho de 2003

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
Luziana Tavares Braga

**ATUAÇÃO DA *Momordica charantia* SOBRE A DERMATOFITOSE
PROVOCADA POR *Microsporum canis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

Fortaleza, Ceará

Julho de 2003

B813a Braga, Luziana Tavares
Atuação da *Momordica charantia* sobre a
dermatofitose provocada por *Microsporum canis*/
Luziana Tavares Braga. Julho, 2003.

60 p.; il.;31 cm.

Orientadora: Diana Célia Sousa Nunes
Pinheiro

Dissertação (Mestrado em Ciências
Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará,
Faculdade de Veterinária.

**Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa**

Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: Atuação da *Momordica charantia* sobre a dermatofitose provocada por *Microsporum canis*.

Autor: Luziana Tavares Braga

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora:

**Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Orientadora**

**Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes
Examinador**

**Profa. Dra. Selene Maia de Moraes
Examinadora**

**Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Texeira
Examinadora**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, Francisco Ximenes Braga e Inácia Tavares Braga, pelo apoio, paciência e amor.

Aos meus irmãos, Tereza e Júnior, pelo incentivo.

À minha orientadora Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, exemplo de dedicação e amor à pesquisa, por acreditar no meu potencial e dividir comigo seus conhecimentos sobre a ciência e, e por ter contribuído na minha formação profissional e pessoal.

À querida equipe de laboratório, de uma forma mais especial à Ana Karine Rocha de Melo Leite, Maria Vina Barros Monteiro, Viviane Moura de Farias e Cláudio Afonso Pinho Lopes que me apoiaram de todas as maneiras nesse trabalho, e que demonstraram ser pessoas maravilhosas.

Aos meus amigos Helena Matos, Cesarino Aprígio, Leonardo Cavalcante, Alice Alencastro, Cláudio Fernandes, e Joseilton Ferreira pela amizade.

A todos os professores do PPGCV-UECE, por transmitirem seus conhecimentos.

Ao Prof. Marcos Fábio Gadelha Rocha, à Sâmia Brilhante e ao Centro Especializado de Micologia Médica pela valiosa contribuição para realização desse trabalho.

À profa. Teresa Neuma Albuquerque Gomes Nogueira e seus alunos Jacy Aurélia Vieira de Sousa e Francisco Martileudo Sousa Silva pela valiosa contribuição na leitura das lâminas histológicas.

A todos os funcionários da UECE, em especial ao Sr. José Lino, pela atenção, bom humor e gentileza.

Aos alunos do laboratório de Química da UECE, pela atenção e boa vontade.

As secretárias do PPGCV, pela atenção, gentileza e boa vontade que sempre tiveram comigo.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DE LITERATURA	03
1. Dermatofitose	03
1.1. <i>Microsporum canis</i>	04
1.2. Tratamentos	05
2. Sistema Imunológico	06
2.1. Imunidade inata	07
2.1.1. Células do sistema fagocítico	07
2.2. Imunidade adquirida	08
2.2.1. Resposta imune humoral	09
2.2.2. Resposta imune celular	10
3. Sistema imune da pele	10
4. Imunomodulação	12
4.1. Levamisol	13
5. Plantas medicinais	14
5.1. Plantas medicinais: propriedades imunomodulatórias	14
5.2. <i>Momordica charantia</i>	16
JUSTIFICATIVA	17
HIPÓTESE	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
1. Material vegetal	21
2. Estudo da toxicidade do EE de <i>M. charantia</i> em camundongos	21
3. Efeito do EE de <i>M. charantia</i> sobre a infecção experimental de <i>M. canis</i> em coelhos	23
4. Análise estatística	26
RESULTADOS	27
1. Toxicidade por via oral em camundongos tratados com EE de <i>M. charantia</i>	27
2. Contagem total de leucócitos do sangue periférico de camundongos tratados por via oral com EE de <i>M. charantia</i>	28
3. Peso dos órgãos de camundongos tratados por via oral com EE de <i>M. charantia</i>	29
4. Avaliação macroscópica das lesões da pele de coelhos infectados experimentalmente por <i>M. canis</i>	31
5. Cultura em agar Sabouraud de amostras de coelhos infectados experimentalmente por <i>M. canis</i>	32
6. Contagem total de leucócitos do sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente por <i>M. canis</i> e tratados com <i>M. charantia</i>	33
7. Contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente por <i>M. canis</i> e tratados com <i>M. charantia</i>	34
8. Avaliação histológica da pele de coelhos infectados experimentalmente por <i>M. canis</i> e tratados com <i>M. charantia</i>	35
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	42
PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO 1	58

ANEXO 2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da toxicidade por via oral do EE de <i>Momordica charantia</i> induzida em camundongos	27
Tabela 2: Contagem total de leucócitos antes e ao final do tratamento com EE de <i>M. charantia</i> nas diferentes concentrações	28
Tabela 3. Alterações macroscópicas das lesões da pele em coelhos infectados experimentalmente por <i>M. canis</i>	31
Tabela 4. Número de coelhos infectados experimentalmente por <i>M. canis</i> após 7 dias da infecção	32
Tabela 5. Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com <i>M. canis</i> , antes e ao final do tratamento por via oral com EE de <i>M. charantia</i>	34
Tabela 6. Avaliação histológica da pele de coelhos infectados experimentalmente com <i>M. canis</i> , antes e ao final do tratamento por via oral com EE de <i>M. charantia</i>	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Efeito do EE de *M. charantia* sobre o peso do baço de camundongos. 29
- Figura 2: Efeito do EE de *M. charantia* sobre o peso do fígado de camundongos 30
- Figura 3. Contagem total de leucócitos do sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis*, antes e ao final do tratamento por via oral com EE (10mg/Kg) de *M. charantia* 33
- Figura 4. Cortes histológicos das lesões provocadas por *M. canis* na pele de coelhos, que receberam diferentes tratamentos por 15 dias consecutivos 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC- células apresentadoras de antígenos

BHI- brain and heart infusion

CEMM- Centro Especializado de Micologia Médica

°C- graus Celsius

d.p.- desvio padrão

EE- extrato etanólico

et al- e colaboradores

FUNCAP- Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa

FIG- figura

FNT- α - fator de necrose tumoral alfa

GM-CSF- fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

g- gramas

H&E- hematoxilina e eosina

IL-1- interleucina 1

IL-2- interleucina 2

IL-3- interleucina 3

IL-4- interleucina 4

IL-5- interleucina 5

IL-6- interleucina 6

IL-10- interleucina 10

IL-12- interleucina 12

IL-13- interleucina 13

IL-15- interleucina 15

IFN- α - interferon alfa

LT- linfócitos T

LT CD4- linfócito auxiliar

LT CD8- linfócito citotóxico

μ g- micrograma

mg- miligrama

mg/Kg- miligrama por quilograma

μL- microlitros

mL- mililitros

mm- milímetros

M. canis- *Microsporium canis*

MHC-1- complexo de histocompatibilidade principal classe 1

MHC-2- complexo de histocompatibilidade principal classe 2

MHC- complexo de histocompatibilidade principal

NK- células matadoras naturais

NOS- óxido nítrico sintase

%- percentual

PV- peso vivo

RHR- reação de hipersensibilidade retardada

TAB- tabela

TCR- receptor para as células T

Th1- linfócito auxiliar 1

UFC- Universidade Federal do Ceará

x- média

INTRODUÇÃO

As espécies animais, desde sua domesticação, foram utilizadas pelo homem para diversas atividades produtivas, tais como produção de carne, leite, couro, lã e até mesmo para a produção de conhecimento científico, como cobaias para testar uma infinidade de tratamentos.

A manutenção da saúde dos animais domésticos é importante não só pelo bem estar do animal em si, mas também de seus proprietários, e para isso já existem diversas técnicas de diagnóstico e tratamento veterinários que são utilizados para identificar as mais diversas afecções, além de tratá-las.

As doenças de pele afetam diversas espécies animais, independente da idade e da raça. Tem-se observado que cada vez é maior a frequência de casos de dermatites, seja por parasitismo, por causas alérgicas, por substâncias químicas irritantes ou tóxicas, que são caracterizadas por inflamação das camadas cutâneas profundas, envolvendo vasos sangüíneos e linfáticos, com comprometimento secundário da epiderme (SEGAL, 1989).

A dermatofitose é uma infecção de tecidos queratinizados, unhas, garras, pêlos e *stratum corneum*, provocada por espécies de *Microsporum*, *Trichophyton* ou *Epidermophyton* (SEGAL, 1989).

Os principais agentes químicos usados como antifúngicos em Medicina Veterinária são os ácidos orgânicos (undecilênico, caprílico, propiônico); tolnaftato; haloprogina; cuprimixina e imidazóis (clotrimazol, miconazol e econazol) (HUBER, 1992; COSTA & GÓRNIAK, 1999), para o tratamento tópico e a griseofulvina como droga de referência para o tratamento sistêmico das dermatofitoses (COSTA & GÓRNIAK, 1999).

Entretanto, esses medicamentos são caros (DEBOER & MORIELLO, 1995), tornando-se onerosos para os proprietários que acabam por interromper o

tratamento e comprometendo, desta maneira, a saúde dos animais (KOTNIK, *et al.*, 2001). Além disso, nos casos em que a cura torna-se difícil, os médicos veterinários têm utilizado drogas imunomoduladoras em associação com o antifúngico a fim de estimular o sistema imune no combate dessa infecção (MIGNON, *et al.*, 1999).

Os princípios ativos de origem vegetal, compreendidos em toda a sua abrangência, estão relacionados com a exploração tecnológica e econômica de vegetais empregados na prevenção, no tratamento e na cura de doenças do homem e dos animais.

O isolamento de novos princípios ativos bem como a validação de seus efeitos contribuirão para o desenvolvimento de novos fitoterápicos. A importância deste estudo é validar cientificamente o uso do extrato etanólico das folhas de *Momordica charantia* como auxiliar na prevenção e no tratamento de dermatofitose canina induzida pelo *Microsporum canis*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Dermatofitose

As dermatopatias representam cerca de 30% do atendimento na rotina diária da clínica médica de carnívoros domésticos, independentemente da localização geográfica e do desenvolvimento sócio-econômico (LARSSON, 1985).

As dermatofitoses ou tinhas são afecções cutâneas caracterizadas por lesões superficiais causadas pela ação parasitária de fungos, denominados dermatófitos, sobre os tecidos queratinizados: pêlos, unhas, garras e *stratum corneum* da pele (DIAZ *et al.*, 1984).

As dermatofitoses são provocadas com maior freqüência por diferentes espécies dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* e apresentam, como sinal clínico mais comum, uma dermatite inespecífica com formação de crostas e escamas (CAVALCANTI *et al.*, 2003). No entanto, existe uma maior prevalência de uma espécie de dermatófitos sobre as outras, em uma determinada espécie de animal, confirmando, assim, a existência de uma estreita relação parasita-hospedeiro (MULLER *et al.*, 1985). Esse fato é verificado em relação ao *Microsporum canis* em cães e gatos, ao *Microsporum nanum* em suínos e ao *Trichophyton verrucosum* em bovinos (GAMBALE *et al.*, 1987).

A enfermidade parece ser mais comum em climas tropicais, em países com condições climáticas quente e úmidas (CAVALCANTI *et al.*, 2003). São motivos de consultas clínicas, uma vez que apresentam múltiplas conseqüências, tanto para os animais quanto para o homem (CHERMETTE *et al.*, 1993), sendo mais contagiosas que a maioria das outras infecções fúngicas (MULLER *et al.*, 1985).

O contato direto com esporos e hifas é o modo de transmissão das dermatofitoses (CAVALCANTI *et al.*, 2003). Assim, o filamento fúngico penetra na

camada córnea da epiderme, resultando no final de alguns dias em uma lesão macroscópica de aspecto circular, associada a descamações com ou sem resposta inflamatória evidente (SIDRIM & MOREIRA, 1999). A variação clínica da lesão está correlacionada com a espécie do dermatófito envolvida no processo infeccioso, ao sítio anatômico acometido e ao padrão imunológico do hospedeiro (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Essas estruturas podem estar presentes nos animais ou no ambiente (pêlo e caspas), e também em escovas, pentes e camas de animais (CAVALCANTI *et al.*, 2003). Também há os portadores, animais sem lesões visíveis, que conduzem o material infeccioso (CAVALCANTI *et al.*, 2003).

O diagnóstico clínico das dermatofitoses, como de outras infecções fúngicas, passa por diferentes fases distintas (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Na fase pré-analítica é realizado o exame clínico, utilizando-se como recurso a Luz de *Wood* e também o raspado de pele para colheita do material clínico. A realização dos exames histopatológico e microbiológico constituem a fase analítica, na qual é confirmado o diagnóstico e a fase pós-analítica consiste na estocagem do patógeno, que servirá para futuros estudos (MULLER *et al.*, 1985).

1.1 *Microsporum canis*

O *Microsporum canis* é um dermatófito zoofílico transmitido ao homem por diversos animais domésticos, tendo em nosso meio como principal reservatório os felinos jovens (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Esse fungo pode infectar também cães, homens e outras espécies (CAVALCANTI *et al.*, 2003).

O sinal clínico mais comum da infecção por *M. canis* é a lesão anular (*ringworm*), uma forma alopecica circular em rápida expansão, com seu diâmetro oscilando entre 1 e 4 cm (MULLER *et al.*, 1985), que ocorre preferencialmente na cabeça e nas extremidades, com prurido moderado ou ausente (CAVALCANTI *et al.*, 2003). Em gatos, os pêlos partidos assumem o aspecto "barba curta" (CAVALCANTI *et al.*, 2003). O crescimento piloso nos folículos afetados tem continuidade, e não há perda pilosa permanente, a menos que o folículo seja destruído pela inflamação bacteriana secundária (MULLER *et al.*, 1985). Macroscopicamente, a colônia de *M. canis* é filamentosa, de cor amarelada e textura fina (RINALDI, 2000).

Microscopicamente, visualiza-se artroconídeos fusiformes de paredes espessas, segmentadas e rugosas (SMITH, 2000).

A incidência do *M. canis* nas dermatomicoses que acometem a espécie humana pode ser atribuída ao grande número de gatos e outros animais de estimação que mantêm estreito contato com o homem (PUCCINI *et al.*, 1992). Uma revisão sobre o papel do *M. canis* nas dermatofitoses e sua relação com infecções humanas, apontou que a incidência de infecções por essa espécie vem aumentando constantemente, e que a contínua disseminação entre os animais e os homens sugere que o *M. canis* será o dermatófito de maior evidência no futuro. O potencial zoonótico desse dermatófito, principalmente nos países em desenvolvimento, tem trazido a preocupação de que, nessas áreas do mundo, a doença se torne uma zoonose emergente (FERREIRO *et al.*, 1997).

1.2. Tratamentos

As drogas antifúngicas utilizadas no tratamento das dermatofitoses, podem ser agrupadas de acordo com sua aplicação tópica ou sistêmica (HUBER, 1995).

A decisão entre a medicação tópica ou oral é importante para o tratamento das dermatofitoses, pois depende da severidade e topografia da infecção, do agente infeccioso e da classe de antifúngicos empregado (BORGERS, *et al.*, 1993).

Os agentes antifúngicos utilizados para tratar infecções superficiais, em geral, são aplicados topicamente e podem conter drogas ceratolíticas, as quais facilitam o contato superficial do agente antifúngico com o fungo, pela remoção de uma porção da ceratina (HUBER, 1995). DEBOER & MORIELLO (1995) recomendam o tratamento tópico para dermatofitose inicial em gatos, já que o tratamento sistêmico é oneroso.

As principais drogas de uso tópico para o tratamento das dermatofitoses são os ácidos orgânicos (undecilênico, caprílico, propiônico); tolnaftato; haloprogina; cuprimixina e imidazóis (clotrimazol, miconazol e econazol) (HUBER, 1995; COSTA & GÓRNIK, 1999)

A administração sistêmica de agentes antifúngicos oferece oportunidades para tratamento de micoses sistêmicas ou dermatofíticas (HUBER, 1995). Essas drogas administradas por via oral são absorvidas e incorporadas às células epiteliais na medida em que estas são formadas (HUBER, 1995), sendo a griseofulvina a droga de referência, cujo mecanismo de ação se dá pela sua penetração na célula fúngica, por um processo dependente de energia. A droga interage com os microtúbulos, desfazendo o fuso mitótico e, provocando, assim, uma inibição no processo de mitose e, conseqüentemente, impedindo o crescimento desse microorganismo (COSTA & GÓRNIAK, 1999).

Ainda existem outras drogas antifúngicas para o tratamento sistêmico: o cetoconazol, que atua inibindo uma enzima no fungo capaz de sintetizar o ergosterol, um componente essencial para a membrana da célula fúngica (SMITH, 2000); fluconazol, que possui mecanismo de ação semelhante ao cetoconazol (SMITH, 2000) e a terbinafina, que atua bloqueando a ação da esceleno epoxidase, enzima necessária para síntese do ergosterol. Entretanto, estes medicamentos possuem muitos efeitos indesejáveis tais como hepatotoxicidade, leucopenia, trombocitopenia, neuropatias, nascimento de fetos anormais em ratos e cães (SMITH, 2000).

A adoção de medidas profiláticas como a tosa, o isolamento do animal e o tratamento de gatos infectados (MULLER *et al.*, 1985), pode minimizar a transmissão dos dermatófitos.

2. Sistema imunológico

A principal função do sistema imune é proteger o hospedeiro contra micróbios patogênicos. A resistência à infecção formou a base para a identificação original da imunidade inata e adquirida (ABBAS *et al.*, 2001).

A imunidade é uma reação manifestada pelo organismo frente a substâncias estranhas, incluindo microrganismos, macromoléculas, proteínas e polissacarídeos, sem implicar necessariamente em uma patologia (ABBAS *et al.*, 2001).

A interação do sistema imune com organismos infecciosos é uma inter-relação dinâmica do mecanismo hospedeiro, objetivando o delineamento de estratégias de eliminação infecciosa para permitir a sobrevivência na face de poderosos mecanismos efetores. Diferentes tipos de agentes infecciosos estimulam padrões distintos de respostas imunes e têm envolvido mecanismos únicos de evasão da imunidade específica (BIER *et al.*, 1989).

2.1. Imunidade Inata

A imunidade inata caracteriza-se pelas barreiras físicas tais como pele e mucosas íntegras, células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), células exterminadoras naturais como as células “Natural Killer” (NK), mediadores e citocinas. Este mecanismo de defesa está presente anteriormente à exposição do organismo aos antígenos, não sofrendo nenhum tipo de modificação após a exposição aos mesmos (HALLIWELL & GORMAN, 1989).

Geralmente a invasão de um agente estranho a um tecido provoca uma resposta inflamatória local, desencadeada pelo mesmo, levando ao recrutamento de leucócitos para o tecido afetado. Essa migração dos leucócitos é dotada de fina especificidade, isto é, os neutrófilos acorrem seletivamente ao sítio da inflamação aguda. Os eventos celulares e vasculares da inflamação são mediados por substâncias químicas, biologicamente ativas chamadas de mediadores da inflamação (aminas vasoativas, fatores derivados do ácido araquidônico, citocinas e os glicocorticóides), além das espécies reativas de oxigênio (TIZARD, 1998).

2.1.1. Células do sistema fagocítico

Os neutrófilos têm como função capturar e destruir material estranho através da fagocitose, que embora considerada um processo contínuo, pode ser dividida em quatro estágios discretos: quimiotaxia, aderência, ingestão e digestão. A destruição das partículas ingeridas ocorre por dois mecanismos distintos, a explosão respiratória e a digestão por enzimas. A explosão respiratória ocorre dentro de segundos após a ligação do neutrófilo a uma partícula estranha, ocorrendo aumento do consumo de oxigênio em até 100 vezes (ABBAS *et al.*, 2001).

Os eosinófilos, assim chamados devido à afinidade de seus grânulos pelo corante eosina, têm como principal função a destruição de material estranho. A fagocitose dos eosinófilos é semelhante a dos neutrófilos e a principal atividade biológica dos eosinófilos é a destruição extracelular de parasitas (TIZARD, 1998).

Os basófilos são as células do sistema mononuclear fagocítico, em menor número. Seus grânulos são ricos em aminas vasoativas e, normalmente, os basófilos não são encontrados nos tecidos extravasculares. No entanto, podem infiltrar-se sob a influência de substâncias liberadas por linfócitos (HALLIWELL & GORMAN, 1989).

Os macrófagos têm seu processo de fagocitose semelhante aos neutrófilos. Os macrófagos são atraídos não somente pelos produtos bacterianos e pelos produtos da ativação do complemento, mas também por moléculas liberadas pelas células e tecidos danificados. Em algumas espécies, principalmente roedores e bovinos, os macrófagos ativados pela exposição a partículas estranhas ou agentes quimiotáticos sintetizam uma enzima chamada de óxido nítrico sintase (NOS). (TIZARD, 1998).

Os macrófagos quando ativados por diferentes estímulos também produzem várias citocinas, tais como IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e FNT- α . A IL-1 e o FNT são mediadores importantes do processo inflamatório agudo, regulando tanto a resposta inflamatória quanto à resposta imune específica (TIZARD, 1998).

2.2. Imunidade Adquirida

A imunidade adquirida ou específica é induzida ou estimulada através da exposição a substâncias estranhas. A cada sucessiva exposição a uma macromolécula a imunidade é aumentada em sua magnitude e em sua capacidade defensiva. A imunidade específica caracteriza-se pela presença de anticorpos específicos, linfócitos ativados e de memória e de citocinas derivadas de sua ativação, estabelecendo-se um processo de regulação para a manutenção da homeostase (ABBAS *et al.*, 2001). Um sistema de defesa mais especializado foi desenvolvido nos animais superiores durante a evolução e é manifestado através da

resposta imune adaptativa ou adquirida que é classificada em imunidade humoral e imunidade celular (ROITT, 1989; ABBAS *et al.*, 2001).

2.2.1 Resposta imune humoral

O primeiro passo para a resposta imune humoral é a captura do material estranho, seu processamento e apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígenos (APC) aos linfócitos T auxiliares (LT CD4). Os determinantes antigênicos são associados a uma glicoproteína conhecida por complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC classe II) internamente na APC e, em seguida, levadas à superfície celular para apresentação e interação específica com os linfócitos T auxiliares através dos receptores (TCR) do linfócito T CD4. Essa interação é responsável pela ativação do linfócito T CD4, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que culminam com sua proliferação e diferenciação em células T efetoras e de memória, além de um padrão de citocinas que irão caracterizar e direcionar para a produção específica de anticorpos (HARLOW & LANE, 1988).

A ativação do linfócito ocorre através da transdução de sinais que se caracteriza pela transcrição gênica de interleucina-2 (IL-2), de receptores de IL-2 e da ativação gênica de novas proteínas incluindo a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e interferon- γ . Assim, o linfócito T CD4 é levado a aumentar de volume, entrar no ciclo celular, secretar novas proteínas e, conseqüentemente, proliferar e se diferenciar através da IL-2 produzida e secretada por ele mesmo (TIZARD, 1998).

Para que ocorra a ativação de linfócitos B e a produção de anticorpos, faz-se necessário o contato entre linfócitos T CD4 e linfócitos B, pela participação de citocinas e de moléculas co-estimulatórias. Essa ligação gera a liberação de IL-4 por linfócitos T CD4 e a expressão de receptores para IL-4 nos linfócitos B. Após a ativação do linfócito B pela IL-4 em associação com outros sinais que não estão bem compreendidos ocorre a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e a formação de células de memória. Os plasmócitos são responsáveis pela produção e liberação

dos anticorpos afim de que os mesmos possam interagir com os antígenos, formando os complexos imunes (HARLOW & LANE, 1988).

2.2.2 Resposta imune celular

A resposta imune celular ou imunidade celular é mediada por linfócitos T. Inicialmente, ocorre a adesão do linfócito T citotóxico (LT CD8) à célula alvo através da ligação entre o complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I) e moléculas oriundas de linfócitos T auxiliares tipo I (TH1). Além disso, a IL-2 produzida e secretada pela TH1 se conjuga com os receptores do LT CD8, estimulando sua ativação, proliferação e diferenciação em células de memória e efetora. O LT CD8 efetor ou ativado liberando grânulos contendo perforinas e granzinas que dentro da célula alvo ativam mecanismos que são responsáveis pelo processo de apoptose que é uma forma de morte celular na qual todo material genético é fragmentado e a célula morre sem destruição da arquitetura tecidual (TIZARD, 1998).

3. Sistema imune da pele

A pele é o maior órgão do corpo e funciona como uma barreira física entre o meio ambiente externo e o corpo do animal (ABBAS *et al.*, 2001). Ela oferece proteção contra agressão física, química e microbiológica, e seus componentes sensoriais permitem ao animal a percepção do calor, frio, dor, tato e pressão (MULLER *et al.*, 1985). Além disso, a pele é um participante ativo na defesa do hospedeiro, com a capacidade de produzir e suportar reações locais imunes e inflamatórias (ABBAS *et al.*, 2001).

A pele compõe-se de duas camadas principais; que funcionam como uma unidade: uma camada externa, a epiderme, e uma camada interna, a derme (MULLER *et al.*, 1985). Na camada epidérmica estão localizados os anexos especializados: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas, e os

queratinócitos, melanócitos, células de *Langerhans* e células de *Merkel* (COTRAN *et al.*, 1999).

Os queratinócitos são as células mais importantes e abundantes. Produzem queratina (MULLER *et al.*, 1985) e citocinas, tais como interleucina 1 (IL-1), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucina 3 (IL-3), fator de necrose tumoral (FNT) e interleucina 6 (IL-6) e estimulando células T CD4 (ABBAS, 2001), que atuam na interação dinâmica entre a epiderme e a derme (COTRAN *et al.*, 1999).

As células de Langerhans: têm origem na medula óssea e migram para o epitélio. São células dendríticas cuja função é a apresentação de antígenos para células T CD4⁺ (ABBAS *et al.*, 2001).

Os melanócitos são o segundo tipo celular mais encontrado na camada basal da epiderme, são responsáveis pela pigmentação da pele, através da produção de melanina (MULLER *et al.*, 1985).

Finalmente, as células de *Merkel* que supostamente funcionam como melanoreceptores de adaptação lenta (MULLER *et al.*, 1985).

A epiderme está delimitada da derme por uma membrana basal, que contém pequenos vasos, fibroblastos, e dendrócitos que são potencialmente importantes na imunidade da derme e no reparo tecidual (COTRAN *et al.*, 1999).

A principal célula que ocorre ao sítio, quando antígenos penetram na pele, são as células de Langerhans. Existem evidências que sugerem que uma subpopulação de células T se aloja seletivamente na pele. Logo, o antígeno é capturado pelas células de Langerhans e apresentado às células T cutâneas, estimulando uma resposta imune rápida e efetiva (TIZARD, 1998).

4. Imunomodulação

Os imunomoduladores são agentes capazes de modificar a resposta imune, podendo o efeito ser estimulatório ou inibitório (MASIHI, 2000).

As células envolvidas nas respostas imunes possuem uma função reguladora em que podem claramente promover ou suprimir as respostas Imunológicas. Esse mecanismo regulador assegura que essas respostas sejam apropriadas tanto qualitativamente quanto quantitativamente (TIZARD, 1998), mostrando que o próprio sistema imune se autoregula e, além disso, libera substâncias imunomoduladoras (STITES & TERR, 1995, HOLLAND & VIZI, 2002).

Uma droga imunoestimulante estimula primariamente o sistema imune não-específico através da imunidade inata, o qual é constituído por células tais como macrófagos, granulócitos, células NK e por diferentes substâncias efetoras tais como quimiocinas, citocinas, além da ativação do sistema complemento através das vias alternativa e clássica de maneira dose-dependente. Os imunossuppressores agem seletivamente sobre o sistema imune específico através da imunidade adquirida, principalmente, reduzindo a resistência contra infecções, estresse e outros fatores (MAKARE *et al.*, 2001).

Dentre os imunomoduladores estimulantes destacam-se: os hormônios tímicos que induzem um uma melhor diferenciação e aumento na população de células T visando à amplificação e ajuste da resposta imune; citocinas, tais como IL-2, TNF- α , IL-1 e IFN - γ que em conjunto induzem a diferenciação e ativação de células T citotóxica implementando a capacidade bactericida do hospedeiro; o levamisol, dietiltiocarbamato que atuam induzindo a liberação de hormônios tímicos etc (MAKARE *et al.*, 2001).

Os imunomoduladores depressores atuam reduzindo a atividade de determinados segmentos do sistema imunológico, ou dele como um todo. Dentre

estes se destacam os corticosteróides, drogas antiinflamatórias não esteróides (FINGER & SCHEINBERG, 2002).

Dentre os imunomoduladores químicos utilizados na prática veterinária destacam-se o levamisol e o Inmodulen®. O levamisol pertence ao grupo dos imidázóis e além dessa atividade ele é utilizado como anti-helmíntico (FINGER & SCHEINBERG, 2002). O Inmodulen® contém células inativadas de *Propionibacterium granulosum* e lipopolissacarídeo de membrana de *Escherichia coli* um conhecido imunoestimulante de natureza biológica que estimula o sistema imunológico de modo inespecífico levando a liberação de vários mediadores inflamatórios (DRUMMOND *et al.*, 1996).

Atualmente, a pesquisa por novas drogas de natureza vegetal tem sido estimulada, objetivando desenvolver medicamentos imunomoduladores de mais baixo custo, de fácil disponibilidade, comprovada eficácia e com mínimos efeitos colaterais.

4.1. Levamisol

Os imunomoduladores químicos constituem num grupo de substâncias cuja atuação sobre o sistema imunológico, em geral, melhora e amplia a atividade de linfócitos T e B. Esses compostos químicos podem ser divididos em quatro grupos básicos: imidazólicos, tióis, compostos sianozaridínicos e análogos de ácidos nucléicos (FINGER & SCHEINBERG, 2002).

O principal representante dos compostos imidazólicos é o levamisol, antigo anti-helmíntico cujo uso foi abandonado devido a freqüente indução de leucopenia (FINGER & SCHEINBERG, 2002). Seu efeito imunoestimulante é caracterizado pelo aumento na indução da proliferação de linfócitos T, aumento da quimiotaxia e da atividade fagocítica e exarcebação das reações de hipersensibilidade tardia (BONAMIN & PAULINO, 1996).

Ensaio químicos e experimentais têm demonstrado que o levamisol aumenta a resposta fagocítica (VELÁSQUEZ *et al.*, 1998). Em recém nascidos, o levamisol

estimula a resposta cutânea tardia quando aplicado por via subcutânea, e diminui a incidência de infecções sistêmicas em recém nascidos submetidos a intervenções cirúrgicas abdominais, sem efeitos secundários (VELÁSQUEZ *et al.*, 1998).

5. Plantas medicinais

Apesar do avanço tecnológico na medicina atual, a utilização de plantas medicinais com finalidades terapêuticas não caiu em desuso, seja devido às condições sócio-econômicas, ou por razões culturais. Este fato desperta a atenção dos pesquisadores que buscam compreender o mecanismo de ação das plantas, bem como a atuação de seus constituintes sobre o organismo animal, além de verificar possíveis interações de seus compostos, sua sistemática de utilização e reações adversas (FARNSWORTH, 1993; WAGNER 1993; LANS *et al.*, 2000).

Na Medicina Veterinária, o uso de plantas medicinais é um fato, pois a utilização de drogas sintéticas induziram resistência dos agentes patógenos a seus efeitos, além de apresentar poder residual na carcaça animal que, muitas vezes, é prejudicial à saúde do homem (LANS & BROWN, 1998).

Dessa forma vêm aumentando a pesquisa de produtos naturais para uso veterinário (LANS & BROWN, 1998; BLANCO *et al.*, 1999; LANS *et al.*, 2000; ADEWUNMI *et al.*, 2001), uma vez que surge como uma alternativa viável para o tratamento de enfermidades como doenças autoimunes, hepatite, doenças de pele e doenças reumáticas (COS *et al.*, 2002).

5.1. Plantas medicinais: propriedades imunomodulatórias

Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos e outras, oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora.

O óleo da casca de *Cedrus deodora* atuou sobre os neutrófilos, reduzindo a atividade fagocítica e a liberação de várias enzimas e mediadores os quais estão

envolvidos na inflamação (SHINDE *et al.*, 1999). O extrato etanólico das sementes de *Psoralea corylifolia* aumentou a atividade citotóxica tanto mediada pelo complemento como através das células NK no combate de células tumorais (LATHA *et al.*, 2000). No entanto o extrato etanólico da raiz da *Boerhaavia diffusa* inibiu tanto a citotoxicidade das células NK quanto à produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados por LPS (MEHROTRA *et al.*, 2002). Já o extrato metanólico do caule de *Tinospora cordifolia* ativou a atividade citotóxica dos macrófagos contra células carcinômicas ascíticas de Erlich (MATHEW & KUTTAN, 1999) e o extrato metanólico da raiz da *Withania somnifera* aumentou a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais (DAVIS & KUTTAN, 2000). Um polissacarídeo isolado do mesocarpo de frutas de *Orbignya phalerata* elevou a atividade de células fagocíticas *in vivo* e inibiu o aumento da permeabilidade vascular causada pelo ácido acético, apresentando-se tanto como imunomodulador como antiinflamatório (SILVA & PARENTE, 2001).

Quanto à modulação sobre os linfócitos T e B e a produção de anticorpos, destaca-se o óleo da casca de *Cedrus deodora* que inibiu a reação de Arthus, indicando declínio na produção de anticorpos, na formação e precipitação do complexo imune e na liberação de enzimas lisossomais. Além disso, foi capaz de suprimir as reações de hipersensibilidade retardada (RHR) e de contato, indicando seu efeito sobre os linfócitos T (SHINDE *et al.*, 1999). O extrato metanólico da raiz da *Withania somnifera* aumentou o número de células produtoras de anticorpos e também demonstrou inibir a RHR (DAVIS & KUTTAN, 2000). O extrato metanólico do caule de *Tinospora cordifolia* apresentou atividade proliferativa dos leucócitos e elevou a produção de anticorpos (MATHEW & KUTTAN, 1999), enquanto o extrato etanólico da casca do caule de *Mangifera indica* aumentou a RHR e a produção de anticorpos (MAKARE *et al.*, 2001). Já o extrato etanólico das sementes de *Psoralea corylifolia* aumentou a atividade citotóxica dependente de anticorpos (LATHA *et al.*, 2000), enquanto o extrato etanólico da raiz da *Boerhaavia diffusa* inibiu tanto a produção de IL-2 quanto às produções de TNF- α , IL-13, IL-15, interferon- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 (MEHROTRA *et al.*, 2002). O extrato aquoso de folhas da *Osbeckia aspera* é conhecido por apresentar efeito antioxidante, no entanto apresentou atividade imunossupressora sobre células mononucleares do sangue periférico em pacientes com hepatite crônica do tipo C (NICHOLL *et al.*, 2001). O suco das folhas da

Kalanchoe brasiliensis também demonstrou atividade imunossupressora inibindo a proliferação de linfócitos (IBRAHIM *et al.*, 2002).

5.2. *Momordica charantia*

A *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) é encontrada nos trópicos, na América do Sul, Índia, China e Leste da África, sendo utilizada como um remédio popular para diversas doenças (GÜRBÜZ *et al.*, 2000). No Brasil é conhecida popularmente como melão-de-são-caetano, erva-de-lavadeira, erva-de-são-vicente, fruta da cobra e melãozinho (SOUZA, 2001). Várias propriedades medicinais são reportadas, incluindo atividades antitumoral (JILKA *et al.*, 1983, SINGH *et al.*, 1998), citotóxica (PORRO *et al.*, 1995), antimutagênica (GUEVARA *et al.*, 1990), imunomoduladora (NG *et al.*, 1992), antiviral (LEE-HUANG *et al.*, 1995), anti-helmíntica (BATISTA *et al.*, 1999), hipoglicemiante (OLIVER-BEVER, 1986) e analgésica (BISWAS *et al.*, 1991), além de estimulante, purificador sangüíneo, laxativo, bem como no tratamento de feridas, na lepra e em úlceras malignas e como abortivo (NG *et al.*, 1992; GÜRBÜZ *et al.*, 2000). Estudos toxicológicos com diferentes extratos de plantas usadas na medicina popular de Cuba, utilizando o ensaio de segregação somática, demonstraram que extratos de folhas de *M. charantia* apresentaram atividade genotóxica sobre o fungo *Aspergillus nidulans* (RUIZ *et al.*, 1996). A importância desse estudo se deve ao fato de risco potencial, como câncer e doenças genéticas, para indivíduos que usam plantas.

JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, a literatura vem divulgando amplamente o aumento das infecções fúngicas, sendo as dermatomicoses as principais infecções responsáveis por esse aumento (CABAÑES *et al.*, 1997). Essas afecções são mais contagiosas que a maioria das outras infecções fúngicas, pois afetam a saúde e qualidade de vida dos animais domésticos, além de induzir imunossupressão e imunodeficiência (HALLIWELL & GORMAN, 1989). Além disso, a microsporose é uma zoonose (SEGAL, 1989).

No final dos anos oitenta, foi relatado nos Estados Unidos que 9% da população havia sido infectada com *Microsporum canis* e seu tratamento custou cerca de quarenta milhões de dólares por ano (SEGAL, 1989). No período de 1986 a 1995, foi realizado na Espanha um estudo que demonstrou que em 73,3% dos animais avaliados, principalmente a espécie canina, estavam infectados com dermatófito e que foi isolado o *M. canis* (CABAÑES *et al.*, 1997). No Brasil, um estudo epidemiológico também demonstrou maior incidência desse dermatófito em gatos (GAMBALE *et al.*, 1993). Portanto, o uso de potentes e eficientes agentes antifúngicos associados a agentes imunoestimulantes são importantes na Medicina Veterinária.

Os imunoestimulantes, apesar de não serem medicamentos de uso tradicional na Medicina Veterinária, são considerados como recursos promissores em novos esquemas terapêuticos, sobretudo nas doenças relacionadas aos estados imunossupressivos, como a sarna demodécica (BONAMIN & PAULINO, 1996). Medicamentos como o levamisol e o ivermectin são utilizados comumente como imunomoduladores. Entretanto, poucas pesquisas foram realizadas no intuito de avaliar a capacidade imunomoduladora de plantas utilizadas pela medicina popular.

Apesar de não ter sido demonstrada uma ação anti fúngica do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. charantia* contra dermatófitos *in vitro*, dentre eles o

Microsporum canis (ROSS, 1999) é conhecido popularmente em nosso meio o uso de partes dessa planta no combate a infecções fúngicas na pele, tanto de cães como de humanos.

Desta forma este trabalho propõe esclarecer a atuação da *M. charantia* como imunomodulador da imunidade em animais experimentais, visando a posterior aplicação na pele de cães.

HIPÓTESE

Os constituintes do extrato etanólico (EE) das folhas de *Momordica charantia* induzirão o recrutamento e a ativação de células através da liberação de mediadores químicos, possibilitando a reconstituição da imunidade inata local contra a dermatofitose induzida experimentalmente.

OBJETIVOS

a) Objetivo geral:

Avaliar a toxicidade e o efeito imunomodulador dos constituintes da *Momordica charantia* contra a dermatofitose experimental induzida por *Microsporum canis*.

b) Objetivos específicos:

1 - Avaliar a toxicidade do EE de *M. charantia* por via oral nas doses de 10, 50 e 100 e 500 mg/Kg em camundongos, sobre:

- a) os parâmetros comportamentais, tais como agitação, andar em círculos, taquicardia, dispnéia, prurido;
- b) a contagem de leucócitos totais do sangue periférico;
- c) o peso relativo do baço e do fígado.

2 - Avaliar o efeito do EE de *M. charantia* por via oral em coelhos infectados experimentalmente por *M. canis*, sobre:

- a) a contagem total e diferencial de leucócitos do sangue periférico;
- b) os aspectos macroscópicos da pele;
- c) os parâmetros histopatológicos da pele.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Vegetal

1.1. Coleta da planta

As folhas de *M. charantia* foram coletadas em fevereiro de 2001 de terreno baldio, nas proximidades do sítio “Meus Amores”, no município de Eusébio, Ceará. Botânicos do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará identificaram a planta e uma espécime foi depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número 31709. As folhas foram colocadas em local arejado para a secagem e posterior obtenção do extrato etanólico.

1.2. Obtenção do Extrato Etanólico (EE) de *M. charantia*

Para a obtenção do EE de *M. charantia*, às folhas secas foi adicionado etanol a 95%. A solução obtida após uma semana de repouso, foi filtrada e submetida a um evaporador rotatório a 70°C para retirada total do solvente. Em seguida foi levado em banho maria e liofilizado para evaporação completa da água. O EE foi liofilizado e armazenado em freezer à temperatura de -4°C. Para uso experimental, foram feitas diluições em salina 0,9% contendo 1% de Tween 20.

2. Estudo da toxicidade do EE de *M. Charantia* em camundongos

2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, entre 6 e 10 semanas de idade, pesando cerca de 30 g oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade.

2.2. Efeito do EE de *M. Charantia* sobre os parâmetros comportamentais em camundongos

Para avaliar a toxicidade por via oral, foram utilizados camundongos divididos em grupos teste e controle (n=5). Os animais receberam por via oral, através de uma sonda esofágica, 200 µL de EE nas concentrações de 10 ou 50 ou 100 ou 500 mg/Kg ou de salina, durante 5 dias consecutivos. Durante este período, foram observados os parâmetros comportamentais. No último dia de tratamento, o número de sobreviventes foi determinado e o efeito tóxico foi interpretado com base na mortalidade e expresso como dose letal mínima.

2.3. Efeito do EE de *M. Charantia* sobre a contagem total de células do sangue periférico de camundongos

Os camundongos receberam por via oral, através de uma sonda esofágica, 200 µL de 10 ou 50 ou 100 ou 500 mg/Kg do EE ou de salina, durante 5 dias consecutivos. Antes e ao final do tratamento foram realizadas as contagens de leucócitos totais do sangue (DAVIS & KUTTAN, 2000). Para tanto, o sangue foi coletado do plexo retro-orbital com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em tubo de ensaio heparinizado. Em seguida, uma alíquota de 20 µL da amostra de sangue foi adicionada a 380 µL da solução de Turk e realizada a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico.

2.4. Efeito do EE de *M. Charantia* sobre o peso dos órgãos de camundongos

Os camundongos receberam por via oral, através de uma sonda esofágica, 200 µL de 10 ou 50 ou 100 ou 500 mg/Kg do EE ou de salina, durante 5 dias consecutivos. Os animais foram pesados antes e ao final dos tratamentos e, em seguida foram sacrificados por deslocamento cervical e necropsiados para retirada

do fígado e do baço. Os órgãos foram pesados e os resultados foram expressos como peso relativo dos órgãos (DAVIS & KUTTAN, 2000).

3. Efeito do EE de *M. Charantia* sobre a infecção experimental de *M. canis* em coelhos

3.1. Animais

Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, de ambos os sexos e com idade de 2 a 6 meses. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições adequadas de higiene, luz e temperatura, recebendo água e ração à vontade.

3.2. Preparação do inóculo

A cepa de *Microsporium canis* nº 41 CEMM 1-3-173 obtida da Micoteca do Centro Especializado de Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará foi isolada de amostra de raspado de pele de cães naturalmente infectados e foram cultivadas em meio ágar Sabouraud, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, ágar Sabouraud acrescido de clorafenicol e cicloheximida a 25°C, por 15 dias. Em seguida, foram estocados em ágar batata, ágar batata acrescido de dimetil sulfóxido a 10% e ágar batata acrescido de glicerol à temperatura de -20°C. Para o processamento do material infeccioso as amostras de *M. canis* foram colocadas em meio BHI (Brain and Heart Infusion), durante 7 dias em agitação constante. Após esse período o material obtido foi lavado em água destilada várias vezes seguidas, até a retirada completa do meio de enriquecimento, e depois foi estocado em solução salina estéril para posterior utilização em condições de temperatura, luz e umidade adequados. Esse material foi então ultrassonicado (Ultrasonic homogenizer CPX600), obtendo-se uma solução de aspecto homogêneo (COS *et al.*, 2002). Tomando - se como referência a escala de McFarland, o material infeccioso obtido ficou correspondente ao padrão 10 da referida escala, que equivalente a concentração de 30×10^8 partículas infecciosas por mL.

3.3. Infecção experimental

Para a infecção experimental, utilizou-se a metodologia segundo DEBOER & MORIELLO (1994). Os coelhos foram anestesiados com quetamina (Vetanarcol® injetável Konig) na dose de 25 mg/Kg/PV por via intramuscular. Uma área de 8 cm² da região do flanco direito traseiro foi tricotomizada e escarificada com auxílio de escovas de cerdas duras autoclavadas. Uma alíquota de 1 mL do material infeccioso foi inoculada na pele escarificada com auxílio de seringas estéreis. O procedimento repetiu-se por mais 3 dias seguidos da inoculação inicial. No último dia, a área foi coberta com esparadrapo cirúrgico que foi removido após 72h.

3.4. Protocolo experimental

Para este estudo, os animais foram numerados e sorteados de maneira aleatória, para a formação dos grupos. Os tratamentos foram iniciados após o décimo quinto dia da inoculação fúngica, obedecendo ao seguinte protocolo experimental:

- (a) animais não infectados- controle negativo (n=3);
- (b) animais infectados e tratados com salina- controle positivo (n=4);
- (c) animais infectados e tratados com o veículo, Tween 20 a 0,1% (n=5);
- (d) animais infectados e tratados com o EE (10 mg/Kg/PV) de *M. charantia*, (n=6);
- (e) animais infectados e tratados com levamisol (25 mg/Kg/PV), droga de referência (n=6).

Os animais receberam por via oral, 1,5 mL dos tratamentos durante 15 dias consecutivos.

3.5. Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada antes e ao final dos tratamentos. Para tanto, o sangue foi coletado com o auxílio de seringa descartável da veia jugular, e colocado em tubo heparinizado. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 20 μL do sangue e, adicionou-se à 380 μL da solução de Turk, para contagem dos leucócitos do sangue periférico em hemocitômetro. Para a contagem diferencial de células, foi confeccionado um esfregaço sangüíneo que foi corado por May-Gruenwald-Giensa, para diferenciação dos leucócitos ao microscópio óptico.

3.6. Observação clínica e coleta do material

Diariamente, foram observados os aspectos macroscópicos da infecção por *M. canis*, que consistiram na visualização de eritema, alopecia, edema, lesões circulares, pêlo com aparência quebradiça, presença de vesículas e presença de exsudato. Após 7 dias da infecção experimental e ao final do tratamento, procedeu-se ao raspado de pele para avaliação fúngica, obtendo-se 42 alíquotas, que foram semeadas em meio de cultivo agar Sabouraud. Para a identificação do fungo, observou-se o aspecto da colônia em meio de cultivo e a morfologia do fungo através da montagem de um fragmento da colônia em lâmina de vidro acrescido de 2 gotas do corante lactofenol azul-algodão ao microscópio óptico. Antes e ao final dos tratamentos, foram realizadas biópsias das lesões para avaliação histológica. (KOTNIK *et al.*, 2001).

3.7. Avaliação Histológica

Amostras de 5 mm da área da pele infectada por *M. canis* e do lado contralateral correspondente foram coletadas nos dias 0 e 15 dos tratamentos. As amostras foram conservadas em formol a 10%, processadas em parafina e coradas por Hematoxilina-Eosina (H&E).

Os cortes histológicos foram avaliados microscopicamente de acordo com o grau de severidade das lesões, obedecendo-se os escores segundo a metodologia de ABU-SAMRA & HAGO (1980) modificada:

grau 0- sem mudanças histopatológicas e pele normal;

grau 1- discretas mudanças histopatológicas: leve hiperqueratose e infiltração dérmica com leucócitos;

grau 2- moderadas mudanças histopatológicas: acantose e infiltração dérmica moderada com leucócitos;

grau 3- severas mudanças histopatológicas: acantose e hiperqueratoses. Severa infiltração dérmica com leucócitos e histiócitos com alguns polimorfonucleares, inclusive eosinófilos.

A leitura das lâminas foi realizada por profissional especializado e em “teste duplo cego”.

4. Análise estatística

Os resultados oriundos das contagens total e diferencial de células foram expressos em média e desvio padrão e analisados por ANOVA e teste t de Student ($p < 0,05$). Os escores obtidos nas análises histológicas dos diferentes grupos foram avaliados pelo teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$), e as diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Toxicidade por via oral em camundongos tratados com EE de *M. charantia*

Como observado na Tab. 1, os animais tratados com EE, nas concentrações de 10, 50, 100 e 500 mg/Kg/PV, não apresentaram sinais clínicos de toxicidade. Os parâmetros comportamentais dos grupos testes não diferiram dos observados no grupo controle. Quanto à necropsia realizada nos animais, não foram visualizadas alterações macroscópicas nos órgãos situados nas cavidades abdominal e torácica.

Tabela 1: Avaliação da toxicidade por via oral do EE de *Momordica charantia* induzida em camundongos.

Tratamentos (mg/Kg/PV)	Via de Administração		Sintomas
	Via Oral		
	Dose única N°v*/N°m*	5 dias N°v*/ N°m*	
Salina	5/0	5/0	Nenhum
EE 10	5/0	5/0	Nenhum
EE 50	5/0	5/0	Nenhum
EE 100	5/0	5/0	Nenhum
EE 500	5/0	5/0	Nenhum

*v: número de animais vivos/ *m: número de animais mortos

2. Contagem total de leucócitos do sangue periférico de camundongos tratados por via oral com EE de *M. charantia*

A contagem total de leucócitos dos grupos testes e controle antes e após os tratamentos estão demonstrados na Tab. 2.

O tratamento em dose única ou durante 5 dias consecutivos com o EE (10, 50, 100 e 500 mg/Kg) de *M. charantia* não induziu diferença significativa sobre a contagem total de leucócitos no sangue periférico entre os grupos controle e os testes.

Tabela 2: Contagem total de leucócitos antes e ao final do tratamento com EE de *M. charantia* nas diferentes concentrações.

Tratamentos (mg/Kg/PV)	Nº de animais	Contagem total de leucócitos	
		Antes x ± d. p.	Depois x ± d. p.
Salina	5	4230 ± 2248,22	4370 ± 1025,06
EE 10	5	2950 ± 1280,08	3330 ± 1445,07
EE 50	5	3700 ± 953,93	4240 ± 1678,69
EE 100	5	3080 ± 611,96	3450 ± 1020,41
EE 500	5	4070 ± 1878,36	5930 ± 3273,49

3. Peso dos órgãos de camundongos tratados por via oral com EE de *M. charantia*

O efeito do tratamento do EE de *M. charantia* por 5 dias sobre o peso dos órgãos dos camundongos está demonstrado nas Fig. 1 e 2.

Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos do baço (Fig. 1) e do fígado (Fig 2) dos animais, entre os grupos testes e controle. Contudo, o tratamento de EE 500 mg/Kg de *M. charantia* reduziu em 33% o peso do baço em relação ao controle, enquanto doses crescentes de EE reduziram discretamente o peso do fígado.

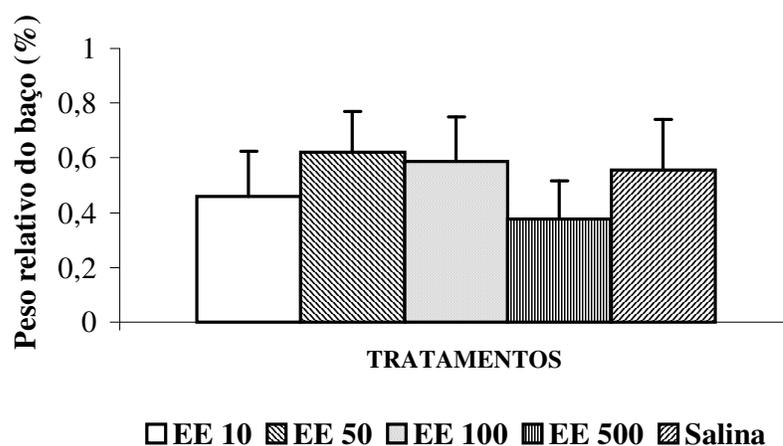


Figura 1: Efeito do EE de *M. charantia* sobre o peso do baço de camundongos.

Resultados expressos como $x \pm d. p.$ (n=5).

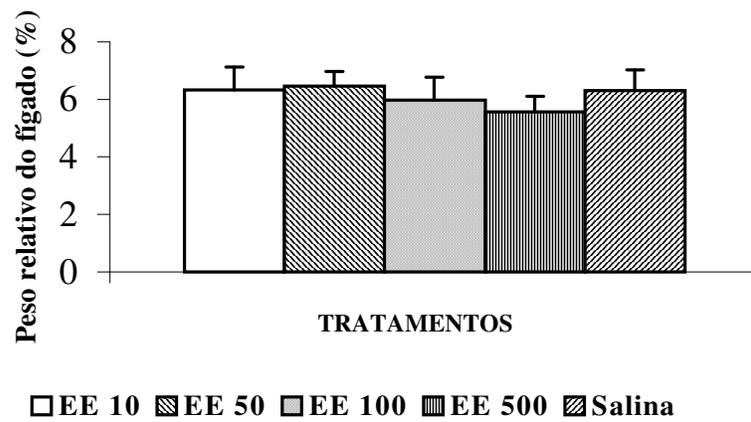


Figura 2: Efeito do EE de *M. charantia* sobre o peso do fígado de camundongos. Resultados expressos como $x \pm d. p.$ (n=5).

4. Avaliação macroscópica das lesões da pele de coelhos infectados experimentalmente por *M. canis*

Como demonstrado na Tab. 3, após 7 dias da inoculação, os animais infectados, apresentavam na área inoculada, edema, escamas e eritema. No entanto, nos animais não infectados, observou-se somente edema e eritema. Após 15 dias da data da infecção, as lesões dos animais experimentalmente infectados não haviam progredido, persistindo com a presença de eritema, alopecia, escamas, e na maioria dos animais, a área inoculada apresentava-se com petéquias. No grupo não infectado, já havia crescimento normal de pêlos. Após 30 dias, nenhum dos animais apresentavam lesões e o pêlo havia crescido de maneira regular e uniforme.

Tabela 3. Alterações macroscópicas das lesões da pele em coelhos infectados experimentalmente por *M. canis*

Grupos	Alterações macroscópicas		
	7 dias	15 dias	30 dias
Não infectado (n=3)	E,ER	CNP	N
Infectado (n=21)	E, ES, ER	ER, A, ES, P	N

A – alopecia;

CNP - crescimento normal de pêlos;

E – edema;

ER – eritema;

ES – escamas;

N – normal;

P – petéquias.

5. Cultura em agar Sabouraud de amostras de coelhos infectados experimentalmente por *M. canis*

Os resultados estão expressos na Tab. 4. Após 7 dias da infecção experimental por *M. canis*, do total das alíquotas (n=42) do grupo infectado, verificou-se que em 85,71% (n=36) foi possível à observação macroscópica do fungo. Para confirmação do resultado, seguiu-se a observação microscópica, e do total observado desse mesmo grupo (n=36), em 77% (n=32) foi possível à visualização de estruturas microscópicas características de *M. canis*. Essas estruturas foram caracterizadas por hifas de parede espessa, rugosa e segmentada. Pôde-se verificar que 76,19% dos coelhos infectados foram positivos para *M. canis*. Em relação às alíquotas cultivadas em agar Sabouraud obtidas do raspado de pele ao final dos tratamentos, todas foram negativas para o crescimento do fungo em estudo.

Tabela 4. Número de coelhos infectados experimentalmente por *M. canis* após 7 dias da infecção

Grupos	Total de alíquotas	Crescimento do fungo (%)	Micromorfologia (%)	Total de Animais Infectados (%)
Não Infectado (n=3)	6	0	0	-
Infectado (n=21)	42	36 (85,71)	32 (72)	16 (76,19)

6. Contagem total de leucócitos do sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis* e tratados com *M. charantia*

A contagem total de leucócitos dos grupos testes e controle antes e após os tratamentos estão demonstrados na Fig. 3. Os tratamentos com levamisol (25 mg/Kg), EE (10mg/Kg), Tween 20 (1%) e Salina, não induziram diferença significativa sobre a contagem total de leucócitos no sangue periférico em todos os grupos.

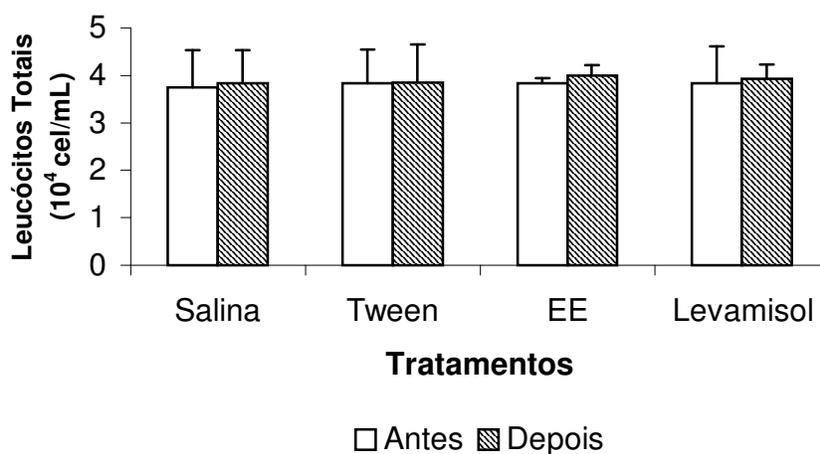


Figura 3. Contagem total de leucócitos do sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis*, antes e ao final do tratamento por via oral com EE (10mg/Kg) de *M. charantia*.

7. Contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis* e tratados com *M. charantia*

A contagem diferencial de leucócitos dos grupos testes e controle antes e após os tratamentos estão demonstrados na Tab. 5. A população predominante de células é o linfócito, entretanto, os tratamentos com levamisol (25 mg/Kg), EE (10mg/Kg), Tween 20 (1%) e Salina, não induziram diferença significativa sobre a contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico em todos os grupos estudados.

Tabela 5. Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis*, antes e ao final do tratamento por via oral com EE de *M. charantia*.

Tratamentos	Neutrófilos*	Eosinófilos*	Monócitos*	Linfócitos*
Salina				
Dia 0	1,261±0,81	0,9±1,06	3,61±1,02	8,28±0,84
Dia 15	3,685±0,82	2,63±2,31	3,85±3,04	7,58±1,96
Tween 20 (1%)				
Dia 0	2,38±0,70	4,09±2,22	4,09±3,62	6,39±1,03
Dia 15	2,13±1,13	3,64±1,03	2,55±1,29	7,39±1,18
EE (10 mg/Kg)				
Dia 0	2,63±1,29	6,36±3,15	6,63±2,52	7,33±1,03
Dia 15	2,10±1,08	2,90±1,35	3,64±2,73	7,85±0,72
Levamisol (25 mg/Kg)				
Dia 0	2,44±1,33	2,23±4,05	0,49±0,43	7,33±1,76
Dia 15	3,10±2,17	1,57±0,54	1,57±0,54	7,85±0,39

*Valores expressos em X ± d. p.

8. Avaliação histológica da pele de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis* e tratados com *M. charantia*

Os resultados da Tab. 6 estão expressos em média das ordenações e valor de T (Kruskal Wallis). Observou-se que antes dos tratamentos, ou seja, após 15 dias da infecção experimental por *M. canis*, não houve diferença significativa nas lesões provocadas pelo fungo entre os grupos, apesar da média da ordenação do grupo tratado com levamisol (25 mg/kg/PV), ter sido 14. Verificou-se que os tratamentos induziram diferença significativa nas lesões entre todos os grupos. Entretanto, o grupo tratado com EE (10 mg/Kg/PV) não diferiu significativamente do grupo tratado com levamisol (25 mg/Kg/PV).

Na Fig. 4 estão esquematizados as fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos coelhos, corados por hematoxilina e eosina.

Nos animais não tratados e não infectados (A), observa-se que a pele apresenta-se normal com anexos cutâneos preservados, epiderme e derme eutróficas. A epiderme tem, no máximo, três camadas de células, sendo a camada córnea delgada. Na derme superficial o conjuntivo fibroso é frouxo e na derme profunda, denso não modelado.

Nos animais infectados que foram tratados com salina (B) a epiderme mostra hiperplasia acantótica moderada, hiperkeratose com freqüentes folhas córneas. Na derme ainda há infiltrado leucocitário predominantemente mononuclear moderado, além de fibrose. Nos coelhos infectados e tratados com Tween 20 a 1% (C), observou-se que na epiderme há hiperplasia acantótica irregular moderada, hiperkeratose importante e, na derme, infiltrado inflamatório moderado além de fibrose. Os achados são, portanto, semelhantes aos descritos em B.

Os animais infectados e tratados com EE das folhas de *M. charantia* estão representados em D e E. Na fotomicrografia D, a epiderme apresenta-se normal e na derme há apenas infiltrado inflamatório crônico, variando de discreto a moderado com discreta fibrose na derme superficial. Os anexos não apresentam peculiaridades. Na fotomicrografia E, a epiderme apresenta-se normal, derme com

leve infiltrado inflamatório crônico, estando os linfócitos dispersos. Na derme superficial há fibrose discreta.

Nos animais infectados e tratados com levamisol (F) a fotomicrografia mostra epiderme normal, com apenas leve hiperkeratose. A derme e os anexos cutâneos não apresentam alterações.

Tabela 6. Avaliação histológico da pele de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis*, antes e ao final do tratamento por via oral com EE de *M. charantia*.

Tratamentos	Valor T		Média das Ordenações	
	(Kruskal Wallis)		Dia 0	Dia 15
	Dia 0	Dia 15		
Salina	3,11	10	7	10 ^{a, c, e}
Tween 20 (1%)	3,11	10	7,8	10 ^{b, g, i}
EE (10 mg/Kg/PV)	3,11	10	7,5	6 ^{d, h, l}
Levamisol (25 mg/Kg/PV)	3,11	10	14	10 ^{f, j, l}

Valores expressos como média das ordenações dos escores das lesões: Teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e teste t de Student ($p < 0,05$).

a, b diferença entre os grupos salina e Tween 20;

c, d diferença entre os grupos salina e EE;

e, f diferença entre os grupos salina e levamisol;

g, h diferença entre os grupos Tween 20 e EE;

i, j diferença entre os grupos Tween 20 e levamisol;

l diferença entre os grupos EE e levamisol.

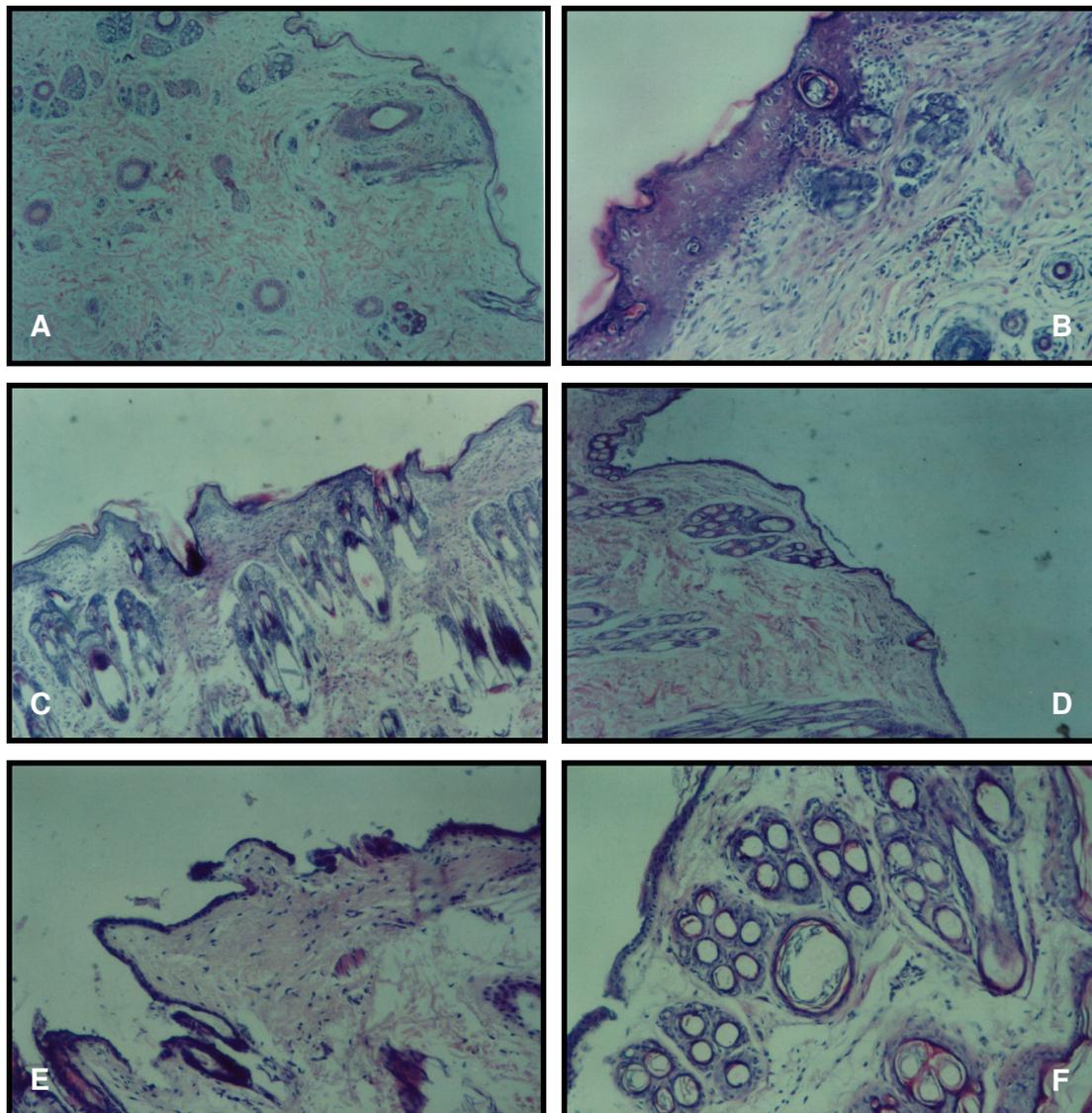


Figura 4. Cortes histológicas das lesões provocadas por *M. canis* na pele de coelhos, que receberam diferentes tratamentos por 15 dias consecutivos.

- A. Animais não tratados e não infectados (hematoxilina- eosina, 40x);
- B. Animais infectados que receberam salina (hematoxilina- eosina, 100x);
- C. Animais infectados que receberam Tween 20 a 1% (hematoxilina- eosina, 100x);
- D, E. Animais infectados que receberam *M. charantia* (hematoxilina- eosina, 40x, 100x);
- F. Animais infectados que receberam levamisol (hematoxilina- eosina, 100x).

DISCUSSÃO

As plantas medicinais são uma atrativa fonte para produção de novos princípios ativos. No entanto, o uso de testes para a avaliação da toxicidade dessas plantas torna-se necessário para o controle e redução de efeitos indesejáveis. Esse tipo de estudo é uma prática comum atualmente (BABIN *et al.*, 2001). Na medicina veterinária, existem relatos sobre a utilização de plantas medicinais no tratamento de dermatopatias (LANS *et al.*, 2000).

No presente trabalho foi realizada uma avaliação da toxicidade por via oral do EE das folhas de *M. charantia*. Este extrato, nas doses de 10, 50, 100 e 500 mg/Kg /PV administrado durante 5 dias consecutivos, não alterou o comportamento dos animais, indicando assim, que as doses estudadas não demonstraram efeito tóxico aparente. Além disso, não se verificou diferença significativa entre os parâmetros analisados nas doses de 10, 50, 100 e 500 mg/Kg. Desta forma, a concentração de 10 mg/Kg pôde ser utilizada com segurança no modelo de infecção experimental de *M. canis* em coelhos. Além disso, o peso dos animais não foi afetado significativamente pela administração desse extrato nas diversas concentrações estudadas (dados não apresentados), demonstrando que o mesmo provavelmente não causa anorexia e não interfere na absorção dos alimentos.

Trabalhos anteriores demonstraram que o extrato hidroalcoólico da parte aérea de *M. charantia*, na concentração de 100 mg/Kg, por via intra-peritoneal, causou um aumento do afluxo de leucócitos para a cavidade peritoneal, tendo assim, um possível efeito imunoestimulante (BRAGA *et al.*, 2002). Entretanto, a administração por via oral do EE, nas doses testadas, não modificou o número total de leucócitos circulantes no sangue periférico.

No presente trabalho, o EE das folhas de *M. charantia* não demonstrou ser hepatotóxico e nem induziu esplenomegalia, pois não houve diferença significativa no peso relativo do fígado e do baço, entre os grupos testes e o controle. No entanto, o tratamento de EE 500 mg/Kg reduziu em 33% o peso do baço em relação ao controle, enquanto doses crescentes de EE reduziram discretamente o peso do

fígado. TENNEKOON *et al.* (1994) verificaram que o suco do fruto e o extrato das sementes de *M. charantia* causaram danos celulares e moleculares hepáticos, resultando em elevação de enzimas, como a γ -glutamil transferase e a fosfatase alcalina. Existem relatos que outras plantas interferem no peso do fígado e no peso do baço de animais tratados (REBECCA *et al.*, 2002; DAVIS & KUTTAN, 2000). O extrato metanólico da raiz de *Withania somnifera* induziu um aumento no peso do baço, indicando uma estimulação dos esplenócitos (DAVIS & KUTTAN, 2000).

Em animais e humanos, a dermatofitose é geralmente uma enfermidade auto-limitante (DEBOER & MORIELLO, 1995). Dentre os dermatófitos, o *M. canis* destaca-se na Medicina Veterinária por acometer diversas espécies como cães, gatos, caprinos, coelhos e cobaias (CAVALCANTI *et al.*, 2003, DEBOER & MORIELLO, 1995, ABU-SANRA & HAGO, 1980; ZRIMSEK *et al.*, 1999), sendo também considerada uma zoonose (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Os coelhos são naturalmente infectados por *Trichophyton mentagrophytes* e por *M. canis*, embora a ocorrência deste último seja rara (VOGTSBERGER *et al.*, 1986). No presente trabalho, observou-se a percentagem de 76,19% de animais positivos para o *M. canis*, demonstrado que coelhos podem ser utilizados como modelos experimentais para infecção por este fungo.

Durante este estudo, a dermatofitose por *M. canis* induzida em coelhos caracterizou-se pela presença de alopecia, escamas, eritema, um leve edema, aumento da espessura da pele e petéquias em toda área infectada durante 10 a 15 dias. Em trabalhos com outras espécies o quadro clínico das lesões foi semelhante. Em cobaias, as lesões caracterizavam-se por exsudato por cerca de 3 a 4 dias (ABU-SAMRA & HAGO 1980). Em gatos, observaram-se eritema, prurido, aumento da espessura da epiderme e alopecia focal no período de 70 a 90 dias (DEBOER & MORIELLO, 1994). Nos caprinos, ABU-SAMRA & HAGO (1980) observaram pontos hiperêmicos, exsudato, alopecia e lesões anulares, que persistiram por cerca de 33 dias.

De acordo com trabalhos realizados por DEBOER & MORIELLO (1994; 1995) o modelo ideal para o estudo do desenvolvimento do curso clínico e patológico em

procedimentos laboratoriais do *M. canis*, é o gato, pois este animal é capaz de produzir lesões e estas possuem a mesma duração de uma infecção natural. Entretanto, o uso de gatos naturalmente ou experimentalmente infectados pode ser problemático por diversas razões (MIGNON, *et al.*, 1999). Sendo assim, a utilização de coelhos como modelo experimental pode representar uma boa alternativa.

O tratamento para as dermatofitoses pode ser de forma tópica ou sistêmica (DEBOER & MORIELLO, 1995). O tratamento tópico induz injúria exclusivamente nos elementos fúngicos que parasitam o *stratum corneum*, não tendo atuação sobre as células da bainha do pêlo. Assim, ele não previne a invasão da haste pilosa pelo fungo (BORGES *et al.*, 1993). Quando o tratamento por via tópica não é efetivo, faz-se necessário à utilização de drogas sistêmicas (RAND, 2000), entretanto essas drogas apresentam efeitos adversos (SMITH, 2000).

As dermatofitoses, caracterizam-se por desencadear as respostas imune celular e humoral (ZRIMSEK *et al.*, 1999). Em indivíduos imunossuprimidos, o tratamento tópico das dermatofitoses é, algumas vezes, menos efetivo (SMITH, 2000). Sendo assim, o uso de imunomoduladores, pode auxiliar na terapia antifúngica. Plantas utilizadas pela medicina popular são considerados como recursos promissores em novos esquemas terapêuticos (LATHA *et al.*, 2000; Davis & Kuttan, 2000).

Neste estudo, o EE induziu alterações semelhantes ao levamisol, droga com atividade imunoestimulante cujo mecanismo de ação envolve a ativação de células T (FINGER & SCHEINBERG, 2002; VELAZQUEZ *et al.*, 1998).

O EE reduziu significativamente os escores de lesões histopatológicas quando comparado aos grupos controle, demonstrando ser benéfico na terapia da dermatofitose causada por *M. canis*. Portanto, a *M. charantia* apresentou-se como um modulador do sistema imune da pele de coelhos experimentalmente infectados por *M. canis*.

CONCLUSÃO

O extrato etanólico das folhas de *Momordica charantia* tem potencial imunomodulador como auxiliar na terapia na dermatofitose por *M. canis*. Entretanto, são necessários novos estudos visando isolar seus princípios ativos bem como esclarecer seus mecanismos de ação.

PERSPECTIVAS

A dermatofitose causada pelo *M. canis* é tida como uma enfermidade de maior evidência no futuro, pois, principalmente, nos países em desenvolvimento a doença se tornará uma zoonose emergente (FERREIRO *et al.*, 1997).

Apesar do avanço tecnológico na medicina atual, a utilização de plantas medicinais com finalidades terapêuticas não caiu em desuso, seja devido às condições sócio-econômicas, ou por razões culturais. A pesquisa das propriedades medicinais de plantas e o conhecimento do mecanismo de ação dos seus constituintes contribuirão para o desenvolvimento de fitoterápicos mais seguros e eficazes.

No presente trabalho, observou-se um possível efeito imunoestimulante da *M. charantia* sobre a dermatofitose induzida por *M. canis*. Entretanto, para confirmar essa atividade são necessárias novas pesquisas para avaliar a ativação de células do sistema imunológico da pele através da liberação de mediadores químicos locais na tentativa de reverter a pele lesada pelo fungo. Isso possibilita, o desenvolvimento de fitoterápicos que possam ser indicados no tratamento de dermatofitoses na Medicina Veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. (2001). *Cellular and Molecular Immunology*. 6. ed. W.B. SAUNDERS, p.457.

ABU-SAMRA, M. T.; & HAGO, B. E. D. (1980). Experimental infection of goats and guinea pigs with *Microsporium canis* and trials on treatment with Canesten cream and neguvon solution. *Mycopathologia*, v. 72, p. 79-84.

ADEWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESAMI, A. J.; MURPHY, N.; WANDO, J. (2001). Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for the tripanocidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 19-24.

BABÍN, M. M.; FERNÁNDEZ, G. C.; ALONSO, C.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. (2001). Toxicological characterisation of sludge from sewage treatment plants using toxicity identification evaluation protocols based on in vitro toxicity tests. *Toxicology in vitro*, v.15, p. 519-524.

BATISTA, L. B.; BEVILÀQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S (1999). Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. *Ciência Animal*, v. 9, n. 2, p. 67- 73.

BHAKUNI, D. S.; GOEL, A. K., JAIN S.; MEHROTRA, B. N; PATNAIK, G. K.; PRAKASH, V. (1998). Screening of Indian plants for biological activity: Part XIII. *Indian Journal Experimental Biology*, v. 26, n. 11, p. 883-904.

BIER, O., MOTA, I., SILVA, W.D. (1989). *Imunologia básica e aplicada*. Editora Guanabara, 4º edição, Rio de Janeiro, p. 400-423.

BIN-HAFEEZ, B.; AHMAD, I.; HAQUE, R., RAISUDDIN, S., (2001). Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 75, p.13-18.

BISWAS, A. R.; RAMASWAMY, S., BAPNA, J. S. (1991). Analgesic effect of *Momordica charantia* seed extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, p. 115- 118.

BLANCO E.; MACÍA, M. J.; MORALES, R. (1999). Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia Northwest. Spain). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 65, p. 113-124.

BONAMIN, I. V. & PAULINO, C. A. **IN:** SPINOSA, H. de S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNADI, M. M. (1996). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara–Koogan, p. 465- 476.

BORGES, M.; XHONNEUX, B.; CUTSEM, V. (1993). Oral itraconazole versus topical bifonazole treatment in experimental dermatophytosis. *Mycoses*, v. 36, p.105-115.

BRAGA, L. T.; LEITE, A. K. R. M.; PINHO, C. A.; GIRÃO, V. C. C.; MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. (2001) Modulação da migração celular induzida por extratos de *Momordica charantia* e *Lippia sidoides*. *Ciência Animal* v.11, n. 2, p. 154-156.

CABAÑES, F. J.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R. (1997). Dermatophytes isolated domestic animals in Barcelona, Spain. *Mycopathologia*, v. 137, p. 107- 113.

CACERES, A.; LOPEZ, B. R.; GIRON, M. A.; LOGEMANN H. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. I. screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, n. 3, p. 263-276.

CASONE, A.; CONTI, S.; DE BERNARDIS, F.; POLONELLI, L. (1997). Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature? *Immunology Today*, v. 18, n. 4, p. 164-168.

CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M. A. G.; FILHO, J. B. G.; ALVES, L. C. (2003). Frequência de dermatófitos e fungos saprófitas em caninos e felinos com sintomatologia sugestiva de dermatopatia micótica atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE. *Clínica Veterinária*, n. 3, p. 24-28.

CHERMETTE, R. & BUSSIÉRAS, J. (1993). Dermathophytose. *Parasitologie Vétérinaire*. Paris

COHEN, J. J. & DUKE, R. C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *Journal of Immunology*, v. 132, p. 38-42.

COS, P., HERMANS, N., DE BRUYNE, T., APERS, S., SINDAMBIWE, J. B., BERGHE, D. V., PIETERS, L., VLIETINCK, A.J. (2002). Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 155-163.

COSTA, E. O. & GÓRNIAC, S.L. **IN:** SPINOSA, H. de S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNADI, M. M. (1999). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro, editora Guanabara–Koogan, p. 410- 421.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, P. (1999). *Robbins: Pathologic Basis of disease*, Saunders Company, 6th edition, New York.

DAVIS, L. & KUTTAN, G. (2000). Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 193-200.

DEBOER, D. J. & MORIELLO, K. A. (1995). Inability of two topical treatments to influence the course of experimentally induced dermatophytosis in cats. *Small Animal*, v. 207, p. 52-57.

DEBOER, D. J. & MORIELLO, K. A. (1994). Development of an experimental model of *Microsporum canis* infection in cats. *Veterinary Microbiology*, v. 42, p. 289-295.

DIAZ, M. C.; SALAMANCA, L.; PIONTELLI, E. (1984). Dermatofitosis: um problema del pasado, um desafio del presente. *Adel. Microbiologia Enfermedad Infecciosa*, v. 3, p. 212-273.

DUTTA, R.C. (2002) Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. *Immunology Letters*, p. 1-9.

DRUMMOND, J. P. & SILVA, E. (1996). *Choque*. Editora: Artes médicas, Porto Alegre, p.39-77.

FARNSWORTH, N. R. (1993). Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 38, p. 145-152.

FERREIRO, L.; CHERMETTE, R.; POLACK, B; GILLOR, J. (1997). *Microsporum canis*: one centure (1897-1997) of continuous dissemination around the worl. **IN:** Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 25, Rio Grande do Sul, Gramado. *Anais*, p. 155.

FINGER, E.; & SCHEINBERG, M. A. **IN** VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (2002). *Tratado de Infectologia*. 2ª edição, Atheneu, Rio de Janeiro, p.33-38.

GAMBALE, W.; CORREA, B.; PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; LARSSON, C. E. (1987) Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, *Revista Brasileira da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP*, v. 24, n. 2, p. 187-192.

GAMBALE, W., LARSSON, C. E., MORITAMI, M. M., CORRÊA, B., PAULA, C. R., FRAMIL, V. M. S. (1993). Dermatophytes and others fungi of the haircoat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. *Feline Practice*, v. 21, n. 3, p. 29- 33.

GUEVARA, A. P.; LIM- SYLIANCO, C.; DAYRIT, F.; FINCH, P. (1990). Antimutagens from *Momordica charantia*. *Mutation Research*, v. 230, p. 121-126.

GURBUZ, I.; AKYUZ, C.; YESILADA, E.; SENER, B. (2000). Anti-ulcerogenic effect of *Mormodica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 77-82.

HALLIWELL, R. E. W. & GORMAN, N. T. (1989). *Veterinary Clinical Immunology*. 1st edition. Philadelphia: Ed. W. B. Sauders Company, p. 548.

HARLOW, E. D. & LANE, D. (1988). *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring harbor Laboratory, USA , p.37-52.

HOLLAND, S. M. & VIZI, E. S. (2002). Immunomodulation. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 2, p. 425-427.

HUBER, W. G. IN: BOOTH, N. H. & MCDONALD, L. E. (1992). *Farmacologia e terapêutica em Veterinária*, editora Guanabara-Koogan 6^a edição, cap. 2, p. 683-692.

HUTTER, J. A. M., SALMAN, W. B., STAVINOHAN, N., SATSANGI, R. F., WILLIAMS, R. T., (1996). Streeper and S. T. Weintraub. Anti-inflammatory C-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 541-543.

IBRAHIM, T.; CUNHA, J. M. T.; MADI, K.; FONSECA, L. M. B.; COSTA, S. S.; KOATZ, V. L. G. (2002). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *International Immunopharmacology*, v. 2, p. 875-883.

JILKA, C.; STRIFLER, B.; FORTNER, G. W.; HAYS E. F.; TAKEMOTO, D. J. (1983). In vivo antitumor activity of the bitter melon (*Momordica charantia*). *Cancer Research*, v. 43, p. 5151- 5155.

KALYANI, G. A. (1989). *In vitro* antihelmintic activity of essential oil from the fruits of *Sonchoxylum limonella*. *Fitoterapia*, v. 60, n. 2, p. 160-162.

KOTNIK, T.; ERZEN, N. K.; KUZNER, J.; DROBNIC-KOSOROK, M. (2001). Terbinafine hydrochloride treatment of *Microsporum canis* experimentaly - induced ringworm in cats. *Veterinary Microbiology*, v. 83, p. 161-168.

KUTTAN, G. & KUTTAN, R. (1992). **IN:** DAVIS. L. & KUTTAN, G. (2000). Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of Ethnopharmacology.*, v. 71, p. 193- 200.

LACOSTE, E., CHAUMONT, J.P. MANDIM, D., PLUMEL., M. M., MATOS, F.J., 1996. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Aplication to the cutaneous microflora. *Annais Pharmacology France*, v. 54, n. 5, p. 228-230.

LANS, C.; HAPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. (2000). Medicinal plants used for dogs inTrinidad and Tobago. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, p. 201-220.

LANS, C. & BROWN, G. (1998). Observations on ethnoveterinary medicines in Trindad and Tobago. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 35, p. 125-142.

LARSSON, C. E. (1995). Dermatoparasitoses de cães e gatos: patogenia, diagnóstico diferencila e saúde pública. **IN:** SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, Mato Grosso do Sul. Anais. Campo Grande, p. 349.

LATHA, P.G.; EVANS, D. A.; PANIKKAR, K. R.; JAYAVARDHANAN, K. K. (2000). Immunomodulatory and antitumour properties of *Psoralea corylifolia* seeds. *Fitoterapia*, v. 71, p. 223-231.

LEE- HUANG, S.; HUANG, P. L.; BOURINBAIAR, A. S.; CHEN, H. C.; KUNG, H. F. (1995). Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti- HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proceeding National Academy Science*, v. 92, p. 8818- 8822.

LEITE, K. L.; LEITE, A. K. R. M.; BRAGA, L. T.; FARIAS, V. M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. (2002). Efeito protetor do extrato etanólico de *Momordica charantia* L. e *Lippia sidoides* contra lesões gástricas induzidas experimentalmente. *Ciência Animal*, v.12, s. 1, p. 83-87

LEMOS, T. G. L.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; MCCHESENEY, J. D. (1990). Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, v. 4, p. 82-24.

LIN, J. Y.; HOU, M. J.; CHEN, Y. C. (1978). Isolation of toxic and non-toxic lectins from the bitter pear melon *Momordica charantia*. *Toxicon*, v. 16, p. 653-660.

MAHMOUD, A. L. (1994). Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oils constituents. *Letters Applied Microbiology*, v. 19, n. 2, p. 110-113.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. (2001). Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 133-137.

MANJREKAR, P. N.; JOLLY, C. I.; NARAYANAN; S. (2000). Comparative studies of the immunomodulatory activity of *Tinospora cordifolia* and *Tinospora sinensis*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 254-257.

MASIHI, K. N. (2000). Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 14, p. 181- 191.

MATHEW, S., KUTTAN, G. (1999). Immunomodulatory and antitumor activities of *Tinospora cordifolia*. *Fitoterapia*, v. 70, p. 35- 43.

MATSUZAKI, T. (1998). Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, p. 133-140.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K.P.; MAURYA, R.C.; SRIMAL, R.C.; SINGH, V. K. (2002). Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. *International Immunopharmacology*, v. 2, p. 987-996.

MIGNON, B. R.; LECLIPTEUX, T.; FOCANT, C. H.; NIKKELS, A. J.; PIERARD, G. E.; LOSSON, B.J. (1999). Humoral and celular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Medical Mycology*, v. 37, p. 123-129.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D.W. (1985). *Dermatologia dos pequenos animais*. 3ª ed. São Paulo: Manole, cap. 7, p. 255-290.

MURTAUGH, M. P. & FOSS, D. L. (2002). Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 87, p. 109:121.

NG, T. B.; CHAN, W. Y.; YEUNG, H. W. (1992). Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from cucurbitaceae plants. *General Pharmacology*, v. 23, p. 579- 590.

NICHOLL, D. S.; DANIELS, H. M.; THABREW, M. I.; GRAYER, R. J.; SIMMONDS, M.S.J.; HUGHES, R. D. (2001). *In vitro* studies on the immunomodulatory effects of extracts of *Osbeckia aspera*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 39-44.

OLIVER-BEVER, B. (1996). *Medicinal Plants in Tropical West Africa*. Cambridge University Press, Cambridge.

PORRO, G.; LENTO, P.; MARCUCCI, F.; GROMO, G.; MODENA, D. (1985). Different cytotoxic activity and intracellular fate of an anti- CD5-momordin immunotoxin in normal compared to tumor cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, v. 40, p. 213- 218.

PUCCINI, S.; VALDRÉ, A.; PAPINI, R.; MANCIANTI, F. (1992). *In vitro* susceptibility to antimycotics of *Microsporum canis* isolates from cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 201, n. 9, p. 1375-1377.

RAMAN, A., LAU, C. (1996). Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. *Phytomedicine*, v. 2, p. 349-362.

RAND, S. (2000). Overview: The treatment of dermatophytosis. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 43, p. S104-112.

REBECCA, M. A.; ISHII- IWAMOTO, E. L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R. K. N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. (2002). Toxicological studies on *Strynodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 101-104

RINALDI, M. G. (2000). Dermatophytosis: epidermiological and microbiological update. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 43, p. 5120-5124.

RIVERA G. (1942). Preliminary chemical and pharmacological studies on "cundeamor" *Momordica charantia*. Part II. *American Journal of Pathology*, v. 114, p. 72-87.

ROITT, I. M. (1989). *Imunologia*, editora Atheneu, Rio de Janeiro, 5° edição.

ROSS, G. R.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. (2001). Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits – a preliminary study. *Journal of Ethnopharmacology*, v.78, p. 85-87.

ROSS, I. A (1999). *Medicinal plants of the world- chemical constituents, traditional and modern medicinal uses*. Totowa, New Jersey: Humam press, p. 214- 229.

RUIZ, A. R.; DE la TORRE, R. A.; ALONSO, N.; VILLAERSCUSA A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. (1996). Screening of medicinal plants for incuption of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 52, p. 123-127.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; VILLASEÑOR-GARCIA, M. M.; LOZOYA, X.; PUEBLA-PÉREZ, A. M. (2001). Immunomodulatory activity of Chilean *Cyttaria* species in mice with L5178Y lymphoma. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 253-257.

SEGAL, E. (1989). Vaccines for the managemente of dermatophyte and superficial yeast infections. *Current Topical Medicine Microbiology*, v. 3, p. 36-49.

SHAPIRO, S.; MEIER, A.; GUGGENHEIM, B. (1994). The antimicrobial activity of essential oils and essential components towards oral bacteria. *Oral Microbiology Immunology*, v. 9, n. 4, p. 202-208.

SHINDE, U. A., PHADKE, A. S., NAIR, A. M., MUNGANTIWAR, A A, DIKSHIT, V.J., SARAF, M.N.(1999). Preliminary studies on the immunomodulatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, v. 70, p. 333-339.

SIDRIM, J. J. C. & MOREIRA, J. L. B. (1999). *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*, 1ª. edição, Guanabara Koogan, p. 107- 131.

SILVA, B. P. & PARENTE, J. P. (2001). An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 887-893.

SINGH, A.; SINGH,S. P.; BAMEZAI, R. (1998). *Momordica charantia* (Bitter Gourd) peel, pulp, seed and whole fruit extract inhibits mouse skin papillomagenesis. *Toxicology Letters*, v. 94, p. 37- 46.

SMITH, E. B. (2000). Treatment of dermatophytosis: Safety considerations. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 43, p. S113-119.

SOUZA, J. A. L., 2001. Plantas medicinais usadas como anti-helmintícas estudo químico de *Spigelia anthelmia* Linn.Monografia para obtenção do título de bacharelado em Química pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.

STITES, D. P & TERR A. I., (1995). *Basic and Clinical Immunology*, Appleton & Lange, 7nd. Edition, New York, p. 870.

TAKEMOTO, D. J.; DUNFORD, C.; MCMURRAY, M. M. (1982). The cytotoxic and citostatic effects of the bitter melon (*Momordica charantia*) on human lymphocytes. *Toxicon*, v. 20, n. 3, p. 593-599.

TAM, P. P. L.; CHAN, W. Y.; YEUNG, H. W. (1985). Effects of two forms of momorcharins and trichosanthin on early pregnancy in the mouse. *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*, p. 335-349.

TENNEKOON, K. H.; JEEVATHAYAPARAN, S.; ANGUNAWALA, P.; KARUNANAYAKE E. H.; JAYASINGHE, K. S. A. (1994). Effect of *Momordica charantia* on key hepatic enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 44, p. 93-97.

TIZARD, R. I. (1998). *Imunologia Veterinária uma introdução*. 5. ed. São Paulo: Rocca, p. 545.

VASQUEZ, B.; G. AVILA; D. SEGURA; B. ESCALANTE. (1996). Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 55, n. 1, p. 69-75.

VELAZQUES, J. R. D.; PRECIADO, J. I. S.; CAIRO C, S. M. (1998). Efecto del levamisol en la actividad microbicida y quimiotaxis em células polimorfonucleares. *Revista Alergia México*, v. 65, p. 43-48.

VIOLLON, C. & CHAUMONT, J.P. (1994). Antifungal properties of essencials oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, v. 128, n. 3, p. 151-153.

VOGTSBERGER, L. M.; HARROFF, H. H.; PIERCE, G. E.; WILKINSON, G. E. (1996). Spontaneous dermatophytosis due to *Microsporium canis* in rabbits. *Laboratory Animal Science*, v. 36, n. 3, p. 294-297.

WAGNER, G. (1993). Leading structures of plant origin for drug development. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 38, p. 105-112.

ZRIMSEK, P.; KOS, J.; PINTER, L.; DROBNIC-KOSOROK, M. (1999). Detection by ELISA of the humoral immune response in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*. *Veterinary Microbiology*, v. 70, p. 77-86.

ZVETKOVA, E.; WIRLEITNER, B.; TRAM, N. T. N.; SCHENNACH, H.; FUCHS, D. (2001). Aqueous extracts of *Crinum latifolium* (L.) and *Camelia sinensis* show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 2143-2150.

EXPERIMENTOS REALIZADOS

ANEXO 1

ARTIGO 1

Submetido à Revista Ciência Animal

Avaliação dos efeitos tóxicos do extrato etanólico de *Momordica charantia* administrado por via oral em camundongos.

(Evaluation of the toxic effects of the ethanolic extract of *Momordica charantia* orally administrated in mice)

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Momordica charantia* ADMINISTRADO POR VIA ORAL EM CAMUNDONGOS

(Evaluation of the toxic effects of the ethanolic extract of *Momordica charantia* orally administrated in mice)

Luziana Tavares Braga¹, Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro^{2*}, Viviane Moura de Farias¹, Ana Karine Rocha de Melo Leite¹, Maria Vivina Barros Monteiro¹, Selene Maia de Moraes².

¹Aluna do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

²Professora do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

* Autor para correspondência

Av. Paranjana, 1700 CEP 60.740-000 Campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará

E-mail: diana@uece.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do extrato etanólico (EE) das folhas de *Momordica charantia* após a administração oral em camundongos. Para tanto, os animais foram divididos em grupos (n=5) que receberam ou EE nas concentrações de 10, 50, 100 ou 500 mg/Kg ou que receberam salina, durante 5 dias consecutivos. Após o último dia do tratamento, os camundongos foram sacrificados, necropsiados, e o peso do baço e do fígado foi avaliado. O EE, nas concentrações estudadas, não induziu alterações comportamentais, não modificou o número total de leucócitos circulantes no sangue periférico e não alterou significativamente o peso relativo do fígado e do baço. Portanto, sua utilização é segura nessas doses, pois não apresentou toxicidade com relação aos parâmetros estudados.

Palavras-chave: *Momordica charantia*; extrato etanólico; toxicidade oral

Abstract

The aim of this work was to evaluate the toxic effects of the ethanolic extract (EE) of leaves of *Momordica charantia* after oral administration in mice. For this, the animals were divided in groups (n=5) that received EE at the concentration of 10, 50, 100 or 500 mg/Kg and control that received only saline during 5 days. After the last day of the treatment, mice were sacrificed, necropsied, and the weight of the liver and of the spleen were evaluated. EE at the studied concentrations did not induce behavior alterations, neither changed the total peripheral blood circulating leukocyte count had altered the relative weight of the liver and of the spleen. Thus, its use is safe at these doses, because it did not show toxicity in relation to the studied parameters.

Key-words: *Momordica charantia*, ethanolic extract, oral toxicity.

1.0. INTRODUÇÃO

Apesar do avanço tecnológico na medicina atual, a utilização de plantas medicinais com finalidades terapêuticas não caiu em desuso, seja devido às condições sócio-econômicas, ou por razões culturais. Este fato desperta a atenção dos pesquisadores que buscam compreender o mecanismo de ação das plantas, bem como a atuação de seus constituintes sobre o organismo animal, além de verificar possíveis interações de seus compostos, sua sistemática de utilização e reações adversas.

A *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) é encontrada nos trópicos, na América do Sul, Índia, China e Leste da África, sendo utilizada como um remédio popular para diversas doenças (GÜRBÜZ et al., 2000). No Brasil, é conhecida popularmente como melão-de-são-caetano, erva-de-lavadeira, erva-de-são-vicente, fruta da cobra e melãozinho (SOUZA, 2001). Várias propriedades medicinais são reportadas: antitumoral (JILKA et al., 1983, SINGH et al., 1998), citotóxica (TAKEMOTO, et al., 1982), antimutagênica (GUEVARA et al., 1990), imunomoduladora (NG et al., 1992), antiviral (LEE-HUANG et al., 1995), anti-helmíntica (BATISTA et al., 1999), hipoglicemiante (OLIVER-BEVER, 1986) e analgésica (BISWAS et al., 1991). Destaca-se também por seus efeitos estimulante, purificador sanguíneo e laxativo, sendo também indicado no tratamento de feridas, úlceras malignas, lepra e em abortos (NG et al., 1992; GÜRBÜZ et al., 2000).

Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório, utilizando o extrato alcoólico de melão-de-são-caetano em modelos de inflamação demonstraram seu efeito edematogênico e recrutador de leucócitos, além do extravasamento de proteínas (BRAGA et al., 2001) e em modelos experimentais de úlcera gástrica os extratos etanólico e hidroalcoólico das folhas de *M. charantia* apresentaram efeito anti-ulceratogênico (LEITE et al., 2002). Apesar das propriedades terapêuticas conhecidas, desconhece-se seu efeito tóxico sobre a contagem total de leucócitos do sangue periférico e seus efeitos sobre o baço e o fígado em animais experimentais.

Assim, o presente trabalho objetiva avaliar a toxicidade do extrato etanólico (EE) da *M. charantia* quando administrado por via oral em camundongos.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, entre 6 e 10 semanas de idade, pesando cerca de 30 g, oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em caixas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade.

2.2 Material vegetal

2.2.1 Coleta da planta

As folhas de *M. charantia* foram coletadas em fevereiro de 2001 de terreno baldio, nas proximidades do sítio “Meus Amores”, no município de Eusébio, Ceará. Botânicos do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará identificaram a planta e uma espécime foi depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número 31709. As folhas foram colocadas em local arejado para a secagem e posterior obtenção do extrato etanólico.

2.2.2 Obtenção do extrato etanólico (EE) de *M. charantia*

Para a obtenção do EE de *M. charantia*, às folhas secas foram adicionadas etanol a 95%. A solução obtida após uma semana de repouso, foi filtrada e submetida a um evaporador rotatório a 70°C para evaporação do solvente. O EE foi liofilizado e armazenado em freezer à

temperatura de -4°C. Para uso experimental foram feitas diluições em salina 0,9% contendo 1% de Tween 20.

2.3 Estudo da toxicidade do EE de *M. charantia*

2.3.1 Toxicidade via oral

Para avaliar a toxicidade por via oral, foram utilizados camundongos divididos em grupos teste e controle (n=5). Os animais receberam por via oral, através de uma sonda esofágica, 200 µL de EE nas concentrações de 10 ou 50 ou 100 ou 500 mg/Kg ou de salina, durante 5 dias consecutivos. Durante este período, foram observados os parâmetros comportamentais. No último dia de tratamento, o número de sobreviventes foi determinado e o efeito tóxico foi interpretado com base na mortalidade e expresso como dose letal mínima.

2.3.2 Efeito do EE sobre a contagem total de células do sangue periférico

Os camundongos receberam por via oral, através de uma sonda esofágica, 200 µL de 10 ou 50 ou 100 ou 500 mg/Kg do EE ou de salina, durante 5 dias consecutivos. Antes e ao final do tratamento foram realizadas as contagens de leucócitos totais do sangue (DAVIS & KUTTAN, 2000). Para tanto, o sangue foi coletado do plexo retro-orbital com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em tubo de ensaio heparinizado. Em seguida, uma alíquota de 20 µL da amostra de sangue foi adicionada a 380 µL da solução de Turk e realizada a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico.

2.3.3. Efeito do EE sobre o peso dos órgãos de camundongos

Os camundongos receberam por via oral, através de uma sonda esofágica, 200 µL de 10 ou 50 ou 100 ou 500 mg/Kg do EE ou de salina, durante 5 dias consecutivos. Os animais foram

pesados antes e ao final dos tratamentos e, em seguida foram sacrificados por deslocamento cervical e necropsiados para retirada do fígado e do baço. Os órgãos foram pesados e os resultados foram expressos como peso relativo dos órgãos (DAVIS & KUTTAN, 2000).

2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e analisados por ANOVA e teste t de Student ($P < 0,05$).

3.0. RESULTADOS

3.1. Toxicidade por via oral

Como observado na Tab. 1, os animais tratados com EE, nas concentrações estudadas, não apresentaram sinais clínicos de toxicidade. Os parâmetros comportamentais dos grupos testes não diferiram dos observados no grupo controle. Quanto à necropsia realizada nos animais, não foram visualizadas alterações macroscopicamente.

3.2. Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos dos grupos testes e controle antes e após os tratamentos estão demonstrados na Tab. 2.

O tratamento durante 5 dias consecutivos com o EE (10, 50, 100 e 500 mg/Kg) de *M. charantia* não induziu diferença significativa sobre a contagem total de leucócitos no sangue periférico entre os grupos controle e os testes.

3.3. Peso dos órgãos

O efeito da administração do EE de *M. charantia* sobre o peso dos órgãos dos camundongos está demonstrado nas Fig. 1 e 2.

Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos do baço e do fígado dos animais, entre os grupos testes e controle. Contudo, o tratamento de EE 500 mg/Kg de *M. charantia* reduziu em 33% o peso do baço em relação ao controle, enquanto doses crescentes de EE reduziram discretamente o peso do fígado.

4.0. DISCUSSÃO

A realização de testes de toxicidade é importante para avaliar a segurança e eficiência da utilização prática de plantas medicinais (BABÍN et al., 2001). Apesar da *M. charantia* ser uma planta bastante utilizada na medicina popular, ela se destaca por causar diversos efeitos colaterais (RIVERA, 1942; LIN et al., 1978; TAKEMOTO et al., 1982; TAM et al, 1985).

No presente trabalho, não foram observados mudanças no comportamento dos animais tratados com EE de *M. charantia* nas doses de 10, 50, 100 e 500 mg/Kg durante 5 dias consecutivos, indicando assim, que as doses estudadas não foram tóxicas.

A administração do EE, nas doses testadas, não modificou o número total de leucócitos circulantes no sangue periférico. O peso dos animais não foi afetado significativamente pela administração do EE nas diversas concentrações estudadas (dados não apresentados), demonstrando que esse extrato provavelmente não causa anorexia, nem interfere na absorção dos alimentos.

Trabalhos anteriores demonstraram que o extrato hidroalcoólico da parte aérea de *M. charantia*, na concentração de 100 mg/Kg, por via intra-peritoneal, causou um aumento do afluxo de leucócitos para a cavidade peritoneal, tendo assim, um possível efeito imunestimulante (BRAGA et al., 2002).

No presente trabalho, o EE das folhas de *M. charantia* não demonstrou ser hepatotóxico e nem induziu esplenomegalia, pois não houve diferença significativa no peso relativo do fígado e do baço, entre os grupos testes e o controle. No entanto, o tratamento de EE 500 mg/Kg reduziu em 33% o peso do baço em relação ao controle, enquanto doses crescentes de EE reduziram discretamente o peso do fígado. TENNEKOON et al. (1994) verificaram que o suco do fruto e o extrato das sementes de *M. charantia* causaram danos celulares e moleculares hepáticos, resultando em elevação de enzimas, como a γ -glutamil transferase e a fosfatase alcalina. Existem relatos que outras plantas interferem no fígado e no peso do baço de animais tratados (REBECCA et al., 2002; DAVIS & KUTTAN, 2000). O extrato metanólico da raiz de *Withania somnifera* induziu um aumento no peso do baço, indicando uma estimulação dos esplenócitos (DAVIS & KUTTAN, 2000).

5.0 CONCLUSÃO

Com base nestes resultados, verificou-se que o EE das folhas de *M. charantia*, nas doses estudadas quando administrado por via oral não é tóxico pois, não induziu mudanças comportamentais, não modificou o número total de leucócitos circulantes no sangue periférico e não alterou o peso relativo do fígado e do baço. No entanto, são necessários mais estudos que possam avaliar outros sistemas, bem como, a utilização prolongada da planta e de outras concentrações.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABÍN, M. M.; FERNÁNDEZ, G. C.; ALONSO, C.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. (2001).

Toxicological characterisation of sludge from sewage treatment plants using toxicity identification evaluation protocols based on in vitro toxicity tests. *Toxicology in vitro*, v.15, p. 519-524.

BATISTA, L. B.; BEVILÁQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S (1999). Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. *Ciência Animal*, v. 9, n. 2, p. 67- 73.

- BISWAS, A. R., RAMASWAMY, S.; BAPNA, J. S. (1991). Analgesic effect of *Momordica charantia* seed extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, p. 115- 118.
- BRAGA, L. T.; LEITE, A. K. R. M.; PINHO, C. A.; GIRÃO, V. C. C.; MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. (2001) Modulação da migração celular induzida por extratos de *Mormodica charantia* e *Lippia sidoides*. *Ciência Animal*, v.11, n. 2, p. 154-156.
- DAVIS, L.; KUTTAN, G. (2000). Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 193-200.
- GUEVARA, A. P.; LIM- SYLIANCO, C.; DAYRIT, F.; FINCH, P. (1990). Antimutagens from *Momordica charantia*. *Mutation. Research*, v. 230, p. 121-126.
- GURBUZ, I.; AKYUZ, C.; YESILADA, E.; SENER, B. (2000) Anti-ulcerogenic effect of *Mormodica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 77-82.
- JILKA, C.; STRIFLER, B.; FORTNER, G. W.; HAYS E. F.; TAKEMOTO, D. J. (1983). In vivo antitumor activity of the bitter melon (*Momordica charantia*). *Cancer Research*, v. 43, p. 5151-5155.
- LEE- HUANG, S.; HUANG, P. L.; BOURINBAIAR, A. S.; CHEN, H. C.; KUNG, H. F. (1995). Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti- HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proceeding National Academy of Sciences*, v. 92, p. 8818- 8822.
- LEITE, K. L.; LEITE, A. K. R. M.; BRAGA, L. T.; FARIAS, V. M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. (2002). Efeito protetor do extrato etanólico de *Mormodica charantia* L. e *Lippia sidoides* contra lesões gástricas induzidas experimentalmente. *Ciência Animal*, v.12, s. 1, p. 83-87
- LIN, J. Y.; HOU, M. J.; CHEN, Y. C. (1978). Isolation of toxic and non-toxic lectins from the bitter pear melon *Momordica charantia*. *Toxicon*, v. 16, p. 653-660.
- NG, T. B.; CHAN, W. Y.; YEUNG, H. W. (1992). Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from cucurbitaceae plants. *General Pharmacology*, v. 23, p. 579- 590.

- OLIVER-BEVER, B.(1996). Medicinal Plants in Tropical West Africa. Cambridge University Press, Cambridge.
- REBECCA, M. A.; ISHII- IWAMOTO, E. L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R. K. N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A.(2002). Toxicological studies on *Strynodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 101-104
- RIVERA G. (1942). Preliminary chemical and pharmacological studies on "cundeamor" *Momordica charantia*. Part II. *American Journal of Pathology*, v. 114, p. 72-87.
- SOUZA, J. A. L., 2001. Plantas medicinais usadas como anti-helmintícas estudo químico de *Spigelia anthelmia* Linn. Monografia para obtenção do título de bacharelado em Química pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.
- TAKEMOTO, D. J.; DUNFORD, C.; MCMURRAY, M. M. (1982). The cytotoxic and citostatic effects of the bitter melon (*Momordica charantia*) on human lymphocytes. *Toxicon*, v. 20, n. 3, p. 593-599.
- TAM, P. P. L.; CHAN, W. Y.; YEUNG, H. W. (1985). Effects of two forms of momorcharins and trichosanthin on early pregnancy in the mouse. *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*, p. 335-349.
- TENNEKOON, K. H.; JEEVATHAYAPARAN, S.; ANGUNAWALA, P.; KARUNANAYAKE E. H.; JAYASINGHE, K. S. A.(1994). Effect of *Momordica charantia* on key hepatic enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 44, p. 93-97.

Tabela 1: Avaliação da toxicidade por via oral do EE de *Momordica charantia* induzida em camundongos.

Tratamentos (mg/Kg/PV)	Via de Administração		Sintomas
	Via Oral		
	Dose única N°v*/N°m*	5 dias N°v*/ N°m*	
Salina	5/0		5/0
	Nenhum		
EE 10	5/0		5/0
	Nenhum		
EE 50	5/0		5/0
	Nenhum		
EE 100	5/0		5/0
	Nenhum		
EE 500	5/0		5/0
	Nenhum		

***v: número de animais vivos**

***m: número de animais mortos**

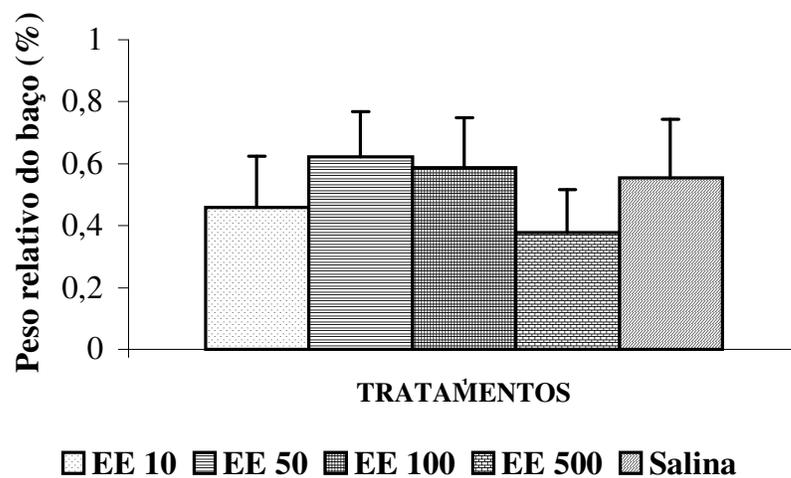


Figura 1: Efeito do EE de *M. charantia* sobre o peso do baço de camundongos.

Resultados expressos como $x \pm d. p.$ (n=5).

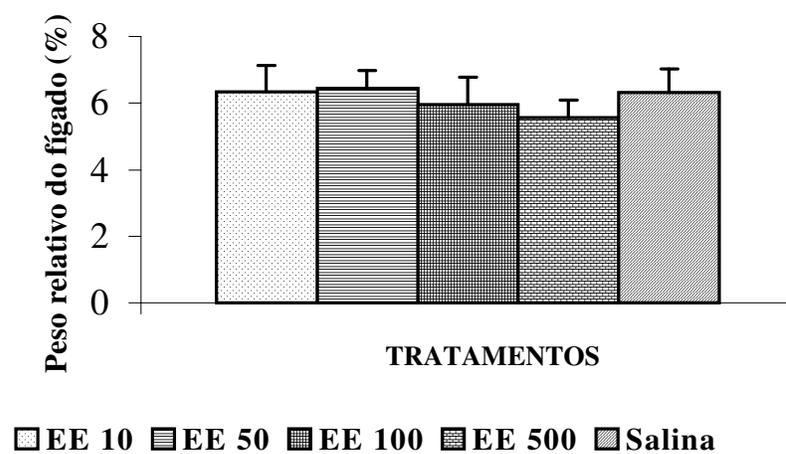


Figura 2: Efeito do EE de *M. charantia* sobre o peso do fígado de camundongos.

Resultados expressos como $x \pm d. p.$ (n=5).

ANEXO 2**ARTIGO 2****Submetido à Revista Brasileira de Ciência Veterinária**

**Utilização do extrato etanólico de *Momordica charantia* em coelhos
experimentalmente infectados por *Microsporium canis*.
(Using of the ethanolic extract of *Momordica charantia* in rabbits
experimentally-infected with *Microsporium canis*)**

Utilização do extrato etanólico de *Momordica charantia* em coelhos experimentalmente infectados por *Microsporium canis*.

(Using of the ethanolic extract of *Momordica charantia* in rabbits experimentally-infected with *Microsporium canis*)

Luziana Tavares Braga¹, Viviane Moura de Farias¹, Ana Karine Rocha de Melo Leite¹, Cláudio Afonso Pinho Lopes¹, Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro².

¹Aluna do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

²Professora do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

* Autor para correspondência

Av. Paranjana, 1700 CEP 60.740-000 Campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará

E-mail: diana@uece.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador dos constituintes da *Momordica charantia* contra a dermatofitose experimentalmente induzida em coelhos. Para tanto, coelhos jovens, Nova Zelândia, de ambos os sexos foram divididos em grupos, que receberam por via oral, durante 15 dias ou salina, ou Tween 20 a 0,1%, ou extrato etanólico (EE) das folhas de *M. charantia* (10 mg/Kg/PV), ou levamisol (25 mg/Kg), após o 15º dia da inoculação por *M. canis*. Antes e ao final dos tratamentos foi realizado o cultivo do raspado de pele, a contagem total e diferencial de células do sangue periférico e a biópsia das lesões. Os resultados indicaram que 76,19% dos animais estavam contaminados por *M. canis*. O número de leucócitos circulantes não se alterou de forma significativa antes e ao final dos tratamentos e não houve influência sobre um tipo celular específico. O EE de *M. charantia* foi capaz de reduzir significativamente os escores das lesões por *M. canis*, semelhantemente ao levamisol, indicando que possivelmente possui potencial imunomodulador.

Palavras-chave: extrato etanólico, *Momordica charantia*, *Microsporium canis*,

imunomodulação.

ABSTRACT

The aim of this work was evaluated the immunomodulator effect of constituents of *Momordica charantia* against dematophytosis experimentally induced in rabbits. For this, young rabbits, New Zeland, of the both sexes were divided in groups that received for oral via during 15 days or saline, or Tween 20 0,1%, or ethanolic extract (EE) of leaves of *Momordica charantia* (10 mg/Kg/LP), or levamisole (25 mg/Kg), after 15th day of inoculation to *M. canis*. Before and the finally of these treatments were realized the fungal culture, the total and differential peripheral blood circulating leukocyte count and biopsy of the lesions. The results showed that 76,19% of the animals were contaminated for *M. canis*. The total and differential peripheral blood circulating leukocyte count did not significated alteration before and after the experiment. The EE of *M. charantia* was to able significate reduce the scores of the lesions to *M. canis* the same form to levamisole. This indicate that EE probably have immunomodulator potential.

Keywords: ethanolic extract, *Momordica charantia*, *Microsporium canis*,

immunomodulation

1. INTRODUÇÃO

As dermatopatias representam cerca de 30% do atendimento na rotina diária da clínica médica de carnívoros domésticos, independentemente da localização geográfica e do desenvolvimento sócio-econômico (Larsson, 1995). Dentre as dermatopatias que acometem os animais domésticos, destacam-se as causadas por dermatófitos (Cavalcanti et al., 2003).

As dermatofitoses ou tinhas são afecções cutâneas caracterizadas por lesões superficiais sobre os tecidos queratinizados: unhas, garras, pêlos e *stratum corneum* da pele. Elas são causadas pela ação parasitária de fungos denominados dermatófitos (Diaz et al., 1984). Dentre os dermatófitos, destaca-se o *Microsporum canis* por ser zoofílico, isto é, transmitido ao homem por diversos animais domésticos, tendo em nosso meio como principal reservatório os felinos jovens (Sidrim et al., 1999).

A interação do sistema imune com organismos infecciosos é uma inter-relação dinâmica do mecanismo hospedeiro, objetivando o delineamento de estratégias de eliminação infecciosa e microbiana para permitir a sobrevivência na face de poderosos mecanismos efetores (Abbas et al., 2000). A resposta imune celular está envolvida no mecanismo de defesa do organismo frente à infecções causadas por fungos (Cassone et al., 1997).

A *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) é encontrada nos trópicos, na América do Sul, Índia, China e Leste da África, sendo utilizada como um remédio popular para diversas doenças (Gürbüz et al., 2000). No Brasil é conhecida popularmente como melão-de-são-caetano, erva-de-lavadeira, erva-de-são-vicente, fruta da cobra e melãozinho (Souza, 2001).

A *M. charantia* destaca-se pelas várias propriedades medicinais (Jilka et al., 1983; Oliver-Bever, 1986; Guevara et al., 1990; Biswas et al., 1991; Ng et al., 1992; Porro et al., 1995; Singh et al., 1998; Batista et al., 1999; Gürbüz et al., 2000) e, estudos toxicológicos com extratos de folhas de *M. charantia* demonstraram que havia atividade genotóxica sobre o fungo *Aspergillus nidulans* (Ruiz et al., 1996).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito imunomodulador dos constituintes da *Momordica charantia* contra a dermatofitose experimentalmente induzida em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, de ambos os sexos e com idade de 2 a 6 meses. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições adequadas de higiene, luz e temperatura, recebendo água e ração à vontade.

2.2.2 Obtenção do extrato etanólico de *M. charantia*

As folhas de *M. charantia* foram coletadas em fevereiro de 2001 de terreno baldio, nas proximidades do sítio “Meus Amores”, no município de Eusébio, Ceará. Botânicos do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará identificaram a planta e uma espécime foi depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número 31709. As folhas foram colocadas em local arejado para a secagem e posterior obtenção do extrato etanólico.

Às folhas secas de *M. charantia*, foram adicionadas etanol a 95%, e, após uma semana de repouso, a solução foi filtrada e submetida a um evaporador rotatório a 70°C para evaporação do solvente e obtenção do extrato etanólico (EE). Este, foi liofilizado e armazenado em freezer à temperatura de -4°C. Para uso experimental foram feitas diluições em salina 0,9% contendo 1% de Tween 20.

2.3 Preparação do inóculo

A cepa de *Microsporium canis* n° 41 CEMM 1-3-173 obtida da Micoteca do Centro Especializado de Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará foi isolada de amostra de raspado de pele de cães naturalmente infectados e foram cultivadas em meio ágar Sabouraud, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, ágar Sabouraud acrescido de clorafenicol e cicloheximida a 25°C, por 15 dias. Em seguida, foram estocados em ágar batata, ágar batata acrescido de dimetil sulfóxido a 10% e ágar batata acrescido de glicerol à temperatura de -20°C. Para o processamento do material infeccioso as amostras de *M. canis* foram colocadas em meio BHI (Brain and Heart Infusion), durante 7 dias em agitação constante. Após esse período, o material obtido foi lavado em água destilada várias vezes seguidas até a retirada completa do meio de enriquecimento e depois, estocado em solução salina estéril para posterior utilização em condições de temperatura, luz e umidade adequados. Esse material foi então ultrassonicado (Ultrasonic homogenizer CPX600), obtendo-se uma solução de aspecto homogêneo (COS et al., 2002). Tomando-se como referência à escala de McFarland, o material infeccioso obtido

ficou correspondente ao padrão 10 da referida escala, que equivalente a concentração de 30×10^8 partículas infecciosas por mL.

2.4 Infecção experimental

Para a infecção experimental utilizou-se a metodologia segundo Deboer & Moriello (1994). Os coelhos foram anestesiados com quetamina (Vetanarcol® injetável Konig) na dose de 25 mg/Kg por via intramuscular. Uma área de 8 cm² da região do flanco direito traseiro foi tricotomizada e escarificada com auxílio de escovas de cerdas duras autoclavadas. Uma alíquota de 1 mL do material infeccioso foi inoculada na pele escarificada com auxílio de seringas estéreis. O procedimento repetiu-se por mais 3 dias seguidos da inoculação inicial. No último dia, a área foi coberta com esparadrapo cirúrgico que foi removido após 72h.

2.5. Protocolo experimental

Para este estudo, os animais foram numerados e sorteados de maneira aleatória, para a formação dos grupos. Os tratamentos foram iniciados após o décimo quinto dia da inoculação fúngica, obedecendo ao seguinte protocolo experimental: (a) animais não infectados- controle negativo (n=3); (b) animais infectados e tratados com salina- controle positivo (n=4); (c) animais infectados e tratados com o veículo, Tween 20 a 0,1% (n=5); (d) animais infectados e tratados com o EE (10 mg/Kg/PV) de *M. charantia*, (n=6); (e) animais infectados e tratados com levamisol (25 mg/Kg.), droga de referência (n=6).

Os animais receberam por via oral, 1,5 mL dos tratamentos durante 15 dias consecutivos.

2.6. Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada antes e ao final dos tratamentos. Para tanto, o sangue foi coletado com o auxílio de seringa descartável da veia jugular, e colocado em tubo heparinizados. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 20µL do sangue e, adicionou-se à 380 µL da solução de Turk. Para contagem dos leucócitos da sangue periférico em hemocítômetro. Para a contagem diferencial de células, foi confeccionado um esfregaço sangüíneo que foi corado por May Grenwald Giensa, para diferenciação dos leucócitos ao microscópio óptico.

2.7. Observação clínica e coleta do material

Após 7 dias da infecção experimental e ao final do tratamento, procedeu-se ao raspado de pele para avaliação fúngica. Para a identificação do fungo, observou-se o aspecto da colônia em meio de cultivo e a morfologia do fungo através da montagem de um fragmento da colônia em lâmina de vidro acrescido de 2 gotas do corante lactofenol azul-algodão ao microscópio óptico. Antes e ao final dos tratamentos, foram realizadas biópsias das lesões para avaliação histológica. (Kotnik et al., 2001).

2.8. Avaliação Histológica

Amostras de 5 mm da área da pele infectada por *M. canis* e do lado contralateral correspondente foram coletadas nos dias 0 e 15 dos tratamentos. As amostras foram conservadas em formol a 10%, processadas em parafina e coradas por Hematoxilina-Eosina (H&E).

Os cortes histológicos foram avaliados microscopicamente de acordo com o grau de severidade das lesões, obedecendo-se os escores segundo a metodologia de Abu-Samra & Hago (1980) modificada: grau 0- sem mudanças histopatológicas e

pele normal; grau 1- discretas mudanças histopatológicas: leve hiperqueratose e infiltração dérmica com leucócitos; grau 2- moderadas mudanças histopatológicas: acantose e infiltração dérmica moderada com leucócitos; grau 3- severas mudanças histopatológicas: acantose e hiperqueratoses. Severa infiltração dérmica com leucócitos e histiócitos com alguns polimorfonucleares, inclusive eosinófilos. A leitura das lâminas foi realizada em “teste cego”.

2.9 Análise estatística

Os resultados oriundos das contagens total e diferencial de células foram expressos em média e desvio padrão e analisados por ANOVA e teste t de Student ($p < 0,05$). Os escores obtidos nas análises histológicas dos diferentes grupos foram avaliados pelo teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$), e as diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

3.RESULTADOS

3.1. Raspado de pele

Do total das alíquotas ($n=42$), em 85,71% ($n=36$) foi possível à observação macroscópica do fungo. Para confirmação do resultado, seguiu-se a observação microscópica, e do total observado ($n=36$), em 77% ($n=32$) foi possível à visualização de estruturas microscópicas características de *M. canis*. Essas estruturas foram caracterizadas por hifas de parede espessa, rugosa e segmentada. Pôde-se verificar que 76,19% dos coelhos infectados foram positivos para *M. canis*. Ao final dos tratamentos o resultado do cultivo foi negativo.

3.2. Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos dos grupos testes e controle antes e após os tratamentos estão demonstrados na Fig. 1. Os tratamentos com levamisol (25 mg/Kg), EE (10mg/Kg), Tween 20 (1%) e Salina, não induziram diferença significativa sobre a contagem total de leucócitos no sangue periférico em todos os grupos.

3.3 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos dos grupos testes e controle antes e após os tratamentos estão demonstrados na Tab. 1. Os tratamentos com levamisol (25 mg/Kg), EE (10mg/Kg), Tween 20 (1%) e Salina, não induziram diferença significativa sobre a contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico em todos os grupos estudados.

3.4 Avaliação histológica

Após os tratamentos, houve diferença significativa nos escores das lesões provocadas pelo fungo *M. canis*. entre todos os grupos estudados, com exceção do grupo que recebeu o EE (10 mg/Kg) quando comparado com o grupo que recebeu levamisol (25 mg/Kg).

4. DISCUSSÃO

Em animais e humanos, a dermatofitose é geralmente uma enfermidade auto-limitante (DeBoer & Moriello, 1995). Dentre os dermatófitos, o *M. canis* destaca-se na Medicina veterinária por acometer diversas espécies como cães, gatos, caprinos, coelhos e cobaias (Cavalcanti et al., 2003, DeBoer & Moriello, 1995, Abu-Samnra & Hago, 1980; Zrimsek et al., 1999), sendo também considerada uma zoonose (Sidrim et al., 1999).

Os coelhos são naturalmente infectados por *Trichophyton mentagrophytes* e por *M. canis*, embora a ocorrência deste último seja rara (Vogtsberger et al., 1986). No presente trabalho, observou-se a percentagem de 76,19% de animais comprovadamente positivos para o *M. canis*, demonstrando que coelhos podem ser utilizados como modelos experimentais para infecção por este fungo.

Durante este estudo, a dermatofitose por *M. canis* induzida em coelhos caracterizou-se pela presença de alopecia, escamas, eritema, um leve edema, aumento da espessura da pele e petéquias em toda área infectada durante 10 a 15 dias. Em trabalhos com outras espécies o quadro clínico das lesões foi semelhante. Em cobaias, as lesões caracterizavam-se por exsudato por cerca de 3 a 4 dias (Abu-Samra & Hago 1980). Em gatos, observou-se eritema, prurido, aumento da espessura da epiderme e alopecia focal no período de 70 a 90 dias (DeBoer & Moriello, 1994). Nos caprinos, Abu-Samra & Hago (1980) observaram pontos hiperêmicos, exsudato, alopecia e lesões anulares, que persistiram por cerca de 33 dias.

De acordo com trabalhos realizados por DeBoer & Moriello (1994; 1995) o modelo ideal para o estudo do desenvolvimento do curso clínico e patológico em procedimentos laboratoriais do *M. canis*, é o gato, pois este animal é capaz de produzir lesões e estas possuem a mesma duração de uma infecção natural. Entretanto, o uso de gatos naturalmente ou experimentalmente infectados pode ser problemático por diversas razões (Mignon, et al., 1999), sendo assim, a utilização de coelhos como modelo experimental pode representar uma boa alternativa.

O tratamento para as dermatofitoses pode ser de forma tópica ou sistêmica (DeBoer & Moriello, 1995). O tratamento tópico induz injúria exclusivamente nos elementos fúngicos que parasitam o *stratum corneum*, não tendo atuação sobre as

células da bainha do pêlo. Assim, ele não previne a invasão da haste pilosa pelo fungo (Borges et al., 1993). Quando o tratamento por via tópica não é efetivo, faz-se necessário à utilização de drogas sistêmicas (Rand, 2000), entretanto essas drogas apresentam efeitos adversos (Smith, 2000).

As dermatofitoses, caracterizam-se por desencadear as respostas imune celular e humoral (Zrimsek *et al.*, 1999). Em indivíduos imunossuprimidos, o tratamento tópico das dermatofitoses é, algumas vezes, menos efetivo (Smith, 2000). Sendo assim, o uso de imunomoduladores, pode auxiliar na terapia antifúngica. Neste estudo, o EE demonstrou comportamento semelhante ao levamisol, droga com atividade imunoestimulante cujo mecanismo de ação envolve a ativação de células T (Finger & Scheinberg, 2002), quimiotaxia de polimorfonucleares *in vitro* (Velazquez *et al.*, 1998). Sugerindo assim, que provavelmente o EE apresente atividade semelhante.

No presente trabalho, o tratamento dos animais por via oral com EE de *M. charantia*, reduziu significativamente as alterações histológicas quando comparados com os animais que receberam apenas veículo e salina. Resultado semelhante foi observado nos animais tratados com levamisol, uma droga com ação imunoestimulante. Esses achados demonstraram que o EE teve efeito sobre a lesão fúngica, pois após 15 dias de tratamento a epiderme apresentava-se normal, apresentando apenas hiperkeratose discreta, e presença de edema e congestão discretos na derme. Enquanto, nos grupos controle, a epiderme apresentava-se aumentada, com hiperplasia e hiperkeratose discreta, e na derme havia edema e congestão moderados, com presença de exsudato, e infiltração leucocítica.

O extrato aquoso das folhas de *M. charantia* na concentração de 1 mg/mL, foi inativa sobre *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Tricophyton mentagrophytes* *in vitro* (Caceres et al., 1991). O extrato hidroalcoólico da planta inteira seca, na concentração de 1 mg/mL foi inativa contra *Aspergillus fumigatus* e *T. mentagrophytes* (Bhakuni et al., 1988), esses estudos demonstraram que as folhas desta planta não tem atividade contra estes fungos. Entretanto, o extrato aquoso das folhas de *M. charantia*, quando utilizada na água de beber de frangos diminuiu a mortalidade e aumentou o ganho de peso das aves infectadas com *Aspergillus spp* (Lans & Brown, 1998). O presente trabalho, demonstrou que o EE

diminuiu as lesões e o infiltrado leucocítico ocasionadas pelo fungo *M. canis*, evidenciando possível atuação desse extrato sobre as células inflamatórias.

5. AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos à professora Teresa Neuma Albuquerque Gomes Nogueira, pela valiosa contribuição na leitura dos cortes histológicos, e também à (Fundação de Amparo à Pesquisa) FUNCAP, pelo suporte dado para o desenvolvimento desta pesquisa.

6. REVISÃO DE LITERATURA

ABBAS, A K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. (2000). *Cellular and Molecular Immunology*. 5. ed. W.B. SAUNDERS, p.457.

ABU-SAMRA, M. T.; & HAGO, B. E. D. (1980). Experimental infection of goats and guinea pigs with *Microsporium canis* and trials on treatment with Canesten cream and neguvon solution. *Mycopathologia*, v. 72, p. 79-84.

BATISTA, L. B.; BEVILÀQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M. & VIEIRA, L. S (1999). Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. *Ciência Animal*, Fortaleza, 9(2), 67- 73.

BHAKUNI, D. S.; GOEL, A. K., JAIN S.; MEHROTRA, B. N; PATNAIK, G. K.; PRAKASH, V. (1998). Screening of Indian plants for biological activity: Part XIII. *Indian Journal Experimental Biology*, v. 26, n. 11, p. 883-904.

BISWAS, A. R., RAMASWAMY, S., BAPNA, J. S. (1991). Analgesic effect of *Momordica charantia* seed extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, p. 115- 118.

- BORGES, M.; XHONNEUX, B.; CUTSEM, V. (1993). Oral itraconazole versus topical bifonazole treatment in experimental dermatophytosis. *Mycoses*, v. 36, p.105-115.
- CACERES, A.; LOPEZ, B. R.; GIRON, M. A.; LOGEMANN H. (1991). Plants used in guatemala for the treatment of dermatophytic infections. I. screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, n. 3, p. 263-276.
- CASONE, A.; CONTI, S.; DE BERNARDIS, F.; POLONELLI, L. (1997). Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature? *Immunology Today*, v. 18, n. 4, p. 164-168.
- CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M. A. G.; FILHO, J. B. G.; ALVES, L. C. (2003). Frequência de dermatófitos e fungos saprófitas em caninos e felinos com sintomatologia sugestiva de dermatopatia micótica atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE. *Clínica Veterinária*, n. 3, p. 24-28.
- COS, P., HERMANS, N., DE BRUYNE, T., APERS, S., SINDAMBIWE, J. B., BERGHE, D. V., PIETERS, L., VLIETINCK, A.J. (2002). Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology* v. 79, p. 155-163.
- DEBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. (1994). Development of an experimental model of *Microsporum canis* infection in cats. *Veterinary Microbiology*, v. 42, p. 289-295.
- DEBOER, D. J. & MORIELLO, K. A. (1995). Inability of two topical treatments to influence the course of experimentally induced dermatophytosis in cats. *Small Animal*, v. 207, p. 52-57.

- DIAZ, M. C.; SALAMANCA, L.; PIONTELLI, E. (1984). Dermatofitosis: um problema del pasado, um desafio del presente. *Adel. Microbiologia Enfermidad Infecciosa*, v. 3, p. 212-273.
- FINGER, E.; & SCHEINBERG, M. A. **IN** VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (2002). *Tratado de Infectologia*. 2ª edição, Atheneu, p.33-38.
- GUEVARA, A. P., LIM- SYLIANCO, C., DAYRIT, F., FINCH, P. (1990). Antimutagens from *Momordica charantia*. *Mutation Research* v. 230, p.121-126.
- GURBUZ, I., AKYUZ, C., YESILADA, E., SENER, B. (2000) Anti-ulcerogenic effect of *Mormodica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 77-82.
- JILKA, C., STRIFLER, B., FORTNER, G. W., HAYS E. F., TAKEMOTO, D. J. (1983). In vivo antitumor activity of the bitter melon (*Momordica charantia*). *Cancer Research* v.43, p. 5151- 5155.
- KOTNIK, T., ERZEN, N. K., KUZNER,J., DROBNIC-KOSOROK,M. (2001). Terbinafine hydrochloride treatment of *Microsporum canis* experimentaly - induced ringworm in cats. *Veterinary Microbiology*, v. 83, p. 161-168.
- LANS, C. & BROWN, G. (1998). Observations on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 35, p. 125-142.
- LARSSON, C. E. (1995). Dermatoparasitoses de cães e gatos: patogenia, diagnóstico diferencila e saúde pública. **IN**: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9, Mato Grosso do Sul. Anais. Campo Grande, p. 349.
- MIGNON, B. R.; LECLIPTEUX, T.; FOCANT, C. H.; NIKKELS, A. J.; PIERARD, G. E.; LOSSON, B.J. (1999). Humoral and celular immune response to a crude

- exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Medical Mycology*, v. 37, p. 123-129.
- NG, T. B., CHAN, W. Y., YEUNG, H. W. (1992). Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti- AIDS activities from cucurbitaceae plants. *General Pharmacology* v. 23, p. 579- 590.
- OLIVER-BEVER, B.(1996). Medicinal Plants in Tropical West Africa. Cambridge Univervity Press, Cambridge.
- PORRO, G., LENTO, P., MARCUCCI, F., GROMO, G., MODENA, D. (1985). Different cytotoxic activity and intracellular fate of an anti- CD5- momordin immunotoxin in normal compared to tumor cells. *Cancer Immunology Immunother* v. 40, p. 213- 218.
- RAND, S. (2000). Overview: The treatment of dermatophytosis. *Journal of American Academy of Dematology*, v. 43, p. S104-112.
- RUIZ, A.R., DE la TORRE, R. A., ALONSO, N., VILLAERSCUSA A., BETANCOURT, J., VIZOSO, A. (1996). Screening of medicinal plants for incuction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Ethnopharmacology*,v. 52, p. 123-127.
- SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J. L. B. (1999). *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica.*, 1^a. edição, Guanabara Koogan, p. 107- 131.
- SIGLER, N. A., VAILLANT, A. L., ACOSTA, M. R. (1997). Efecto imunomodulador del *Aloe barbadensis* en el paciente quirúrgico grave. *Ver. Cuba Medical Mil.*, v. 27, n. 2, p. 87-93.

- SINGH, A., SINGH, S. P., BAMEZAI, R. (1998). *Momordica charantia* (Bitter Gourd) peel, pulp, seed and whole fruit extract inhibits mouse skin papillomagenesis. *Toxicology Letters*, v. 94, p. 37- 46.
- SMITH, E. B. (2000). Treatment of dermatophytosis: Safety considerations. *Journal American Academy of Dermatology*, v.43, p. S113-119.
- SOUZA, J. A. L., 2001. Plantas medicinais usadas como anti-helmintícas estudo químico de *Spigelia anthelmia* Linn. Monografia para obtenção do título de bacharelado em Química pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.
- VELAZQUES, J. R. D.; PRECIADO, J. I. S.; CAIRO C, S. M. (1998). Efecto del levamisol em la actividad microbicida y quimiotaxis em células polimorfonucleares. *Revista Alergia México*, v. 65, p. 43-48.
- VOGTSBERGER, L. M.; HARROFF, H. H.; PIERCE, G. E.; WILKINSON, G. E. (1996). Spontaneous dermatophytosis due to *Microsporium canis* in rabbits. *Laboratory Animal Science*, v. 36, n. 3, p. 294-297.
- ZRIMSEK, P.; KOS, J.; PINTER, L.; DROBNIC-KOSOROK, M. (1999). Detection by ELISA of the humoral immune response in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*, *Veterinary Microbiology*, v. 70, p. 77-86.

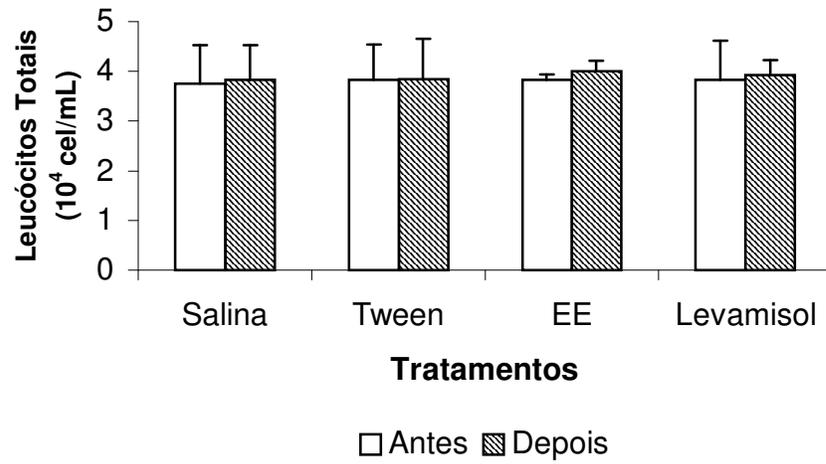


Figura 1. Contagem total de leucócitos do sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis*, antes e ao final do tratamento por via oral com EE (10mg/Kg), de *M. charantia*.

Tabela 1. Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis*, antes e ao final do tratamento por via oral com EE de *M. charantia*.

Tratamentos	Neutrófilos		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos	
	Antes ($X \pm dp$)	Após ($X \pm dp$)	Antes ($X \pm dp$)	Após ($X \pm dp$)	Antes ($X \pm dp$)	Após ($X \pm dp$)	Antes ($X \pm dp$)	Após ($X \pm dp$)
Salina	1,261±0,81	3,685±0,82	0,9±1,06	2,63±2,31	3,61±1,02	3,85±3,04	8,28±0,84	7,58±1,96
Tween 20 (1%)	2,38±0,70	2,13±1,13	4,09±2,22	3,64±1,03	4,09±3,62	2,55±1,29	6,39±1,03	7,39±1,18
EE (10 mg/Kg)	2,63±1,29	2,10±1,08	6,36±3,15	2,90±1,35	6,63±2,52	3,64±2,73	7,33±1,03	7,85±0,72
Levamisol (25 mg/Kg)	2,44±1,33	3,10±2,17	2,23±4,05	1,57±0,54	0,49±0,43	1,57±0,54	7,33±1,76	7,85±0,39

Tabela 2. Avaliação histológico da pele de coelhos infectados experimentalmente com *M. canis*, antes e ao final do tratamento por via oral com EE de *M. charantia*.

Tratamentos	Média das Ordenações	
	Dia0	Dia 15
Salina	7	10 ^{a,c,e}
Tween 20 (1%)	7,8	10 ^{b,g,i}
EE (10 mg/Kg)	7,5	6 ^{d,h,l}
Levamisol (25 mg/Kg)	14	10 ^{f,j,l}

Valores expressos como média das ordenações dos escores das lesões Teste Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e teste t de Student ($p < 0,05$) com T dia zero (3,11) e T dia 15 (10). Letras diferentes indicam a diferença estatística entre os diversos grupos.