

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ CLAUDIO CARNEIRO DE FREITAS

**Parâmetros citológicos e leucocitários de hamsters infectados
com *Leishmania braziliensis* e tratados com a fração acetato
de etila de *Cocos nucifera* Linn. (Palmae)**

**2007
Fortaleza**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ CLAUDIO CARNEIRO DE FREITAS

**Parâmetros citológicos e leucocitários de hamsters infectados
com *Leishmania braziliensis* e tratados com a fração acetato
de etila de *Cocos nucifera* Linn. (Palmae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – 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.
Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros e Aves.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

Fortaleza

2007

Universidade Estadual do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

José Claudio Carneiro de Freitas

**Parâmetros citológicos e leucocitários de hamsters infectados com
Leishmania braziliensis e tratados com a fração acetato de etila de *Cocos
nucifera* Linn.**

Defesa em: 14/12/2007

Conceito obtido: Aprovado (Nota 9,0)

Banca Examinadora

Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Orientadora - UECE

Dr. Antônio Wilson Vasconcelos
Examinador - UECE

Dra. Adriana Wanderley de Pinho Pessoa
Examinadora - UECE

Aos meus sobrinhos, João Lucas e Ana Catarina, que esse trabalho lhes sirva de exemplo e inspiração na vida que está apenas se iniciando, construindo-a em bons exemplos e dedicação ao trabalho para conquistas ainda maiores.

Ao meu grande amor Cyntia, essa vitória também é dela! Sentimentos não se escrevem, se demonstram; e é assim que eu posso tentar descrever o que você é e o que significa!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por todos os momentos que Ele me proporcionou e me tornou capaz de transformar esses momentos em vitórias como essa. Ó meu Senhor, obrigado por tudo isso, apesar de todas as minhas falhas tu me ouvistes e voltastes o teu olhar para mim!

À minha mãezinha do céu, Maria Santíssima, que sempre me acompanhou e intercedeu por mim junto ao Deus supremo, olhando para minhas dificuldades e me auxiliando na difícil caminhada. Ó mãezinha o que seria de mim sem a tua ajuda e sem seus conselhos!

À Universidade Estadual do Ceará, por ter me proporcionado executar esse experimento, podendo eu alcançar mais esse degrau na caminhada do meu processo educacional.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico e Científico, pelo apoio financeiro que foi dado com a concessão da bolsa de estudo, que possibilitou a execução de todos os trabalhos.

À Prof^a. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, por todo conhecimento que me foi passado durante o período que trabalhamos juntos, pelo apoio na execução do projeto tornando-o uma realidade e mais diretamente pelo apoio que me foi dado no momento mais difícil durante o transcorrer do curso. Onde transpareceu a arrogância e prepotência ela me respondeu com presteza e compreensão.

À Dra. Maria Jânia Teixeira, pela co-orientação que me foi concedida e os diversos conhecimentos que me foram transmitidos sem nenhuma forma de obstáculo. Além do auxílio que foi dado para a execução dos trabalhos.

Ao Dr. Wilson Vasconcelos e à Dra. Isabel Vasconcelos, por todos os conhecimentos que me passaram desde a qualificação do projeto inicial até a parte final do curso de mestrado.

À Dra. Adriana Wanderley, pelo auxílio que me foi dado na leitura das lâminas e a total disposição para elucidação de dúvidas a qualquer momento me fosse necessitado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelo conhecimento científico e profissional que me foram acrescentados no decorrer das disciplinas e nas conversas pessoais durante o período do curso.

À Ms. Cyntia Rafaelle Amaral de Abreu, por tudo o que ela significa para mim, coisa que não canso de falá-la pessoalmente, por ela existir na minha vida e por ter sido a pessoa que mais me apoiou nos momentos mais difíceis que passei. Amor, mesmo nas dificuldades e nos momentos que eu me afastei, você sempre esteve ao meu lado, garantindo-me sua total confiança. Se você continuar a ser a mesma pessoa que sempre foi, já é ótimo. Amo-te demais!

Aos meus amigos, Cícero Temístocles Coutinho Costa e Luís Christiano Rufino da Silva, pelo auxílio profissional que me foi dado, possibilitando uma maior facilidade na execução dos trabalhos.

Aos amigos, Ney Rômulo de Oliveira Paula, Emmanuel Carvalho de Oliveira, Davi Bastos Capistrano Júnior, Aurélio Santiago Franklin, Boris Nogueira de Menezes, João Alberto Holanda Gomes por todo companheirismo e parceria ocorridos ao longo desses 10 anos de boa convivência, onde agora posso dizer que tenho grandes amigos!

À EMBRAPA E PADETEC, pelo auxílio dado na preparação dos extratos, onde prontamente minha solicitação foi atendida. Sem essa colaboração não seria possível a execução dos trabalhos com a administração dos extratos em tempo hábil.

Aos meus pais, por todo apoio e dedicação a mim conferidos, desde o início de minha formação educacional, além de todo investimento feito para que mais essa vitória fosse alcançada.

Aos meus irmãos, Mairton e Francisco José, por todo apoio que me deram e por todos os momentos descontraídos e principalmente nos momentos difíceis, onde cada vez mais nos unimos e os conseguimos vencer. E também a minha irmã Iara, que com palavras seria difícil descrever o que ela significou. Muito Obrigado a todos!

Ao amigo de todos, Vereador Élon Damasceno, por toda forma de apoio que me deu: financeiro, moral, incentivo, companheirismo e muitos outros para se citar. Sem sua colaboração esse sonho não se realizaria. O seu apoio me mostrando que seria capaz foi fundamental. Que essa realização sirva de modelo para sua vitória futura!

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por sempre se mostrarem à disposição para colaborar com o bom andamento do curso. Neste período acredito ter feito uma série de novos amigos e entre eles incluo os funcionários que se doaram e vibram com essa conquista.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	Pág. 13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	Pág. 16
2.1 Breve Histórico.....	Pág. 16
2.2 Etiologia.....	Pág. 16
2.3 Reservatórios.....	Pág. 17
2.4 Transmissão.....	Pág. 18
2.5 Insetos Vetores.....	Pág. 19
2.6 Epidemiologia.....	Pág. 19
2.7 Controle.....	Pág. 21
2.8 Diagnóstico.....	Pág. 22
2.9 Resposta Imune a <i>Leishmania sp.</i>.....	Pág. 23

2.10 Tratamento.....	Pág. 25
2.11 Plantas com Atividade Leishmanicida.....	Pág. 26
2.12 <i>Cocos nucifera</i> Linn.....	Pág. 27
3 JUSTIFICATIVA	Pág. 28
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	Pág. 28
5 OBJETIVOS.....	Pág. 29
6 ARTIGO SUBMETIDO.....	Pág. 30
7 CONCLUSÕES.....	Pág. 49
	Pág. 50
8 PERSPECTIVAS.....	
	Pág. 51
9 REFERÊNCIAS.....	
10 APÊNDICE.....	Pág. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sumário do Protocolo Experimental

Tabela 2: Presença de lesões de pele em hamsters infectados ou não-infectados com *L. braziliensis* e tratados ou não-tratados com extrato acetato de etila de ACCV

Tabela 3: Avaliação do imprint de subcutâneo de patas de hamsters infectados ou não-infectados com *L. braziliensis* e tratados ou não-tratados com extrato acetato de etila de ACCV

Tabela 4: Efeito do extrato acetato de etila de ACCV nos parâmetros leucocitários de hamsters infectados com *L. braziliensis* ou não infectados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tamanho das lesões na pata posterior direita em relação com a contralateral em hamsters infectados com *L. braziliensis* e tratados ou não-tratados com extrato acetato de etila de ACCV. Onde G1 = grupo tratado e não-infectado, G2 = grupo não-tratado e infectado, G3 = grupo tratado e infectado e G4 = grupo pré-tratado, tratado e infectado.

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. As drogas de primeira escolha para o tratamento são ainda os antimonialis pentavalentes, apesar de sua cardio e nefrotoxicidade e limitações na sua administração, portanto, se faz necessária a utilização de novas drogas para o tratamento da leishmaniose. Como a população dos países em desenvolvimento ainda é muito dependente da medicina tradicional, uma ótima alternativa seria o uso e validação de drogas derivadas de plantas. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros histopatológicos e leucocitários de hamsters infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com a fração acetato de etila da água da casca de coco verde (ACCV). Foram utilizados 16 hamsters machos e adultos, com peso variando entre 120 e 140g. Os animais foram divididos em quatro grupos: G1-tratado e não-infectado, G2-não-tratado e infectado, G3-tratado e infectado e G4-pré-tratado, tratado e infectado. G1, G3 e G4 foram tratados diariamente, por via oral, com 300mg/Kg do extrato acetato de etila, durante 21 dias, sendo que G4 também recebeu um pré-tratamento cinco dias antes da infecção, com a mesma dose do tratamento. No dia -42 do experimento foram inoculados promastigotas de *L. braziliensis*, numa concentração de 2×10^7 em 20 μ L por pata, por via subcutânea, na pata posterior direita dos animais. As patas foram mensuradas semanalmente para o acompanhamento do tamanho da lesão. Sangue periférico de todos os animais foi coletado nos dias -75, -26 e 22 do experimento, para a determinação dos parâmetros hematológicos. O sacrifício dos animais foi realizado no dia 22 do experimento. Patas posterior direita e esquerda foram coletadas e seccionadas para realização de “imprint” de subcutâneo em lâminas de microscopia, que foram coradas com corante panótico, para determinar a presença de formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*, sendo também encaminhadas para histopatologia juntamente com fragmentos de pele. O extrato acetato de etila utilizado foi analisado através de uma prospecção fitoquímica, de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997), para determinação qualitativa e quantitativa dos compostos químicos presentes. Dessa avaliação fitoquímica observou-se a presença de taninos condensados, flavononóis, flavanonas e flavonóis. Nos resultados não foram observadas diferenças significativas entre o tamanho das lesões dos animais dos grupos G2, G3 e G4. Contudo, verificou-se aumento gradativo da espessura da pata infectada em relação à contralateral. Nos “imprints” foi observada nas patas infectada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* e infiltrado celular caracterizado por macrófagos, linfócitos e células gigantes, evidenciando processo inflamatório crônico. Todos os animais ganharam peso e não foram observadas alterações clínicas visíveis. A avaliação dos parâmetros hematológicos demonstrou não haver diferenças significativas, em nenhuma das coletas, nos valores de leucócitos totais e neutrófilos, apresentando eosinófilos aumentados em G1 e em G4 na segunda coleta e em G3 na terceira coleta. Já os valores relativos de linfócitos apresentaram-se mais baixos em G1 e G4 na segunda coleta e consideravelmente mais baixos em G1, G3 e G4 na terceira coleta. Então, podemos concluir que o tratamento com o extrato acetato de etila de ACCV não apresenta atividade efetiva na eliminação do agente etiológico nessas condições, sugerindo estudos futuros com mudanças no protocolo experimental.

...

ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious disease caused for protozoa parasites of *Leishmania*. The standard drugs to the treatment are the pentavalent antimonials, in spite of cardio and nefrotoxicity and the limitations in administration, therefore, it is necessary the use of new drugs to the treatment of leishmaniasis. Peoples living in development countries are depending of traditional medicine, and a great alternative will be the use and validation of plants derived-drugs. The objective of this work was to evaluate the histopatological and leukocyte parameters in infected hamsters with *Leishmania braziliensis* and treated with ethyl acetate extract of husk fiber water (ACCV). 16 hamsters were used, males, weighing between 120 and 140g. The animals were divided in four groups: G1-treated and no-infected, G2-no-treated and infected, G3-treated and infected and G4-pre and post-treated. G1, G3 and G4 were treated daily, orally, with 300mg/Kg of ethyl acetate extract, during 21 days, being that G4 received a pre-treated five days before the infection, in the same dose. In the day -42, promastigotes of *L. braziliensis* were inoculated in the concentration of 2×10^7 in $20 \mu\text{L}$ in each hind right foot pad, on subcutaneous. The footpads were measured weekly to comparing the size lesions. Peripheral blood was collected in the days -75, -26 and 22 in the experiment, to determinate the hematological parameters. The sacrifice of animals was realized in the day 22. Hind right and left footpad were collected and cut to realize an imprint of subcutaneous in microscopy slides, than it was colored with panotipo, determining the presence of amastigotes forms of *L. braziliensis*, being realized a histopatological analysis with fragments of skin. The extract used was analyzed through the phytochemical test, according to Matos (1997), to the qualitative and quantitative determinations of chemical compounds. In the phytochemical evaluation was observed condensed tannins, flavononols, flavanons and flavonols. In the results were not observed significative differences between the size of lesions of animals in G2, G3 and G4. However, was observed gradual increased in the thickness of infected footpad in relation to the contralateral footpad. In the imprints were observed in the infected footpads the presence of amastigotes forms of *Leishmania sp* and cellular findings characterized for macrophages, lymphocytes and giant cells with the presence of chronic inflammatory process. The evaluation of hematological parameters did not show significative differences, in the total leukocytes and neutrophils values. The eosinophils values presented increased in G1 and G4 in the second collection and in G3 on third collection too. However the relative values of lymphocytes were lower than the control group in G1 and G4, in the second collection, and they were considerably lower in G1, G3 and G4 in the third collection. Than, we can conclude that the treatment with the ethyl acetate extract of ACCV do not presented effective activity in the elimination of etiological agent in this condition, suggesting further studies with changes in the experimental protocols.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é um processo infeccioso causado por protozoários do gênero *Leishmania*, podendo a doença se apresentar em diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Saravia et al., 1989). A doença pode se manifestar de diversas formas em humanos, cutânea (LC), cutânea (LC), cutâneo-disseminada (LCD) e visceral (LV). Sendo a última considerada a mais grave e a causa mais freqüente de mortes, principalmente em regiões endêmicas (Ferrer, 1999). No novo mundo, a transmissão da doença ocorre através da picada de insetos do gênero *Lutzomyia* (Kenner et al., 1999). Esses insetos têm habitat preferencial em regiões de solo úmido, áreas de florestas, cavernas ou tocas de roedores (Galati et al., 1997).

Sabe-se que, aproximadamente, 90 países já tiveram contato com alguma forma da doença (Hu et al., 2000), necessitando que haja uma vigilância constante no controle, tanto nos seres humanos como nos cães, que por sua vez, são considerados os principais

reservatórios do ciclo doméstico da forma visceral, desde que foi observado intenso parasitismo cutâneo em cães e raposas do Ceará (Silva & Gontijo, 2001). O controle da leishmaniose é baseado principalmente na interrupção do ciclo de transmissão, usando medidas diretas envolvendo o vetor, *Lutzomyia longipalpis*, e o cão doméstico (Costa & Vieira, 2001), além do tratamento sistêmico dos casos humanos (Tesh, 1995). A Organização Mundial de Saúde alerta para a incidência anual de 2 milhões de casos humanos, sendo que 1,5 milhões de casos de LC e 0,5 milhão de LV.

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a leishmaniose tegumentar (LT) constitui problema de Saúde Pública. Sua importância não reside somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo. Nas Américas, a leishmaniose tegumentar ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (Gontijo e Carvalho, 2003). Da mesma forma ocorre com a *Leishmania chagasi*, que é encontrada desde os Estados Unidos até o Norte da Argentina. Casos humanos da LV ocorrem desde o México até a Argentina.

No Brasil, a LV é uma doença endêmica com registros de surtos frequentes. Está distribuída em 19 estados da Federação, atingindo 4 das 5 regiões brasileiras. Sua maior incidência encontra-se no Nordeste com 92% do total de casos, seguido pela região Sudeste com 4%, a região Norte com 3% e, finalmente o Centro-Oeste com 1% (FUNASA, 1999). Inicialmente, a sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e pequenas localidades urbanas, mas, atualmente, encontra-se em franca expansão para grandes centros. Na década de 80 foi relatado um surto epidêmico da LV em Teresina e, desde então, já foram diagnosticados casos autóctones em São Luís, Fortaleza, Natal, Aracaju, Belo Horizonte, Santarém e Corumbá (FUNASA, 1999).

Têm-se registrado em média cerca de 1.980 casos por ano. O coeficiente de incidência da LV tem alcançado 20,4 casos/100.000 habitantes, em algumas localidades de estados nordestinos, como Piauí, Maranhão e Bahia. A taxa de letalidade, de acordo com os registros oficiais, chega a 10% em alguns locais (FUNASA, 1999).

A incidência da LT no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na Região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização (Marzochi, 1992; 1994). Nos últimos anos, o

Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LT no país (CENEPI, 1999).

Achados clínicos indicam que uma larga proporção de casos está começando a se tornar resistente à quimioterapia. Eficácia variável, toxicidade, tratamento com administração parenteral com longo tempo de duração, resistência ou a associação de todos esses fatores têm sido observados (Da Silva et al., 1995; Desjeux, 1997). Por outro lado, há muitas drogas em avaliação para a quimioterapia da leishmaniose humana, muitas delas sendo novas formulações de drogas antigas (Mendonça-Filho et al., 2004).

Antimoniais pentavalentes são ainda a primeira escolha entre as drogas usadas para o tratamento da leishmaniose, apesar de sua toxicidade cardíaca e renal. Outra desvantagem na prescrição dessas drogas é a sua restrição de uso sistêmico. Como demonstrado no presente cenário clínico é desejável que novas drogas sejam desenvolvidas (Akendengue et al., 1999; Croft e Yardley, 2002).

O estudo e utilização de práticas da medicina tradicional e a escolha de drogas derivadas de plantas devem aparecer como nova estratégia para o controle da leishmaniose (Mendonça-Filho et al., 2004).

Muitas plantas, com variadas atividades na medicina popular, já foram testadas com relação à sua atividade leishmanicida, apresentando então resultados muito satisfatórios com os testes *in vitro*. Entretanto, pouco ainda foi realizado com os ensaios *in vivo*. Dentre essas podemos incluir *Cocos nucifera*, que é largamente utilizado na medicina popular do Nordeste brasileiro (Mendonça-Filho et al., 2004)

REVISÃO DE LITERATURA

1- Histórico

Existe uma convenção de que a primeira descrição do parasito *Leishmania* foi feita em 1903 por William Leishman, na Índia, ao realizar autópsia do cadáver de um soldado, vindo da estação de Dum-Dum, tendo como sintomatologia diarréia e hepatoesplenomegalia (Veronesi e Focaccia, 2002). Entretanto, já em 1898 um cientista russo chamado Borovsky fazia a primeira descrição detalhada do parasito oriundo de um paciente humano com a forma cutânea da doença (Pessoa e Martins, 1982).

No Brasil, a doença já era conhecida antes da primeira descrição do cientista russo, pois em 1885 Alexandre Cerqueira, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotômíneos como vetores. Gaspar Vianna, em 1911, propôs a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente específico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil (Vianna, 1912).

Vale ressaltar que na Itália, em 1895, foram relatadas estranhas lesões laringotraqueais em pessoas que tinham morado no estado de São Paulo e haviam retornado para sua terra natal (Pessoa e Martins, 1982).

2- Etiologia

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença infecciosa de grande relevância na medicina veterinária e humana, causada por parasitos da ordem Kinetoplastida, gênero *Leishmania* (Ross, 1903), pertencendo a dois subgêneros, *Viannia* (Lainson e Shaw, 1987) e *Leishmania* (Saf'janova, 1982). Até o momento as seis espécies mais importantes do Brasil, pertencentes aos dois subgêneros, foram identificadas como causadoras de leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie mais prevalente no homem e pode causar lesões cutâneas e de mucosas, podendo ser encontrada em todas as zonas endêmicas do país. *Leishmania (V.) guyanensis* causa mais comumente lesões cutâneas, sendo encontrada na margem norte do Rio Amazonas (Lainson e Shaw, 1987). *Leishmania (V.) naiffi* causa a evolução benigna da doença, ocorrendo nos estados do Pará e Amazonas (Shaw, 1999). *Leishmania (V.) shawi* causa casos esporádicos da doença no Pará e Amazonas. *Leishmania (V.) lainsoni* que é registrada apenas no Amazonas e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* que causa a forma anérgica ou a leishmaniose cutânea difusa (Shaw e Lainson, 1975).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença infecciosa sistêmica de grande relevância na medicina veterinária e humana, causada por parasitos da ordem Kinetoplastida, gênero *Leishmania* (Ross, 1903 *apud* França-Silva et al, 2005). A LV é a zoonose de maior importância no Velho e Novo Mundo (WHO, 1990; Paranhos-Silva et al., 1998) devido a morbimortalidade a ela associada e em virtude de sua rápida expansão (Franke e Staubach, 2002). São conhecidos como seus agentes etiológicos *L. chagasi* nas Américas e subcontinente indiano, *L. infantum* no Sul da Europa e Norte da África e *L. donovani* no resto da Europa e África (Tesh, 1995).

3- Reservatórios

Diversas espécies de vertebrados são consideradas serem hospedeiros reservatórios das leishmanioses, incluindo animais domésticos e selvagens. Entre os animais domésticos, os cães são incriminados na transmissão doméstica para humanos

sadios. Entretanto, devido ao processo de urbanização acelerado (Desjeux, 2002) o envolvimento de outras espécies domésticas na epidemiologia da leishmaniose tegumentar em focos endêmicos pode ser possível. Embora a leishmaniose felina seja considerada ainda um achado raro (Costa-Durão et al., 1994; Passos et al., 1996; Ozon et al., 1998), vários casos de ambas as formas, visceral e tegumentar, já foram registrados em gatos na América, Europa, África e Ásia (Simões-Matos et al., 2004). Por outro lado, a real suscetibilidade da infecção de gatos por *Leishmania spp.* e o desenvolvimento da doença nesses animais ainda é pouco entendido, necessitando de mais estudos sobre o assunto (Shaw et al., 2001).

Os reservatórios silvestres estão representados por raposas *Lycalopex vetulus* (Deane e Deane, 1955 *apud* Silva et al., 2005). Exemplares de *Cerdocyon thous* (Lainson e Rangel, 2005) também foram reportados como infectados naturalmente. Posteriormente, *Leishmania sp.* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis* na Bahia (Sherlock et al., 1984 *apud* Gontijo e Melo, 2004) e no Rio de Janeiro (Cabrera et al., 2003).

O homem como reservatório só foi estudado recentemente, e com isso foi sugerido que pessoas infectadas pelo parasito e com a doença ativa são capazes de transmitir o parasito (Costa et al., 2000). O homem representa um hospedeiro acidental e parece não ter um papel importante na manutenção do parasito na natureza. A inoculação da *Leishmania spp.* representa lesão cutânea na porta de entrada, de aspecto pápulo-vesiculoso ou impetigóide, que não raro evolui para regressão espontânea. A infecção pode continuar sua marcha, surgindo lesões cutâneas disseminadas e invasão da mucosa nasofaríngea (Furtado, 1994).

4- Transmissão

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas através da picada de inseto fêmea de certas espécies de flebotomíneos, caracterizando a transmissão da doença. As formas amastigotas do agente etiológico são ingeridas durante o repasto sanguíneo do vetor, vivendo no meio extracelular, na luz do trato digestivo do inseto. Ali, as formas amastigotas ingeridas, a partir do hospedeiro reservatório, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das formas amastigotas (Killick-Kendrick, 1979, 1990, 1991; Walters, 1993), sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (Neves et al., 1995). *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912 *apud* França-Silva et al., 2005) (Díptera: Psychodidae:

Phlebotominae) é o principal vetor da leishmaniose visceral humana e canina no Novo Mundo. Mais recentemente, *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938 *apud* França-Silva et al, 2005) e *Lutzomyia evansi* (Nunez-Tovar, 1924 *apud* França-Silva et al, 2005) foram incriminados como possíveis vetores no Brasil e na Colômbia, respectivamente (Galati et al., 1997; Santos et al., 1998). Mais recentemente ainda, foi demonstrado o provável papel de *L. cruzi* como vetor de *L. chagasi* em foco de leishmaniose visceral no estado do Mato Grosso do Sul (Santos et al., 1998).

Coutinho et al. (2005) sugeriram a hipótese da transmissão entre a população canina através da picada de carrapatos infectados do gênero *Rhipicephalus sanguineus*, ou até mesmo pela ingestão das suas vísceras contaminadas, fato este ocasionado pela mordedura do próprio cão devido ao prurido intenso ocasionado pelo ectoparasitismo. Em estudo realizado na França, Blanc e Caminopetros (1930 *apud* Coutinho et al 2005), demonstraram a capacidade de *R. sanguineus* infectar-se e sustentar *Leishmania* spp experimentalmente, assim como a capacidade de transmitir a infecção pela inoculação em roedores. Richardson e Kendall (1963 *apud* Coutinho et al 2005) reforçaram a hipótese de Blanc e Caminopetros sugerindo que *R. sanguineus* possa estar envolvido na transmissão de *Leishmania* spp. Outros fatores como a alta prevalência de LV canina e os baixos índices de casos humanos, assim como a dificuldade de encontrar o inseto infectado em algumas regiões, reforçam a idéia da participação de outros vetores que não acometem a população de humanos (Costa et al., 2000; Profeta et al., 2003).

5- Insetos Vetores

Nas regiões Norte e Nordeste, *L. longipalpis* foi encontrada originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão de leishmaniose visceral, tornando-se a principal espécie transmissora da doença (Lainson e Rangel, 2005).

Progressivamente, houve a adaptação desses insetos ao ambiente rural, a qual foi somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos que atuaram como facilitadores. Ao final da década de 80, foi verificada a adaptação de insetos vetores aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, principalmente na região Sudeste. Ali foram encontrados nos peridomicílios, galinheiros, chiqueiros, canis, entre outros ambientes e também no intradomicílio (Ministério da Saúde, 2003). Essas modificações no habitat do inseto devem-se ao homem, com sua ação predatória ao meio ambiente, bem como sua constante migração da área rural para as periferias das cidades, levando distante à urbanização da infecção (Marzochi e Marzochi, 1994; Bejarano et al., 2002).

As áreas ideais para o desenvolvimento do inseto são as que possuem umidade e temperatura relativamente altas. Essas condições predominam no Brasil, como já foi observado por Alencar et al. (1955) durante as pesquisas realizadas no Vale do Jaguaribe, Ceará, em que foram observadas altas concentrações do vetor nas margens do Rio Jaguaribe, onde o teor de umidade e calor era considerável.

6- Epidemiologia

Historicamente, a leishmaniose tegumentar (LT) tem se caracterizado como uma doença rural, afetando principalmente os moradores e trabalhadores dessas áreas na América Latina. Tipicamente, os homens adultos foram os mais propícios de ser infectados, como uma consequência de trabalhos militares e de outras atividades envolvendo o desmatamento (Passos et al., 1999).

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses ocorrem em 88 países, afetando mais ou menos 2 milhões de pessoas por ano em todo mundo, e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles. Do total de casos já registrados de LT, 90% ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Peru e Brasil (Desjeux, 1999).

A LT ocorre nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e Chile (Gontijo e Carvalho, 2003).

A incidência da LT no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, passando de 10,45 para cada 100.000 habitantes em 1985 para 18,63 casos para cada 100.000 habitantes em 2000. Surtos epidêmicos têm ocorrido na Região Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e mais recentemente na Região Amazônica, relacionados ao processo predatório da colonização. A região Nordeste corresponde a 39% dos casos do país, tendo a maioria sido registrada nos estados do Maranhão, Bahia e Ceará (Brandão-Filho et al., 1999). Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média de 35 mil novos casos anuais de LT no país (Marzochi, 1992; CENEPI, 1999).

Com isso, a epidemiologia da LT tem mudado no Nordeste brasileiro, onde a doença agora apresenta uma interface de áreas peri-urbana e rural, entre pessoas de todas as idades e ambos os sexos (Passos et al., 1999).

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LT constitui problema de Saúde Pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que

podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Gontijo e Carvalho, 2003).

Adicionando-se ao problema veterinário, a leishmaniose visceral canina também tem uma participação relevante no conceito de saúde pública (Bourgeade et al., 1994). A faixa etária mais acometida de humanos é de 4 a 11 anos (WHO/BDT, 1990). Em alguns focos urbanos estudados existe uma tendência de modificação na distribuição de casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (Silva & Gontijo, 2001).

Em razão da recente expansão da área de abrangência da doença e do aumento significativo do número de casos, a LV passou a ser considerada pela Organização Mundial de Saúde uma das seis prioridades entre as doenças tropicais. Atualmente a LV é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas com o risco de adquirirem a infecção. Aproximadamente, 90% dos casos ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. (WHO, 2001). A doença atinge principalmente as populações pobres desses países. Embora existam métodos de diagnóstico e tratamento específicos, grande parte da população não tem acesso a esses procedimentos, elevando os índices de mortalidade.

Em áreas endêmicas do Nordeste do Brasil é estimado que 7,5% das pessoas com menos de 15 anos de idade sejam infectadas a cada ano, e mais ou menos 20% do total de infectados desenvolvem a forma clássica da doença (WHO, 2001).

7- Controle

Conhecer a população afetada pela leishmaniose tegumentar em nosso país é fundamental para se estabelecer medidas eficazes de controle da doença. As diferenças na morbidade, resposta ao tratamento e prognóstico, relacionados em parte à espécie de *Leishmania*, evidenciam a importância da caracterização do parasito prevalente em determinada região.

No seu conjunto, estes estudos são muito importantes para se compreender a eco-epidemiologia da doença, diagnosticá-la, tratá-la, determinar os mecanismos envolvidos e assim definir estratégias e medidas eficientes de profilaxia e controle. A imunoterapia e a imunoprofilaxia, embora com resultados ainda preliminares, representam possibilidade futura promissora (Gontijo e Carvalho, 2003).

O início do programa de controle da Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil remonta à década de 50, tendo como objetivo quebrar os elos da cadeia epidemiológica da doença (Costa e Vieira, 2001). As grandes mudanças ocorridas no sistema brasileiro de saúde nas últimas décadas, relacionadas com a descentralização e unificação das ações na área de saúde pública, trouxeram novas expectativas com relação à LV (Shaw, 1999).

O enfoque principal do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) está baseado na detecção, remoção e sacrifício dos cães soropositivos (Dietze et al., 1997). O impacto desse método de controle tem sua eficácia duvidosa, pois desde 1989, aproximadamente 19.500 cães positivos têm sido sacrificados por ano, no Brasil, e a incidência de casos humanos tem sofrido acréscimos durante o mesmo período (Reithinger & Quinell, 2002). Uma das razões das falhas do programa de controle seria o longo período entre a coleta de amostras, a análise e a implementação do programa, isto é o sacrifício dos animais; permitindo assim que insetos vetores possam transmitir a doença para a população de humanos e outros cães suscetíveis (Braga et al., 2002).

Encontra-se em andamento novas experiências baseadas no controle dos vetores e centradas no reservatório canino. Recentes experimentos com coleiras impregnadas com repelentes têm mostrado eficácia para a proteção dos animais, com conseqüências positivas no que se refere à transmissão (Killick-Kendrick et al., 1997). Em estudo recente Nogueira et al (2005) concluíram que cães sorologicamente negativos, previamente vacinados contra leishmaniose, permaneceram sadios e sem infecção, condicionando assim a vacinação como uso profilático contra LVC em áreas endêmicas e epidêmicas. Vale lembrar que o tratamento com os antimoniais pentavalentes não é eficaz para o cão infectado (Dunan et al., 1989).

8- Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico disponíveis atualmente são: parasitológico, sorológico e molecular.

O diagnóstico da LT abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Frequentemente a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final (Manson-Bahr, 1987).

O diagnóstico clínico pode ser feito com base nas características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande relevância. A LT

produz um grande espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato. O complexo LT pode se apresentar nas formas: leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea-mucosa (LCM) e leishmaniose cutânea localizada (LCL), cada uma apresentando seus sinais clínicos específicos (Saravia et al., 1989).

O diagnóstico de certeza só se obtém com a demonstração do parasito (diagnóstico parasitológico), que pode ser conseguida com diversas técnicas de pesquisa direta ou indireta. O exame mais simples, e por isso o primeiro a ser realizado, é a pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda, corado pelo Giemsa ou Leishman. Outra forma de diagnóstico parasitológico seria a inoculação em meios de cultura apropriado ou em animais de laboratório, como hamsters, nas patas posteriores ou focinho (Gontijo e Carvalho, 2003).

Para o diagnóstico imunológico podemos fazer uso da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ELISA e a Intradermorreação de Montenegro (IDRM). A IDRM consiste na reação intradérmica da inoculação de antígenos de cultura de *Leishmania sp.*, com o objetivo de se detectar uma reação de hipersensibilidade tardia, uma vez que, a LT se caracteriza pelo aparecimento de uma resposta celular durante a doença e após a cura da infecção. A RIFI é o método sorológico mais utilizado, entretanto pode apresentar com facilidade reações-cruzadas, especialmente com a Doença de Chagas e calazar (Ministério da Saúde, 1994, 2000; Kar, 1995).

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina não pode ser realizado exclusivamente observando-se a sintomatologia e sinais clínicos, devido ao grande número de cães que são assintomáticos ou oligossintomáticos, devendo-se então associar ao histórico do animal a sua área domiciliar. Caso seja proveniente de área endêmica, pode-se chegar a uma forte suspeita clínica utilizando-se a partir daí outros métodos de diagnóstico (Ministério da Saúde, 2003).

Diferentes técnicas podem ser empregadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico, nenhum apresenta 100% de especificidade e sensibilidade (Palatnick de Souza et al., 2001).

9- Resposta Imune a *Leishmania sp.*

Os protozoários variam grandemente nas suas propriedades estruturais e bioquímicas. Por isso, não é surpreendente que os diferentes parasitos ativem diferentes respostas imunes específicas (Abbas et al., 2006).

O principal mecanismo de defesa contra protozoários que sobrevivem dentro dos macrófagos é imunidade mediada por células, particularmente a ativação de macrófagos pelas citocinas derivadas das células Th1 (Abbas et al., 2006).

Depois de passadas duas décadas verificaram-se vários avanços no entendimento de como o sistema imune responde à infecção no hospedeiro por patógenos intracelulares como a *Leishmania*. Geneticamente, mecanismos da imunidade inata relacionadas na expressão de receptores microbianos por células dendríticas são conhecidos por determinar a natureza da resposta imune adaptativa (Grazzinelli e Denkers, 2006).

Achados imunológicos confirmam o conceito de que a resistência às conseqüências clínico-patológicas de animais infectados com *Leishmania sp* está baseado na indução de uma resposta imune mediada por células controladas por linfócitos Th1 CD4⁺ expressando a citocina IFN- γ , que ativa os macrófagos para destruírem os parasitos intracelulares. Camundongos infectados apresentaram resposta imune mediada por linfócitos Th1 e se mostraram resistentes ao aparecimento dos sinais clínicos característicos do processo infeccioso, por outro lado camundongos infectados apresentaram resposta imune mediada por Th2, que aumenta as atividades supressivas de macrófagos pelas citocinas, principalmente a IL-4, e sucumbiram aos efeitos da doença (Heinzel et al., 1989). Fenótipos imunológicos equivalentes existem entre cães e humanos naturalmente infectados, e um grande número de estudos tem demonstrado a correlação entre a imunidade mediada por Th1 e a infecção canina assintomática (Pinelli et al., 1994, 1995; Chamizo et al., 2005; Brachelente et al., 2005). Há uma base genética na resistência canina (Solano-Gallego et al., 2001) e estudos moleculares recentes demonstraram a importância de aspectos da resposta imune inata e adaptativa mediada por células (Altet et al., 2002; Quinnell et al., 2003a, Barnes et al., 2006).

Adicionalmente, estudos experimentais sugeriram que há uma subsequente “down-regulation” da resposta de Th1 pela secreção de IL-10 pela população de células T regulatória (Treg). A leishmaniose visceral humana é caracterizada pela supressão da imunidade mediada por células e uma elevada resposta humoral. Os pacientes não apresentam proliferação linfocítica nos ensaios in vitro (Carvalho et al., 1981), bem como produção adequada de IL-2 e IFN- γ quando cultivados com a fração antigênica do parasito (Carvalho et al., 1985). A recuperação da imunidade mediada por células ao

parasito é necessária para o sucesso da terapia antimonial (Carvalho et al., 1981; Murray et al., 1989). Existem evidências clínicas e experimentais que indicam que a resolução da infecção por *Leishmania* é dependente de células, mediadas por células T e macrófagos ativadas por citocinas oriundas de células T ativadas (Murray, 1989). Estudos em pacientes infectados com *Leishmania sp.* demonstraram que nos indivíduos que foram capazes de controlar a infecção, os mesmos apresentaram uma resposta específica de Th1 com produção de IFN- γ (Carvalho e Badaró, 1985; Sacks et al., 1987).

Em murinos, a infecção está associada com a perda da capacidade das células esplênicas em produzir IFN- γ in vitro. O desenvolvimento da resposta imune celular parasito-específico requer ambos, células T CD4+ e CD8+, as quais reduzem a carga parasitária pela produção de IFN- γ e TNF- α , ativação de macrófagos e a formação de granulomas hepáticos (Kaye et al., 1991; Murray et al., 1987, Tumang et al., 1994 *apud* Moreno et al., 1999).

No caso da LVC, a base celular para a imunossupressão ainda permanece desconhecida (Pinelli et al., 1994). Entretanto, tanto os cães naturalmente como experimentalmente infectados são capazes de apresentar resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* (Abranches et al., 1991a; Cabral et al., 1992, Pinelli et al., 1994). Uma aparente resposta dicotômica foi observada em ambos os casos, onde os animais sintomáticos mostraram alto nível sorológico de anticorpos, enquanto os cães assintomáticos apresentaram uma elevação na resposta linfoproliferativa específica (Pinelli et al., 1994; Cabral et al., 1998).

Em contraste com os abundantes resultados já existentes sobre a leishmaniose experimental em murinos (Liew e O'Donnell, 1993), poucas informações existem sobre a LVC e no que se refere à imunologia canina em geral, principalmente quando se fala em marcadores e reagentes específicos. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra os homólogos caninos de antígenos de diferenciação humanos (Cobbold e Metcalfe, 1994) deu a oportunidade para definir mais precisamente a subpopulação linfóide e analisar as suas diferentes funções relatadas, nas condições normais e patológicas (Cobbold et al., 1994).

10- Tratamento:

A droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses é o antimonial pentavalente, existente sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina e o

stibogluconato de sódio, sendo que este último não é comercializado no Brasil. Visando padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a dose do antimonial seja calculada em mg/Sb^v/Kg/dia (Sb^v = antimônio pentavalente). O antimoniato de N-metilglucamina é comercializado em frasco de 5ml que contém 1,5g do antimoniato bruto, correspondente a 425g do Sb^v. Portanto, cada ml contém 85mg do produto químico. Este antimonial é recomendado para todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e possibilidade de recidivas (Montenegro, 1926).

As doses recomendadas pela Fundação Nacional de Saúde, nas formas cutâneas localizadas e disseminadas, são de 10 a 20mg/Sb^v/Kg/dia, sugerindo-se 15mg/Sb^v/Kg/dia, tanto para adultos como para crianças, aplicados IM ou EV, durante 20 dias seguidos. Já nas formas de acometimento mucoso a dose recomendada é de 20 mg/Sb^v/Kg/dia, durante 30 dias consecutivos, preferencialmente em ambiente hospitalar (Montenegro, 1926).

Os efeitos colaterais mais frequentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço no local da aplicação. A cardio, nefro e hepatotoxicidade dos antimoniais constituem numa importante limitação à sua segurança. Por serem abortivos os antimoniais não devem ser administrados em gestantes (Montenegro, 1926).

A Anfotericina B, antibiótico poliênico de reconhecida ação leishmanicida é a droga de segunda escolha. A dose inicial é de 0,5mg/Kg/dia, devendo ser aumentada gradativamente, de acordo com a tolerância do paciente, até 1mg/Kg/dia. Os efeitos colaterais mais comuns são náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. A cardio e nefrotoxicidade, além do uso EV, impedem seu uso fora do ambiente hospitalar (Montenegro, 1926).

11- Plantas com atividade leishmanicida:

Existe um consenso que o uso de terapias antileishmaniais não é efetivo para erradicar nenhuma forma da doença. Mesmo assim, os antimoniais pentavalentes ainda são a primeira escolha entre as drogas usadas para o tratamento das leishmanioses, apesar de apresentarem toxicidade cardíaca e renal. Outra desvantagem na prescrição dessas drogas seria a sua restrição no uso sistêmico. Essas observações mostram ser necessárias novas iniciativas para o controle, bem como mais estudos para elucidar os

aspectos imunes da infecção (WHO, 2003; Strauss-Ayali and Baneth, 2001 *apud* Almeida et al., 2005).

Muitas pessoas vivendo nos países em desenvolvimento ainda são muito dependentes das práticas de medicina tradicional. Por isso, a utilização e validação dessas práticas, bem como a escolha de drogas derivadas de plantas devem ser utilizadas como nova estratégia para o controle da LT (Agner et al., 2001; Prozesky et al., 2001 *apud* Mendonça-Filho et al., 2004).

Na África, a medicina tradicional tem sido tratada como assunto de elevado interesse, com estrutura, material e pessoal treinado, facilitando e controlando o uso em todos os países. Isso inclui a criação de órgãos legalizados, como o Institut National de Recherche en Santé Publique, na República do Mali. Entretanto, não é somente a leishmaniose que afeta o continente africano, onde muitas drogas são usadas para o tratamento de doenças como a malária e outras sintomatologias que possam estar associadas a outras enfermidades. Em adição, algumas plantas vêm sendo usadas nos sistemas de medicina tradicional africanos contra leishmaniose, tripanossomíases humanas, além de outras doenças parasitárias. O crescimento das investigações fitoquímicas e biológicas dessas plantas, com prioridades para a atividade antiprotozoária, fizeram dessas drogas fortes candidatas à terapia antileishmanial (Ahua et al., 2007).

Algumas plantas medicinais possuem atividades terapêuticas variadas na medicina tradicional africana. O pó da folha de *Tamarindus indica* Linn. é muito utilizado para o tratamento de astenia sexual e tripanossomíases humanas africanas (Arbonnier, 2000). O macerado de folhas com mel de *Cassia sieberiana* DC tem indicação para o tratamento de dores estomacais, malária, febre, esquistossomose (Neuwinger 1996, 2001). A aplicação tópica dos frutos de *Dichrostachys glomerata* Chiov. é utilizada para o tratamento de micoses e inflamações. As partes aéreas de *Glinus oppositifolius* Aug. são muito recomendadas para o tratamento de malária e cefaléia, na forma de pó. Já o pó das folhas de *Securinega virosa* Baill. é indicado para tratar dores abdominais, astenia sexual, malária, esquistossomose e tripanossomíase humana africana.

Para avaliar o potencial leishmanicida Ahua et al. (2007) prepararam diferentes extratos dessas mesmas plantas em diferentes modelos experimentais, *in vitro*. O extrato diclorometano das folhas de *Tamarindus indica* apresentou atividade em 89% dos parasitos na forma promastigota e 99% na forma amastigota. O extrato metanólico das

folhas de *Cassia sieberiana* mostrou a atividade em 68% dos parasitos na forma promastigota e de 83% na forma amastigota. O extrato metanólico dos frutos de *Dychrostachys glomerata* apresentou atividade em 82% dos parasitos na forma promastigota e em 95% dos parasitos na forma amastigota. O extrato diclorometano das folhas de *Glinus oppositifolius* teve um potencial leishmanicida sobre 78% das formas promastigotas e de 37% das formas amastigotas. Já o extrato metanólico de *Securinega virosa* apresentou atividade sobre 97% das formas promastigotas e de 99% das formas amastigotas.

12- *Cocos nucifera* Linn.

O fruto de *Cocos nucifera* Linn (Palmae) var. *typical* A tem a fibra da casca rica em compostos polifenólicos, cuja decocção tem sido usada contra artrite e diarreia na medicina popular no Nordeste do Brasil (Esquenazi et al., 2002). Catequinas são polifenóis que tem a forma de flavonóides com vários grupos fenóis. Catequinas, epicatequinas e epicatequinas-floroglucinol estão presentes em muitas moléculas encontradas em *C. nucifera* (Esquenazi et al., 2002). Esses grupos podem capturar prooxidantes e radicais livres, conferindo-lhes potentes características antioxidantes (Joyex et al., 1995). Estudos mostraram que as catequinas possuem um poderoso potencial inibidor de crescimento celular, apresentando atividades anticancer, antimutagênica, antibacteriana, antiviral e antiinflamatória (Yang et al., 1998; Fujiki et al., 1998; Arias and Desjeux, 1996; Yang et al., 1998; Bighetti et al., 1999).

Em estudo realizado por Mendonça-Filho et al. (2004) foi observado que o extrato rico em polifenóis de *Cocos nucifera* foi capaz de matar 100% de *Leishmania amazonensis* num intervalo de 60 minutos numa concentração de 10 µg/ml. Além disso, o mesmo extrato foi capaz de reduzir em 44% o índice de associação macrófago-parasito na mesma concentração; já na concentração de 20 µg/ml esse índice chegou a 69% de inibição.

JUSTIFICATIVA

As Leishmanioses são uma das mais importantes zoonoses que acometem o estado do Ceará. O controle desta doença baseia-se principalmente no tratamento dos humanos e eliminação de animais infectados, quebrando assim o ciclo de transmissão da

doença. As drogas de primeira escolha para o tratamento são os antimonialis pentavalentes, entretanto esses medicamentos possuem a desvantagem de serem altamente cardio e nefrotóxico. Por isso, faz-se necessário a busca de um tratamento adequado para os hospedeiros reservatórios, tanto no que se refere à parte financeira como a sua utilização no animal. Como a população dos países em desenvolvimento ainda é muito ligada à medicina tradicional, se torna mais fácil buscarmos nos fitoterápicos uma forma de tratamento alternativo. Muitas plantas com atividades variadas na medicina tradicional já foram testadas no que se refere à sua capacidade leishmanicida, apresentando resultados satisfatórios *in vitro*. Dentre elas podemos incluir o *Cocos nucifera*, uma planta facilmente encontrada na vegetação natural do Nordeste brasileiro, que através do extrato rico em polifenóis, do líquido oriundo da fibra de sua casca, apresentou excelente atividade leishmanicida nos testes realizados *in vitro*.

HIPÓTESE CIENTÍFICA

O extrato rico em polifenóis da fibra da casca de *Cocos nucifera* possui atividade imunostimulante *in vivo*, em animais infectados com *Leishmania sp.*

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo avaliar os parâmetros histopatológicos e leucocitários de animais infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados ou não com o extrato acetato de etila da fibra da casca de *Cocos nucifera* Linn. (Palmae).

Objetivos Específicos

Avaliar a resposta inflamatória localizada nos animais através do acompanhamento do tamanho da lesão;

Avaliar a presença de lesões de pele nos animais ao longo do experimento.

Avaliar os parâmetros leucocitários em hamsters infectados ou não com *L. braziliensis* e tratados ou não com extrato acetato de etila da água da casca do coco verde (ACCV).

Avaliar os aspectos histopatológicos dos imprints de subcutâneo de patas infectadas ou não de hamsters tratados ou não com extrato acetato de etila de ACCV.

**Evaluation of lesions imprint in infected hamsters with
Leishmania braziliensis and treated with ethyl acetate extract
of Husk Fiber Water (ACCV)**

**J. C. C. Freitas^a, D. C. S. Nunes-Pinheiro^{b,a}, L. C. R. Silva^a, M. J.
Teixeira^c, C. R. A. Abreu^d**

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) Universidade
Estadual do Ceará (UECE), Brazil*

^b *Laboratório de Imunologia e Bioquímica Aplicada, Faculdade de Veterinária, UECE,
Brazil*

^c *Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML), Universidade Federal do
Ceará (UFC), Brazil*

^d *Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade
Federal do Ceará (UFC), Brazil*

* Corresponding author. Tel.: 85 32818446; fax: 85 31019860

E-mail address: joseclaudiocarneiro@yahoo.com.br (J. C. C. Freitas)

Abstract

The objective of this study was to evaluate the cellular infiltrate in footpad subcutaneous imprints in infected hamsters with *L. braziliensis* and the effect of the treatment with ethyl acetate extract of ACCV. Four groups (n=4) of hamsters, males (150 g) were used, treated with ACCV orally (0,2 mL, 300 mg/Kg) and infected with LB by subcutaneous (20 millions), in the day -42, hind right footpad. In the groups G1, G3 e G4 was administered ACCV every day since the infection, while G2 was pre-treated in same conditions. Blood was collected, in days -75, -26 e 22 of study and carried to determinate the haematological parameters. In the day 22, it was realize the imprint of subcutaneous hind footpad in microscopy slides. The neutrophils and leukocyte values doesn't have significative differences. The eosinophils and monocytes values presented increased in G1, G3 and G4; in G3 and G4, respectively. The relative values of lymphocytes were lower than the control group in G1, G3 and G4, and the values remained compatible with the normality in G2. Verified it that in opposite footpad doesn't found amastigotes forms of *Leishmania sp.* However, in the infected footpad were found small quantify of amastigotes forms and cellular infiltration characterized for macrophages, lymphocytes and giant cells associated with the presence of chronic inflammatory process. Our results suggest that the treatment with ethyl acetate extract of ACCV does not have effective activity in etiological agent elimination in these conditions, suggesting further studies, with changes in the experimental protocol.

1. Introduction

Tegumentary leishmaniasis (TL) is caused by a great number of *Leishmania* species in world (Lainson and Shaw, 1978). *Leishmania braziliensis* is the predominant etiologic agent of TL in the Northeast region of Brazil (Lacerda, 1994). The protozoan is transmitted by the bite of sandflies (Adler and Theodor, 1927). The morphology of the skin lesions varies, but they can become large, destructive ulcers, which persist for many months before healing (Pearson et al., 1999). In some cases, infected peoples do not develop any clinical manifestations and they are identified by a delayed type hypersensitivity response to *Leishmania* antigens (Follador et al., 2002). The determinants of clinical outcome are not totally understood, but seem to include

environmental factors as well as the genetic predisposition of the host (Cabrera et al., 1995; Alcais et al., 1997; Blackwell, 1999).

TL has become an increasingly problem in Brazil. The TL incidence has increased from 10.45 cases per 100,000 individuals in 1985 to 18.63 cases per 100,000 individuals in 2000. The Northeast region of Brazil reports 39% of the cases of TL. The majority of the cases come from Maranhão, Bahia and Ceará states (Brandão-Filho et al., 1999). The increased number of cases reported of TL in peri-urban and urban areas in Brazil suggests that the *Lutzomyia*, species responsible for transmission, may have successfully adapted to new niches (Teodoro and Kuhl, 1997; Passos et al., 1999; Ximenes et al., 2000; Campbell-Lendrum et al., 2001).

Antimonials and Amphotericin B are currently used as standard drugs. However, they are associated with toxic side effects and have a restricted therapeutic spectrum for all clinical form of leishmaniasis (Davis et al., 2004). In this context, the discovery of new active compounds with antileishmanial potential remains essential for the control and prevention of leishmaniasis. Contrary to other diseases, leishmaniasis is properly identified as a disease by the natives of the Amazonian forest. This justifies the search for new leads based on ethnomedicine (Dedet et al., 1989).

Most people living in developing countries are almost completely dependent on traditional medical practices for their primary health care needs and higher plants are known to be the main source of drug therapy in traditional medicine (Agner et al., 2001; Prozesky et al., 2001).

Cocos nucifera has a fiber husk rich in polyphenolic compounds. Catechins and epicatechins are present in high amounts in the polyphenolics molecules found in *C. nucifera* (Esquenazi et al., 2002). These groups can capture prooxidants and free radicals, which confer upon them potent antioxidant characteristics. The catechins are a powerful inhibitor of cellular growth (Joyex et al., 1995; Yang and Wang, 1998).

The aim of this work was to evaluate the cellular infiltrate in paws subcutaneous imprints in infected hamsters with *L. braziliensis* and the effect of the treatment with ethyl acetate extract of ACCV.

2. Materials and Methods

2.1. Extraction and fraction isolation

The husk fiber of coconut (414 g) was dried in the sun, finely ground and the powder soaked for 3 h in 6 L of boiling distilled water. The extract was filtered and

lyophilized, yielding 21 g of crude water extract. 500 mg of the lyophilized crude water extract was dissolved in water (1 L) and partitioned with ethyl acetate. It was realized a HPLC and a Phytochemical Study of extract. The polyphenolic extract from *C. nucifera* was used in this study.

2.2. Phytochemical Study of ethyl acetate extract of ACCV

The extracts were yield to Phytochemical study to determinate cyanogenic heterosides, phenols, tannins, anthocyanidins, anthocyanins, flavonoids, catechins, flavanons, flavonols, flavanonols, xantonas, steroids, triterpenoids, saponins, alcaloids, according to Matos (1997).

2.3. Animals

Three to four months old, male, golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) weighing 120 to 140g were used. Animals were housed in groups of four and had water and food *ad libitum* throughout the study. All animal experimentations have been conducted in accordance with the guidelines for care and use of experimental animals of the Brazilian College of Experimental Animals (COBEA). The ethics Committee of the State University of Ceará approved the protocols employed.

2.4. Parasites

The *L. braziliensis* strain MHOM/BR/94/H-3227 used was isolated from cutaneous ulcer from patient with cutaneous leishmaniasis, from state of Ceará, after brief (2-4) passages in culture medium. The isolate was identified as *L. braziliensis* by monoclonal antibodies and PCR. Promastigotes were grown in Schneider medium (Sigma, St Louis, MO) at 25°C supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100U/mL of penicillin and 100µg/mL streptomycin (All from Gibco). Stationary phase promastigotes were used for infection. Before use, promastigotes were harvested from culture, washed in sterile saline and resuspended to get the desired concentration. The parasites were given for Dra. Maria Jânia Teixeira, from Parasitology Laboratory in Federal University of Ceara. The animals were infected with 20 millions of promastigotes forms.

2.5. Infection

Promastigotes forms of *L. braziliensis* (2×10^7) were inoculated on right hind footpad in the hamsters from the groups G2, G3 and G4, in the day -42 of experiment, and the infection evolution was evaluated and measured weekly through of infected paws edema to that presenting a evident lesion area, to the start of the treatment. Lesion sizes were measured with a dial gauge calliper (Mitutoyo, 0,01mm sensitivity) and expressed as the difference in the thickness (mm) between the infected footpad and contralateral uninfected footpad. Measurements initiated 1 week after the inoculation of promastigotes and continued for a period of 21 days.

2.6. Imprints

In the day 22, it was realize the imprint of subcutaneous hind paws in microscopy slides, being fixed in alcohol (70%) and colour with PANOTIPO®. The analysis of slides was made through of optical microscopy with immersion oil (400x), to see the amastigotes forms of *L. braziliensis* and the cellular infiltrate to evaluate the infectious process. The exam was realised in double blind.

2.7. Treatment and Experimental Protocol

The animals from G4 received a single dose prior treatment with 300 mg/Kg of the extract, in the day -47 of experiment, five days before of the parasite inoculation. The animals from G1, G3 and G4 received the treatment daily after confirmation of infection by *Leishmania* and it was called day 0 (Table 1), with the same concentration of the extract, for 21 consecutive days at 300 mg/Kg of the extract (day 0 to day 21 in experiment). G1 was not infected and G2 was infected but not treated.

2.8. Leukocyte parameters of infected hamsters with *L. braziliensis* and treated or no-treated with ethyl acetate extract of ACCV

Peripheral blood samples of all animals were collected, in days -75, -26 and 22 of the experiment, by retro-orbital plexus; with a Pasteur pipette previously heparinized to prevent the coagulum formation. All samples were processed using an individual blood of the animals in each group, testing and controls, in an automatic instrument (Cell-Dyn 3700) to determine the haematological parameters.

2.9. Statistical Analysis

The measured of lesions and the leukocyte parameters were expressed in mean values and standard error. Tukey test was used to evaluate the lesions values ($p < 0,05$)

3. Results

The phytochemical study of ethyl acetate extract of ACCV revealed the presence of condensed tannins, flavanonols, flavanols and flavonols.

Thin-layer chromatography was used to evaluate the purification. Spots were visualized by spraying vanillin-sulfuric acid reagent. Ethyl Acetate extract was also used for HPLC analysis and the contents indicated high concentrations of polyphenolic compounds such as catechins and epicatechins. Comparison with catechin standards confirmed these results, as previously described by Esquenazi et al., (2002) and Mendonça-Filho et al., (2004).

The evolution of the lesions in right hind footpad of hamsters is showed on Figure 1. In the measured of the lesions on infected footpad from G2, G3 and G4, it can observed that does not have a significative difference between the groups, evidencing a gradual increased in the thickness of infected footpad in relation to the contralateral footpad. However, the values of G3 and G4 showed discretely increased in relation to G2, since the day 7 to the day 21. In G1 don't have alteration in paws during the whole experiment.

In the clinical evaluation of body lesions in the animals (Table 2), it can verify the appearing of lesions in the experiment. The beard of ventral region show it bristled in one animal of G2 and in two animals of G3, which replaced for a gradative failure of beard in the ventral region evidencing a lesion.

In G1 and G4 the skin of the animals remained perfect in the whole experiment, however in G2 and G3 were observed some few lesions in ventral region of three animals, between the days 7 and 14 of the experiment, remaining in G2 to the end of experiment and in G3 couldn't see the lesions in the day 21 anymore.

When the former paws and nails were analysed, doesn't evidencing visible alterations. Eyes and ears had an appearance according to the normality. The snout of animals presented few reddish, suggesting a little irritation process in three animals from G2 and in one animal from G3 (Table 2).

Table 3 presents the results of subcutaneous imprints of infected or no-infected paws of hamsters with *L. braziliensis* and the opposite paw. Verified it that in opposite paws doesn't found amastigotes forms of *Leishmania sp.* However, in the infected paws

were found small quantify of amastigotes forms and cellular infiltration characterized for macrophages, lymphocytes and giant cells associated with the presence of chronic inflammatory process. In the majority of cases was possible to see epithelial cells and cell debris.

The evaluation of leukocyte parameters (Table 4) demonstrated doesn't have significative differences in the total leukocyte and neutrophils values. The eosinophils values presented increased in G1 and G4 in the second collection and in G3 on third collection too. The monocytes presented increased values in G3 and G4 in the second collection and with very increased values in G2 in the third collection. The basophil didn't present significative difference in the relative values in the three collection realized. However, the relative values of lymphocytes were lower than the control group in G1 and G4, in the second collection, and they were considerably lower in G1, G3 and G4 in the third collection, and the values remained compatible with the normality in G2.

4. Discussion

There is a great deficiency of cheap and efficient therapeutic agents to the treatment of parasitic diseases caused by protozoa, which happen in the development countries principally. One of these diseases is the leishmaniasis. The pentavalent antimonials are the standard to the treatment of leishmaniasis in the more affect areas, with the anfotericina B and pentamidina being used in alternative treatment (Akendengue et al., 1999). These agents are inefficient with oral administration and require parenteral administration for long time. Still, they present serious collateral effects, they are very expensive and the resistance to these compounds is a great problem (Arias and Desjeux, 1996). Then, the discovery of new drugs is necessary urgently.

There is an agreement that new plants derived-drugs, obtained through of ethno pharmacological studies, has showed interesting results. Laboratory studies were started and developed preliminary investigations of alternatives compounds to the control of growth of some microorganisms, including bacteria, fungi and protozoa (Esquenazi et al., 2002; Rosa et al., 2003).

Since the 1950s, it is observed that many chemical constitutes plant-derived were studied yet and the leishmanicidal effects were proved. However, a great number of this constitutes was tested only to protozoal promastigotes forms in vitro, being then

necessary more deepened studies with the *in vivo* tests, confirming the real effect of this drugs (Iwu et al., 1994)

Some natural compounds with antileishmanial activity are being investigated in several laboratories and corresponding to the following groups: alkaloids, terpens, quinons, lactons, cumarins, chalcones, tetralons, lignins and saponins (Delorenzi et al., 2001).

In the work described for Mendonça-Filho et al. (2004) was demonstrated the *in vitro* activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. A great number of utilization of this plant, in the popular medicine, was described yet, according to Duke (1992). In the same work was observed that the ethyl acetate extract, rich in polyphenols compounds, showed inhibitory activity to the two development stages, promastigotes and amastigotes forms, of *L. amazonensis* (Mendonça-Filho et al., 2004).

In the present work it was realized an *in vivo* test with hamsters, that were used like experimental models. This choice was made because these animals, among other are susceptible to *Leishmania sp* infection, presented greater susceptibility to *L. braziliensis* infection. This information was confirmed in a study realized to Neal and Hale (1983), where the results were compared among the mouse BALB/c, CBA/H, CDI and the own hamsters infections.

Other important clinical sign in the infectious process caused by *Leishmania sp* are the skin lesions. This sign is characteristic of this tegumentary form of disease, which was referred in this study. These lesions can remain in sub clinical form or immediately after the infection can show it clinically apparent, occurring in some cases (Herwaldt et al., 1999)

In present work, the three animals including in G3 presented similar lesions to G2, since the day 7 of experiment too, with total reversion in the day 14. Then, with this found, it suggest that the extract don't stimulate a degenerate cutaneous activity and presented a prophylactic epithelial activity and curative to the characteristics lesions of infectious process.

Stereotypely, the lesions can evolutes from papules, to nodules, to ulcerate lesions, with a central lesion and hardened side, and more particularly can appear of pruriginous form, secondary to a bacterial infection, like is the case of *L. braziliensis* infection (Herwaldt, 1999).

The animal infection was made through the subcutaneous inoculation, on right hind paw and the lesions was evaluated weekly, with the accompanying of paws edema. In all infected animals, the lesional growth was always positive and gradates, and after 42 days was possible measure an evident lesion, in comparison with the opposite paw, and to start a treatment with the extract. Then started the treatment with the extract and the measure continue with the same frequency used. In the final evaluation, was possible observe that the edema were always growth, in all infected groups, characterizing an active inflammatory process.

Immediately after the end of treatment and hind animals sacrifice, was realized a subcutaneous imprint of hind paws, infected and opposite, of all animals, to observe the presence of amastigotes forms of *L. braziliensis* and the cellular infiltrate characteristic to the infectious process.

Then, after the slide coloration, was observed that the number of parasites present in the infectious place was reduce, and only two animals of G3 and in three animals of G4 was possible the visualization. Already in G2 was found in one animal only, but with high quantify of parasites. This is possible, for the reason of the carrier of this estranges bodies to the drainage immunological site, possibility to return the immune response more effective, through the lymphocyte action active previously, like was proved in the haematological evaluation, before that the clinical disease was evidenced, beyond of to decrease the time of parasite transmission.

The cellular infiltrate were characteristic of chronic infectious process, and in the majority of the cases, with the presence of a high number of cells, like intact macrophages, lymphocytes and giants cells, being principally visible in the treated groups. Than, this was evident the fact inversion that to maintain it in a chronic infectious process, the parasites may subvert the macrophage accessory cells activity and this form to decrease the protect immunity (Alexander et al., 1999).

Naturally infected patients for some specie of *Leishmania*, among the more evident clinical signs, is easily detectable alterations in the haematological parameters. Among the most common, is observed leukopenia with neutropenia and a moderate lymphocytose and monocytose, beyond of patient's present anemia since the infection start (Herwaldt, 1999). However, differently of demonstrated in infectious process, in present study, the infected and treated animals presented increased eosynophils values, monocytose in G3 and in G4, accentuated lymphopenia in G1, G3 and in G4 and the total leukocytes values and neutrophils remained unaltered, in comparison to the normal

parameters, proving that the extract presented a positive immunomodulator effect in the infectious process with *L. braziliensis*, suggesting that the lymphocytes active migrated to the immunological defence site.

Our results suggest that the treatment with ethyl acetate extract of ACCV does not have effective activity in etiological agent elimination in these conditions, suggesting further studies, with changes in the experimental protocol.

5. References

- ADLER, S., THEODOR, O., 1927. The transmission of *Leishmania tropica* from artificially infected sand flies to man. *Annual of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 21, p. 89-110.
- AGNER, A. R., MACIEL, m. A., PINTO, A. C., COLUS, I. M., 2001. Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a cleorodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Medicine*, v. 67, p. 815-819.
- AKENDENGUE, B., NGOU-MILAMA, E., LAURENS, A., HOCQUEMILLER, R., 1999. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite*, v. 6, p. 3-8.
- ALCAIS, A., ABEL, L., DAVID, C., TORREZ, M. E., FLANDRE, P., DEDET, J. P., 1997. Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary leishmaniasis in a recently exposed bolivian population. *American Journal of Human Genetic*, v. 61, p. 968-979.
- ARIAS, J., DESJEUX, P., 1996 *Manuel de lutte contre la leishmaniose viscerale*. WHO/LEISH/96.40, WHO, Geneve, Swiss.
- BLACKWELL, J. M., 1999. Tumor necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasitology Today*, v. 15, p. 73-75.
- BRANDÃO-FILHO, S. P., CAMPBELL-LENDRUM, D. H., BRITO, M. E. F., SHAW, J. J., DAVIES, C. R., 1999. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in North-East Brazil. *Transactions of Society Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 488-494.
- CABRERA, M., SHAW, M. A., SHARPLES, C., HAZEL, W., CASTES, M., CONVIT, J., BLACKWELL, J. M., 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 182, p. 1741-1752.
- CAMPBELL-LENDRUM, D. H., DUJARDIN, J. P., MARTINEZ, E., FELICIANGELI, M. D., PEREZ, J. E., SILANS, L. N., DESJEUX, P., 2001. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 159-162.
- DAVIS, A. J., MURRAY, H. W., HANDMAN, E., 2004. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends in Parasitology*, v. 20, p. 73-76.

- DEDET, J. P., PRADINAUD, R., GAY, F., 1989. Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, p. 616-620.
- DELORENZI, J. C., ATTIAS, M., GATTASS, C. R., ANDRADE, M., REZENDE, C., CUNHA-PINTO, A., HENRIQUES, A. T., BOU-HABIB, D. C., SARAIVA, E. M. B., 2001. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Pesquiera australis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, p. 1349-1354.
- DUKE, J. A., 1992. *Handbook of phytochemical constituents of Grass Herbs and other economic plants*. CRC Press, Boca Raton
- ESQUENAZI, D., WIGG, M. D., MIRANDA, M. M. F. S., RODRIGUES, H. M., TOSTES, J. B. F., ROZENTAL, S., DA SILVA, A. J. R., ALVIANO, C. S., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, v. 153, p. 647-652.
- FOLLADOR, L., ARAUJO, C., BACELLAR, O., ARAUJO, C. B., CARVALHO, L. P., ALMEIDA, R. P., CARVALHO, E. M., 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Disease*, v. 34, p. 54-58.
- HERWALDT, B. L., 1999. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 354, p. 1191-1199.
- IWU, M. M., JACKSON, J. E., SCHUSTER, B. G., 1994. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today*, v. 10, n. 2, p. 65-68.
- LACERDA, M. M., 1994. The Brazilian leishmaniasis control programme. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 489-495.
- LAINSON, R., SHAW, J. J., 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, v. 273, p. 595-600.
- MENDONÇA-FILHO, R. R., RODRIGUES, I. A., ALVIANO, D. S., SANTOS, A. L. S., SOARES, R. M. A., ALVIANO, C. S., 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, v. 155, p. 136-143.
- NEAL, R. A., HALE, C., 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*, n. 87, p. 7-13.
- PASSOS, V. M. A., FERNANDES, O., LACERDA, P. A. F., VOLPINI, A. C., GONTIJO, C. M., DEGRAVE, W., ROMANHA, A. J., 1999. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous

leishmaniasis in the state of Minas Gerais, South-East Brazil. *Acta Tropica*, v. 72, p. 251-258.

PEARSON, R. D., DE SOUSA, A. Q., JERONIMO, S. M. B., 1999. *Leishmania* species: visceral, cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Principles and Practice in Infectious Disease*, v. 2, 5^a ed, New York, p. 2831-2845.

PROZESKY E. A., MEYER, J. J. M., LOUW, A. I. , 2001. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 239-245.

ROSA, M. S. S., MENDONÇA-FILHO, R. R., BIZZO, H. R., RODRIGUES, I. A., SOARES, R. M. A., SOUTO-PEDRON, T., ALVIANO, C. S., LOPES, A. H. C. S., 2003. Antileishmanial activity of linalool-rich essential oil from *Croton cajucara* Benth. *Antimicrobial Agents Chemoterapy*, v. 47, p. 1895-1901.

TEODORO, U., KUHL, J. B., 1997. Sandflies and domestic animals interaction and *Lutzomyia intermedia* predominance in an area with a high level of anthropy, in Southern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, p. 512-516.

XIMENES, M. E. F. M., CASTELLON, E. G., SOUZA, M. F., FREITAS, R. A., PEARSON, R. D., WILSON, M. E., JERONIMO, S. M. B., 2000. Distribution of phlebotomine sandflies in the state of Rio Grande do Norte. *Brazilian Journal of Medicine and Entomology*, v. 37, p. 162-169.

YANG, G. Y., WANG, Z., 1998. Tea and cancer. *Journal of National Cancer Institute*, v. 85, p. 1038-1049.

TABLE LIST

Table 1: Summary of Experimental Protocol

Table 2: Presence of skin lesions in infected or no-infected hamsters with *L. braziliensis* and treated or no-treated with ethyl acetate extract of ACCV

Table 3: Evaluation of subcutaneous imprint from infected or no-infected footpad of hamsters with *L. braziliensis* and treated or no-treated with ethyl acetate extract of ACCV

Table 4: Effect of ethyl acetate extract of ACCV in the leukocyte parameters of infected hamsters with *L. braziliensis* or no-infected hamsters.

Table 1

GROUP	N	STATUS	SEX	N° infecting <i>Leishmania</i>
G1 – Treated	04	No-infected	Male	-----
G2 - No-Treated	04	Infected	Male	2×10^7
G3 - Treated	04	Infected	Male	2×10^7
G4 – Pre and Post-Treated	04	Infected	Male	2×10^7

Table 2

LESIONS	G1 – NO-INFECTED AND TREATED GROUP					PLACE		
	day -5	day 0	day 7	day 14	day 21	D	V	S
0 (-)	04	04	04	04	04	-----		
1-3 (+)	00	00	00	00	00	00	00	00
4-6 (++)	00	00	00	00	00	00	00	00
>6 (+++)	00	00	00	00	00	00	00	00
LESIONS	G2 - INFECTED AND NO-TREATED GROUP					PLACE		
	day -5	day 0	day 7	day 14	day 21	D	V	S
0 (-)	04	04	03	00	00	-----		
1-3 (+)	00	00	01	04	04	00	03	03
4-6 (++)	00	00	00	00	00	00	00	00
>6 (+++)	00	00	00	00	00	00	00	00
LESIONS	G3 – INFECTED AND TREATED GROUP					PLACE		
	day -5	day 0	day 7	day 14	day 21	D	V	S
0 (-)	04	04	01	01	04	-----		
1-3 (+)	00	00	02	02	00	00	02	01
4-6 (++)	00	00	01	01	00	00	01	00
>6 (+++)	00	00	00	00	00	00	00	00
LESIONS	G4 - PRE AND POST-TREATED AND INFECTED GROUP					PLACE		
	day -5	day 0	day 7	day 14	day 21	D	V	S
0 (-)	04	04	04	04	04	-----		
1-3 (+)	00	00	00	00	00	00	00	00
4-6 (++)	00	00	00	00	00	00	00	00
>6 (+++)	00	00	00	00	00	00	00	00

Legend: D = dorsal, V = ventral, S = snout.

Table 3

G1 - Treated and No-Infected Group	
Right Hind Footpad	Left Hind Footpad
Slide 1: negative to <i>Leishmania sp.</i> desquamation cells.	Slide 2: negative to <i>Leishmania sp.</i> lipocellular material and anuclear cells
Slide 3: negative to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 4: negative to <i>Leishmania sp.</i> and anuclear cells and desquamation cells.
Slide 5: negative to <i>Leishmania sp.</i> , and anuclear epithelial cells	Slide 6: negative to <i>Leishmania sp.</i> and acellular material
Slide 7: negative to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 8: negative to <i>Leishmania sp.</i> And acellular material
G2 - No-Treated and Infected Group	
Slide 9 : negative to <i>Leishmania sp.</i> and desquamation cells	Slide 10: negative to <i>Leishmania sp.</i> desquamation and inflammatory cells
Slide 11: negative to <i>Leishmania sp.</i> desquamation and inflammatory cells	Slide 12: negative to <i>Leishmania sp.</i> and desquamation cells.
Slide 13: negative to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 14: negative para <i>Leishmania sp.</i> and acellular material.
Slide 15: positive (+++) to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 16: negative para <i>Leishmania sp.</i> and acellular material
G3 - Treated and Infected Group	
Slide 17: positive (+) to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 18: negative to <i>Leishmania sp.</i> and acellular material
Slide 19: negative to <i>Leishmania sp.</i> , lipocellular material and anuclear cells	Slide 20: negative to <i>Leishmania sp.</i> and acellular material
Slide 21: negative to <i>Leishmania sp.</i> lipocellular material and anuclear cells	Slide 22: Desquamation cells
Slide 23: positive (+) to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 24: acellular material
G4 – Pré and Post-Treated and Infected Group	
Slide 25: positive (+) to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 26: acellular material
Slide 27: positive (+) to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 28: acellular material
Slide 29: positive (+) to <i>Leishmania sp.</i>	Slide 30: Desquamation cells
Slide 31: acellular material	Slide 32: acellular material

Table 4

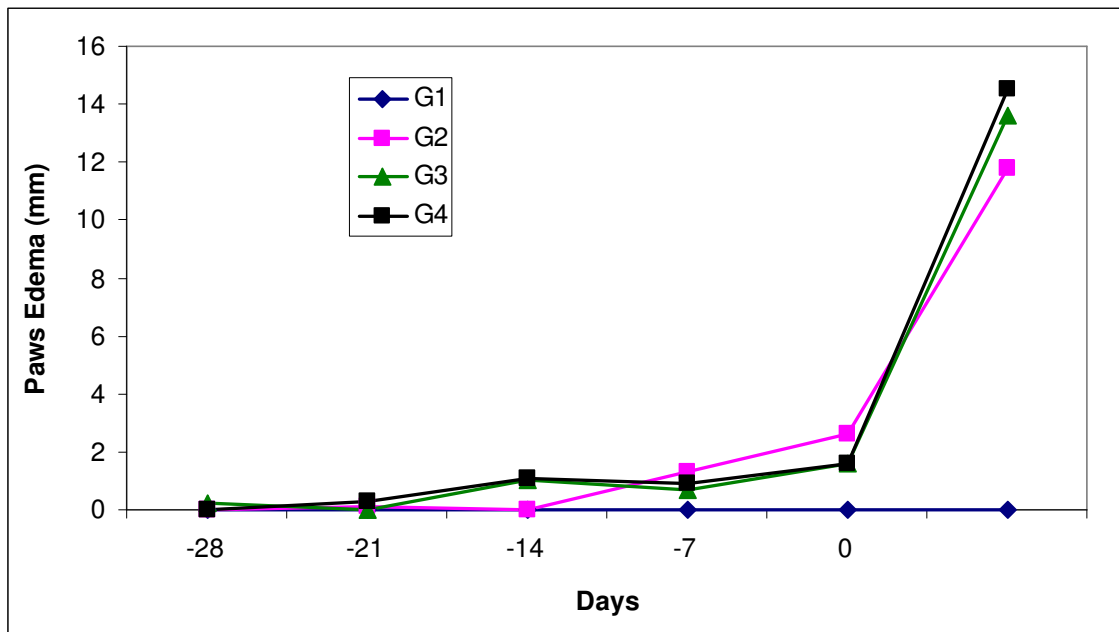
DAY -75				
PARAMETER	G1	G2	G3	G4
Leukocytes (x10³/mm³)	13,1 ± 0,6	12,9 ± 0,8	12,3 ± 1,3	12,5 ± 1,5
Neutrophils (%)	29,9 ± 1,5	26,7 ± 1,2	27,1 ± 1,1	29,1 ± 1,3
Lymphocytes (%)	73,5 ± 2,3	74,2 ± 3,1	73,1 ± 2,6	72,9 ± 2,8
Eosinophils (%)	1,1 ± 0,8	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,7	1,5 ± 0,4
Monocytes (%)	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,4
Basophils (%)	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,1
DAY -26				
Leukocytes (x10³/mm³)	8,48 ± 2,33	4,98 ± 4,34	7,33 ± 1,87	9,09 ± 1,12
Neutrophils (%)	25,67 ± 4,38	21,33 ± 8,80	14,9 ± 9,30	22,87 ± 1,59
Lymphocytes (%)	64,30 ± 8,61	73,83 ± 12,57	72,9 ± 14,09	64,20 ± 2,82
Eosinophils (%)	5,67 ± 3,21	1,99 ± 2,40	4,82 ± 3,71	6,59 ± 0,72
Monocytes (%)	2,48 ± 1,22	1,66 ± 1,43	5,23 ± 1,78	3,65 ± 2,16
Basophils (%)	1,89 ± 1,07	1,16 ± 1,81	2,15 ± 2,09	2,73 ± 0,94
DAY 22				
Leukocytes (x10³/mm³)	6,51 ± 1,31	6,05 ± 3,63	5,15 ± 0,95	5,94 ± 2,19
Neutrophils (%)	29,83 ± 15,08	33,80 ± 21,26	22,05 ± 21,43	40,03 ± 12,53
Lymphocytes (%)	63,25 ± 20,21	54,93 ± 23,49	58,70 ± 21,50	44,58 ± 14,70
Eosinophils (%)	3,83 ± 6,09	0,61 ± 0,77	9,19 ± 12,17	5,90 ± 6,63
Monocytes (%)	2,83 ± 1,62	10,43 ± 10,90	9,53 ± 12,97	8,83 ± 8,18
Basophils (%)	0,26 ± 0,45	0,24 ± 0,35	0,57 ± 0,77	0,68 ± 0,82

G1 = Treated and No-infected group, G2 = No-treated and Infected group, G3 = Treated and Infected group and G4 = Pre and Post-Treated and Infected group.

FIGURE LIST

Figure 1: Size of lesions in right hind footpad in relation to the opposite in infected hamsters with *L. braziliensis* and treated or no-treated with ethyl acetate extract de ACCV. Where G1 = treated and no-infected group, G2 = no-treated and infected group, G3 = treated and infected group and G4 = pre and post-treated and infected group.

Figure 1



CONCLUSÕES

As lesões na pata posterior direita dos animais pertencentes a G2, G3 e G4 foram crescentes ao longo de todo o experimento, demonstrando que o extrato não apresentou antiinflamatória significativa, com o protocolo utilizado.

Existe a possibilidade de o extrato apresentar atividade profilática e/ou curativa nos processo inflamatórios localizada na pele dos animais, evitando que se prolongasse a atividade degenerativa característica desse processo infeccioso.

O extrato apresentou atividade imunomodulatória, com referência nos parâmetros leucocitários, com aumento no número de eosinófilos e monócitos e com diminuição nos valores de linfócitos presentes no sangue periférico, com possível migração linfocitária para o órgão linfóide de drenagem.

O extrato apresentou atividade estimulatória no processo infeccioso localizado nas lesões de pata, com visualização de infiltrados celulares característicos, através da análise dos imprints de pata.

PERSPECTIVAS

Baseado nas conclusões do presente trabalho, sugiro o emprego de diferentes protocolos experimentais para avaliar a atividade leishmanicida do extrato acetato de etila de ACCV, pois o referido extrato vem sendo utilizado na medicina popular, mesmo sem um respaldo científico, com o objetivo de tratar os cães domésticos infectados.

Nesse trabalho tentamos dar esse respaldo científico para utilização do extrato, entretanto com o protocolo experimental utilizado, não foi verificada uma efetiva atividade leishmanicida.

Nova proposta de trabalho pode ser empregada com o aumento da dose e o prolongamento do período de tratamento, bem como um estudo controlado associado a uma droga de referência.

Com relação à possibilidade de possuir atividade cicatrizante e aumentar a população linfocitária nos órgãos de drenagem, estudos futuros devem ser realizados para aumentarmos o conhecimento sobre o assunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*, 5^a ed. Rio de Janeiro: Rewinter, 2006, 544p.
- ABRANCHES, P., SANTOS-GOMES, G., RACHAMIN, N., CAMPINO, L., SCHNUR, L. F., JAFFE, C. L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 13, p. 537-550, 1991a.
- AHUA, K. M., IOSET, J. R., IOSET, K. N., DIALLO, D., MAUEL, J., HOSTETTMANN, K. Antileishmanial activities associated with plants used in Malian traditional medicine. *Journal of Ethno-Pharmacology*, v. 110, p. 99-104, 2007.
- AKENDENGUE, B., NGOU-MILAMA, E., LAURENS, A., HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasit*, v. 6, p. 3-8, 1999.
- ALENCAR, J. E.; HOLANDA, D.; CAVALCANTE, J. D. N. Leishmaniose Visceral no Vale do Jaguaribe, Ceará, 1955. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 8, p. 33-48, 1956.
- ALMEIDA, M. A. O., JESUS, E. E. V., SOUSA-ATTA, M. L. B., ALVES, L. C., BERNE, M. E. A., ATTA, A. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 106, p. 151-158, 2005.
- ALTET, L., FRANCINO, O., SOLANO-GALLEGO, L., REINER, C., SANCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP 1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infectious Immunology*, v. 70, p. 2763-2771, 2002.
- ARBONIER, M. Arbres Arbustes et lianes des zones seches d'Afrique de l'Ouest. La librairie du Cirad. Montpellier et Museum national d'histoire naturelle, Paris, 2000.
- ARIAS, J., DESJEUX, P. Manuel de lutte contre la leishmaniose viscerale. WHO/LEISH/96.40, WHO, Geneve, Swiss, 1996.
- BARNES, A., QUINNELL, R. J., SHORT, A. D., KENNEDY, L. J., COURTENAY, O., SOREMEKUN, S., DYE, C., GARCEZ, L. M., REITHINGER, R., DAVIES, C., SHAW, M. A., OLLIER, W. E. R. Genetics of susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dogs. *Veterinary Immunology, Workshop Paris*, 2006.
- BEJARANO, E. E.; URIBE, S.; ROJAS, W.; VÉLEX, I. D. Phlebotomine sand flies (Díptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 645-647, 2002.

- BIGHETTI, E. J., HIRUMA-LIMA, C. A., GRACIOSO, J. S., BRITO, A. R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Cróton cajucara* Benth. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 51, p. 1447-1453, 1999.
- BRACHELENT, C., MULLER, N., DOHERR, M. G., SATTTLER, U., WELLE, M., Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs in associated with a T helper 2-biased immune response. *Veterinary Pathology*, v. 42, p. 166-175, 2005.
- BRAGA, M. D.; COELHO, I. C.; POMPEU, M. M. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serumreactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serumreactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31 p. 419-424, 2002.
- CABRAL, M., O'GRADY, J., ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*, v. 14, p. 531-539, 1992.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 76, p. 173-180, 1998.
- CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, RJ. *Revista do Instituto Tropical*, v. 45, p. 79-83, 2003.
- CARVALHO, E. M., BADARÓ, R., REED, S. G., JONES, T. C., JOHNSON, W. D. Absence of gamma-interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 76, p. 2066-2069, 1985.
- CARVALHO, E. M., TEIXEIRA, R. S., JOHNSON, W. D. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infectious Immunology*, v. 33, p. 498-502, 1981.
- CENEPI/MINISTÉRIO DA SAÚDE – Notas de dados estatísticos, 1999.
- CHAMIZO, C., MORENO, J., ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 103, p. 67-75, 2005.
- COBBOLD, S., HOLMES, M., WILLETT, B. The immunology of companion animals: reagents and therapeutic strategies with potential veterinary and human clinical applications. *Immunology Today*, v. 15, p. 347-353, 1994.

- COBBOLD, S., METCALF, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the first international canine leukocyte antigen workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, v. 43, p. 137-154, 1994.
- COSTA DURÃO, J. F., REBELO, E., PELETEIRO, M. C., CORREIA, J. J., SIMÕES, G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar, v. 89, p. 140-144, 1994.
- COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M. Leishmaniose Visceral Canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24, n. 1, p. 21-25, 2000.
- COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, p. 223-228, 2001.
- COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 128, p. 149-155, 2005.
- CROFT, S. L., YARDLEY, V. Chemoterapy of leishmaniasis. *Current Pharmacology*, v. 8, p. 319-342, 2002.
- DA SILVA, S. A. G., COSTA, S. S., MENDONÇA, S. C. F., SILVA, E. M., MORAES, V. L. G., ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 60, p. 201-210, 1995.
- DELORENZI, J. C., ATTIAS, M., GATTASS, C. R., ANDRADE, M., REZENDE, C., CUNHA-PINTO, A., HENRIQUES, A. T., BOU-HABIB, D. C., SARAIVA, E. M. B. Antileishmanial activity of na índole alkaloid from *Pesquiera australis*. *Antimicrobial Agents Chemoterapy*, v. 45, p. 1349-1354, 2001.
- DESJEUX, P. Aspects de Sante Publique et lutte. Lês leishmanioses, p. 219-238, 1999.
- DESJEUX, P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country and territory. Report n° 27. World Health Organization, Geneve, Switzerland, 1997.
- DESJEUX, P. Urbanisation of the leishmaniasis Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the second international of the canine leishmaniasis forum, Spain, Sevilla, p. 49-55, 2002.

- DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Disease*, v. 25, p. 1240-1242, 1997.
- DUKE, J. A. Handbook of phytochemical constituents of Grās Herbs and other economic plants. CRC Press, Boca Raton, 1992
- DUNAN, S.; FROMEL, D.; MONJOUR, L. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.11, p. 397-492, 1989.
- ESQUENAZI, D., WIGG, M. D., MIRANDA, M. M. F. S., RODRIGUES, H. M., TOSTES, J. B. F., ROZENTAL, S., DA SILVA, A. J. R., ALVIANO, C. S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, v. 153, p. 647-652, 2002.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Spain*, p. 6-11, 1999.
- FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; COSTA, R. T. Importance of *Lu. longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic área of Porteirinha, Minas Gerais. *Veterinary Parasitology*, v. 131, p. 213-220, 2005.
- FRANKE, C. R.; STAUBACH, C. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral leishmaniasis in the state of Bahia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, p.1-6, 2002.
- FUJIKI, H., SUGANUMA, M., OKABE, S., SUEOKA, N., KAMORI, A., SUEOKA, E., KOZU, T., TADA, Y., SUGA, K., IMAI, K., NAKACHI, K. Câncer inhibition by green tea. *Mutagenic Research*, v. 402, p. 307-310, 1998.
- FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). *Guia de Vigilância Sanitária e Epidemiológica*. Leishmaniose Visceral, v. II, 1999.
- FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Doenças Infecciosas com Manifestações Dermatológicas. Editora Médico-Científica Ltda, Rio de Janeiro, p. 319-328, 1994.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO Jr, F. A. Estudo dos flebotomíneos em foco de leishmaniose visceral no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.
- GONTIJO, B., CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 338-349, 2004.

GRAZZINELLI, R. T., DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptors signalling pathways: implications for hosts parasitism. *Nature Review of Immunology*, v. 6, p. 895-906, 2006.

HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., HOLADAY, B. J., COFFMAN, R. L., LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon-gama or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *Journal of Experience Medicine*, v. 169, p. 59-72, 1989.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HU, X. S.; YANG, W. T.; LU, H.G. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *Journal of Parasitology*, v. 86, p. 822-826, 2000.

IWU, M. M., JACKSON, J. E., SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today*, v. 10, n. 2, p. 65-68, 1994.

JOYEX, M., LOBSTEIN, A., ANTON, R., MORTIER, F. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of torpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Medicine*, v. 61, p. 126-129, 1995.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Review of Microbiology*, v. 21, p. 123-152, 1995.

KAYE, P. M., CURRY, A. J., BLACKWELL, J. M. Differential production of Th-1 and Th-2 derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*,k v. 146, p. 2763-2770, 1991.

KENNER, J. R.; ARONSON, N. E.; BENSON, P. M. Advances in military dermatology. The United States military and leishmaniasis. *Dermatology Clinics*, v. 17, n. 1, p. 77-92, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sanflies. *Biology of Kinetoplastida*, v. 2, p. 395-460, 1979.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 65, p. 37-42, 1990.

- KILLICK-KENDRICK, R., RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 66, p. 71-74, 1991.
- KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C. Protections of dogs from bites of phlebotomines sandflies by deltamethrin collars for control of canine. *Medicine Veterinary Entomology*, v.11, p. 105-111, 1997.
- LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The leishmaniasis*. London. v.1, p. 1-128, 1987.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 811-827, 2005.
- LIEW, F. Y., O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. Advantages of Parasitology, v. 32, p. 161-259, 1993.
- MANSON-BAHR, P. E. Diagnosis. *Leishmaniasis*, v. 2, p. 703-728, 1987.
- MARZOCHI, M. C. A leishmaniose no Brasil: As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 63, p. 82-104, 1992.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública*, v. 10, p. 359-375, 1994.
- MATOS, F. J. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2ª ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará. 139p. 1997.
- MENDONÇA-FILHO, R. R., RODRIGUES, I. A., ALVIANO, D. S., SANTOS, A. L. S., SOARES, R. M. A., ALVIANO, C. S. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, v. 155, p. 136-143, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Normas e Manuais Técnicos*. Brasília, DF, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/FNS. Guia de Controle da LTA – Brasília, 1994.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA. Guia de Controle da LTA – Brasília, 2000.
- MONTENEGRO, J. A cutis-reação na leishmaniose. *Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 1, p. 323-330, 1926.
- MONTENEGRO, J., Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*, v. 13, p. 187, 1926.
- MORENO, J., NIETO, J., CHAMIZO, C., GONZALEZ, F., BLANCO, F., BARKER, D. C., ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral

leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 71, p. 181-195, 1999.

MURRAY, H. W., OCA, M. J., GRANGER, A. M., SCHREIBER, R. D. Requirement of T cells and effects of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection. *Journal of Clinical Investigation*, v. 83, p. 1253-1257, 1989.

NEAL, R. A., HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*, n. 87, p. 7-13, 1983.

NEUWINGER, H. D. African Ethnobotany. Poison and Drugs. Chapman & Hall, Weinheim, Germany, 1996.

NEUWINGER, H. D. African Traditional Medicine. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Germany, 2001.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. *Parasitologia Humana*. 9^a ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 1995.

NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A. B.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; MENZ, I.; PARRA, L. E. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, v. 23, p. 4805-4810, 2005.

OZON, C., MARTY, P., PRATLONG, F., BRETON, C., BLEIN, M., LEVIEVRE, A., HAAS, P. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania* infection in southern France. *Veterinary Parasitology*, v. 75, p. 273-277, 1998.

PALATNICK DE SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRAQNÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; BARBOSA REIS, A. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, p. 510-517, 2001.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A. R. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55 p. 36-44, 1998.

PASSOS, V. M. A., FERNANDES, O., LACERDA, P. A. F., VOLPINI, A. C., GONTIJO, C. M., DEGRAVE, W., ROMANHA, A. J. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant specie infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, South-East Brazil. *Acta Tropica*, v. 72, p. 251-258, 1999.

PASSOS, V. M. A., LASMAR, E. B., GONTIJO, C. M. F., FERNANDES, O., DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with Leishmania in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais. Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, v. 91, p. 19-20, 1996.

PESSÔA, S. B., MARTINS, A. V. Parasitologia Médica. 11 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 872, 1982.

PINELLI, E., GONZALO, R. M., BOOG, C. J. P., RUTTEN, V. P. M. G., GEBHARD, D., DEL REAL, G., RUITTENBERG, E. J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex restricted manner. European Journal of Immunology, v. 25, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENNAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G., RUITTENBERG, E. J. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infectious Immunity, v. 62, p. 229-235, 1994.

PROFETA, Z.; FIUZA, V. O. P.; RABELLO, A. Leishmaniose: uma doença em expansão. Disponível na Internet via: www.epqrr.fiocruz.br. Capturado em 02/02/2006.

QUINNELL, R. J., KENNEDY, L. J., BARNES, A., COURTENAY, O., DYE, C., GARCEZ, L. M., SHAW, M. A., CARTER, S. D., THOMSON, W., OLLIER, W. E. R. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dogs is associated with MHC class II polymorphism. Immunogenetics, v. 55, p. 23-28, 2003a.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, ELISA and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2352-2356, 2002.

ROSA, M. S. S., MENDONÇA-FILHO, R. R., BIZZO, H. R., RODRIGUES, I. A., SOARES, R. M. A., SOUTO-PEDRON, T., ALVIANO, C. S., LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of linalool-rich essential oil from *Croton cajucara* Benth. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 47, p. 1895-1901, 2003.

ROSS, R. Further notes on *Leishmania*'s bodies. *British Medical Journal*, v. 11, p. 1401, 1903.

SACKS, D. L., LAL, S. L., SHRIVASTAVA, S. N., BLACKWELL, J., NEVA, F. A. An analysis of T cell responsiveness in India kala-azar. *Journal of Immunology*, v. 138, p. 908-913, 1987.

- SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A. Incrimination of *Lu. cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medicine Veterinary Entomology*, v. 12, p.315-317, 1998.
- SARAVIA, N. G. L., VALDERRAMA, M., LABRADA, A. F., HOLGUIN, C., NAVAS, G., PALMA, A., WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *Journal of Infectious Disease*, v. 159, p. 725-735, 1989.
- SHAW, J. J. The relationship of sandfly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. In: Burger J. Contributions to the knowledge of Diptera, v. 14. Gainesville, Florida: Associated Publishers, p. 503-517, 1999.
- SHAW, J. J., LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, p. 323-335, 1975.
- SHAW, S. E., BIRTLES, R. J., DAY, M. J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *Journal of Feline Medicine*, v. 3, p. 193-209, 2001.
- SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Caderno de Saúde Pública*. Rio de Janeiro, v. 21, p. 324-328, 2005.
- SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F. Visceral Leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 3, p. 285-291, 2001.
- SIMÕES-MATTOS, L., BEVILAQUA, C. M. L., MATTOS, M. R. F., POMPEU, M. M. L. Feline leishmaniasis: uncommon or unknown? *RPCV*, v. 99, p. 79-87, 2004.
- SINAGRA, A., RIARTE, A., LUNA, C., CAMPANINI, A., SEGURA, E. L. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 57, n. 1, p. 115-118, 1997.
- SOLANO-GALLEGOS, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 560-563, 2001.

- SOUSA, A. Q., PARISE, M. E., POMPEU, M. M. L., VASCONCELOS, I. A. B., COELHO FILHO, J. M., OLIVEIRA, E. G., VASCONCELOS, A. W., DAVID, J. R., MAGUIRE, J. H. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 53, p. 380-385, 1995.
- TEIXEIRA, M. J. Avaliação do efeito leishmanicida in vitro e in vivo de constituintes químicos ativos derivados de plantas medicinais. Dissertação – Universidade Federal do Ceará, 1999.
- TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies ? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.57, p. 287-292, 1995.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 2ª ed. São Paulo. Atheneu, 2002.
- VIANNA, G. Sociedade Brasileira de Dermatologia, 4º Sessão Ordinária. *Arquivo Brasileiro de Medicina*, v. 2, p. 422, 1912.
- WALTERS, L. L. Leishmania differentiation in natural and unnatural sandfly host. *Journal of Eukariotic Microbiology*, v. 40, p. 196-206, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The leishmaniasis. *Technical Report*, v. 793, p. 27, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The world health report*. Geneva, 2001.
- YANG, G. Y. J., LIAO, J., KIM, K., YURKOW, F. J., YANG, C. S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 611-616, 1998.
- ZAFFARONI, E.; RUBAUDO, L.; LANFRANCHI, P. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Veterinary Parasitology*, v.81, p.11-19, 1999.

Apêndice

AVALIAÇÃO CLÍNICA DE HAMSTERS INFECTADOS OU NÃO COM *L. braziliensis* E TRATADOS OU NÃO COM EXTRATO ACETATO DE ETILA DE ÁGUA DA CASCA DE COCO VERDE (ACCV)

LOCALIZAÇÃO	LESÕES	OBSERVAÇÕES
FOCINHO		
ORELHAS		
OLHOS		
PATAS		
ABDOMEN		
UNHAS		
ESTADO CORPÓREO		

Intensidade das Lesões: 0=Ausência; (+)=Leve; (++)=Moderada; (+++)=Grave.