



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA**

ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO RESVERATROL
COMO UMA NOVA DROGA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Vitória
2016**

ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO RESVERATROL
COMO UMA NOVA DROGA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

Coorientador: Prof. Dr. Sandra Lúcia Ventrin von Zeidler

**Vitória
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Avaliação do Potencial Terapêutico do Resveratrol como uma Nova Droga
Contra a leishmaniose visceral”

Estevão Carlos Silva Barcelos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes (UFES)
Orientador

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (UFES)
Membro Interno

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira (UUV)
Membro Externo

Vitória-ES, 04 de Março de 2016.

*Dedico esta dissertação aos meus pais e
à minha irmã. A vocês, minha imensa
gratidão e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À Deus por me dotar de capacidade para tentar compreender sua criação, e chamar a isso de ciência.

À minha família, que me apoiou e acreditou nos meus sonhos. À minha mãe, pela garra e incrível sabedoria, e ao meu pai, sempre vivo dentro de mim, por ser o exemplo de amor ao próximo e de homem a se seguir. Não tenho palavras para agradecer a vocês, que me incentivaram e deram asas a minha curiosidade. À minha irmã, pelos inúmeros gestos de carinho e pelo incentivo.

Aos meus amigos que me sustentaram com sua alegria e motivação.

A vida de todos os animais utilizados neste trabalho. Elas não foram tiradas em vão e sim para um bem maior.

A meu orientador Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo incentivo, compreensão e ensinamentos durante esses anos e principalmente pela confiança depositada durante minha orientação.

A minha co-orientadora Dr^a. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler pela disponibilidade em me ensinar e esclarecer cada dúvida durante este trabalho.

A Vívian de Oliveira e Juliana Carnielli, pela ajuda com novas técnicas. Aprendi muito com vocês.

A todos do laboratório de imunologia celular e molecular, por todos esses anos de convivência, trabalho e risadas. Foi maravilhoso aprender um pouco com cada um. Em especial Bruna, Luciana, Glênia, Renan, Emmanoel, Caio, Nataly, Marcelle, Lorenzo, Carlinha, Naira.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pelo conhecimento transmitido.

Ao professor Fausto Edmundo Lima Pereira por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho, pelo exemplo profissional, pela oportunidade de convivência, por cada técnica

ensinada e pelas conversas, que acrescentam em muito na minha formação científica e pessoal.

Ao professor Breno Valentim Nogueira, muito obrigada pela disponibilidade de participar da banca avaliadora e enriquecer com sugestões e ideias esse trabalho.

À FAPES pela bolsa concedida que permitiu minha dedicação total à pesquisa durante o período de vigência da bolsa.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente auxiliaram e torceram pelo desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado!

“Se você estiver em busca de alguma coisa, não vá sentar-se na praia à espera de que ela venha encontrá-lo. Você tem de procurá-la com toda a sua obstinação.”

Stanislavski

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e encontram-se distribuídas por 98 países incluindo o Brasil, que possui uma grande importância epidemiológica e clínica, considerando o número de casos registrados. Embora os atuais tratamentos disponíveis sejam eficazes, importantes considerações acerca da toxicidade e alto custo têm sido levantados pela OMS, o que torna urgente a busca por novas drogas. O Resveratrol, um polifenol encontrado em diversas plantas, dentre elas uva, amendoim e eucalipto, tem sido amplamente pesquisado nas últimas décadas. Suas características farmacológicas e ações biológicas incluem: capacidade antiinflamatória; antitumoral; antioxidante; antiagregação plaquetária; fungicida; antiviral e antibacteriana. Além disso, o resveratrol já demonstrou ação anti-promastigotas e anti-amastigotas de *Leishmania in vitro*. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos do tratamento oral com resveratrol contra a leishmaniose visceral murina. Camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* foram tratados resveratrol (50mg/kg/dia) por via oral durante 10 dias. O tratamento com resveratrol não induziu toxicidade sistêmica, demonstrado pelas dosagens de transaminases (TGO, TGP) e creatinina. Além disso, o tratamento com resveratrol foi capaz de induzir redução no parasitismo do baço e fígado, quando comparado ao grupo não tratado, e compatíveis ao aumento do infiltrado linfocitário observado no fígado destes animais. A avaliação de citocinas mostrou redução significativa da produção de IL-4, IL-6 e IL-17, bem como o aumento de TNF- α e TGF- β no sobrenadante do fígado. Significante redução da produção de TNF- α e IL-10 foi observada nos sobrenadantes de macerado do baço de animais tratados com resveratrol. Este mesmo grupo apresentou uma significativa redução da apoptose de esplenócitos quando comparado com os controles experimentais. Juntos, nossos dados demonstraram pela primeira vez viabilidade da utilização do resveratrol como uma eficiente e segura droga anti-*Leishmania*, o que o torna um promissor candidato a utilização contra as leishmanioses humanas.

Palavras-chaves: *Leishmaniose Visceral, Resveratrol, Tratamento.*

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, and are distributed in 98 countries including Brazil, which has a great importance and clinical epidemiology, considering the number of registered cases. Although current treatments available are effective, important considerations about toxicity and high cost have been discussed by WHO, it is urgent to search for new drugs. Resveratrol, a polyphenol found in several plants, including grapes, peanuts and eucalyptus have been widely studied in the last decades. Their pharmacological characteristics and biological actions include: anti-inflammatory capacity; antitumor; antioxidant; antiplatelet therapy; fungicide; antiviral and antibacterial. In addition, resveratrol has demonstrated anti-promastigotes and amastigotes in vitro action. This study aimed to evaluate the effects of oral treatment with resveratrol against murine visceral leishmaniasis. BALB/c mice infected with *L. infantum chagasi* resveratrol were treated orally (50 mg / kg / day) for 10 days. The treatment with resveratrol did not induce toxicity demonstrated by measurements of aminotransferases (ALT, AST) and creatinine. Furthermore, the treatment with resveratrol was able to induce reduction in parasitism of the spleen and liver, compared to the untreated group, and to increase compatible lymphocyte infiltration observed in the liver of these animals. A significant reduction of the cytokine IL-4, IL-6 and IL-17 as well as the increase of TNF- α and TGF- β in the liver supernatant was observed. Significant reduction of TNF- α and IL-10 was observed in spleen macerated supernatants treated with resveratrol. The same group showed a significant decrease in apoptosis of splenocytes when compared with the experimental controls. Taken together, our data demonstrated for the first time the feasibility of Resveratrol as an effective and safe anti-*Leishmania* drug, which makes it a promising candidate for use against human leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, Resveratrol, Treatment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química do *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno).....29
- Figura 2:** Delineamento experimental para avaliação da ação anti-*Leishmania* do resveratrol *in vivo*.....37
- Figura 3: Avaliação da toxicidade aos diferentes tratamentos realizados em camundongos BALB/c, infectados com *L. infantum chagasi*.** Dosagem de TGO (A), TGP (B) e creatinina (C) no soro de camundongos que receberam veículo (óleo + álcool 10%) ou resveratrol (50mg/Kg/dia) ou foram tratados com Glucantime (antimoniato de meglumina) (50mg/Kg/dia), durante 10 dias. Controles positivos das análises foram camundongos não infectados que receberam tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizada individualmente, utilizando o soro dos animais coletado 24 horas após o término dos tratamentos. Os dados representam a média ± desvio padrão de 10 animais.. *p<0,05 e ****p<0,0001. V= Veículo, R= Resveratrol, G= Glucantime.....44
- Figura 4: Carga parasitária do baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*.** Os animais foram infectados com 1 x 10⁷ formas promastigotas de *L. infantum chagasi* via endovenosa, seguido do tratamento (Conforme descrito na figura 2), iniciado 24 horas após a infecção. O número de parasitas foi determinado no baço e fígado através da técnica de diluição limitante (LDA). Os dados representam a média ± desvio padrão de 20 animais/grupo.***p<0,001, ****p<0,0001. V= Veículo, R= Resveratrol, G= Glucantime.....45
- Figura 5: Efeito dos tratamentos sobre a produção de citocinas e óxido nítrico (nitrito).** Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-4, IL-10, TGF- β , e nitrito foram determinados pelos métodos de ELISA sanduíche para as citocinas e Griess para nitrito. Camundongos BALB/c infectados e tratados (Conforme descrito na figura 2), tiveram o baço e o fígado retirados e processados separadamente para obtenção do sobrenadante. Os dados representam a média ± desvio padrão de 10 animais/grupo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001. V= Veículo, R= Resveratrol, G= Glucantime.....47
- Figura 6: Aspecto histológico do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*.** A e B. Fígado de animal que recebeu somente veículo. A: observar pequeno granuloma (seta preta); B: detalhe em maior aumento mostrando outro pequeno granuloma (seta preta) e grande quantidade de células de Kupffer (setas brancas). C e D. Fígado de animal tratado com resveratrol. C: dois pequenos granulomas (setas pretas). D: detalhe em maior aumento mostrando a reação das células de Kupffer (setas brancas). E e F.

Fígado de animais tratados com Glucantime. E: ausência de granulomas e menor reação das células de Kupffer. F: detalhe em maior aumento mostrando a menor reação das células de Kupffer (setas brancas). vc=veia central; ep= espaço porta. Figuras A, C e E observadas com objetiva 10x; Figuras B, D e F observadas com objetiva de 40x. Coloração: H.E.....48

Figura 7: Reação histológica no baço após infecção com *L. infantum chagasi*. Em A, baço representativo do grupo que recebeu somente veículo, em B, do grupo tratado com resveratrol e, em C, do grupo tratado com Glucantime. Figuras observadas com objetiva de 10X. Coloração: H.E.....49

Figura 8: Frequências de linfócitos B, T CD8⁺, T CD4⁺ e Tregs. Esplenócitos (1×10^6) de camundongos BALB/c infectados e tratados conforme descrito acima, obtidos no dia da eutanásia foram marcados com anticorpos monoclonais anti-B220, -CD8, -CD4, -CD25 e -Foxp3. Frequências das populações de linfócitos B (A), T CD8⁺ (B), T CD4⁺ (C) e Treg (D). Os dados representam a média \pm desvio padrão de 8 animais/grupo.*p<0,05, **p<0,01. V= Veículo, R= Resveratrol, G= Glucantime.....50

Figura 9: Avaliação de apoptose em esplenócitos após tratamento com resveratrol. Esplenócitos (1×10^6) de camundongos BALB/c infectados e tratados conforme descrito acima, obtidos no dia da eutanásia foram marcados com Anexina V e iodeto de propídio (PI) para a determinação dos estágios apoptóticos por citometria de fluxo. Q1 – Apoptose inicial, Q2 – Apoptose tardia e Q4 – células não apoptóticas. Representação esquemática dos quadrantes nos diferentes grupos tratados: (A) Veículo, (B) Resveratrol e (C) Glucantime.....51

Figura 10: Avaliação de apoptose inicial e tardia em esplenócitos após tratamento com resveratrol. Esplenócitos (1×10^6) de camundongos BALB/c infectados e tratados conforme descrito acima, obtidos no dia da eutanásia foram marcados com Anexina V e iodeto de propídio (PI). Os dados representam a média \pm desvio padrão de 8 animais/grupo.*p<0,05, **p<0,01.....51

LISTA DE SIGLAS

C3b - Moléculas do complemento
CCl₄ - Tetracloroeto de carbono
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
COX – Cicloxigenase
CXCL-1 – Quimiocina (C-X-C motif) ligante 1
DCs – Células dendríticas
DMEM - Dulbecco's minimal essential medium
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
FDC - Células dendríticas foliculares
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
FOXP3 - Forkhead transcription factor 3
FSC - Foward Scatter
gp63 - Glicoproteína 63
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HL-60 - Linhagem celular de leucemia
iC3b - Moléculas do complemento
IFN- γ – Interferon gama
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
iNOS - Óxido nítrico-sintase induzível
L. - *Leishmania*
LPG – Lipofosfoglicano
LV – Leishmaniose visceral
MAC - Complexo de ataque à membrana
MCP-1 - Proteína quimiotática para monócitos
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
MHOM/BR/1975/PP75 - Cepa de *Leishmania infantum* chagasi
MS - Ministério da Saúde
NETs – Redes extracelulares de neutrófilos
NK - Células assassinas naturais (*Natural Killers*)
NKT – Células T com marcadores de superfície de células NK
NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde
PAI-1- Inibidor do ativador de plasminogênio
PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos
PBMC - Células mononucleares do sangue periférico
PBS - Salina tamponada com fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PE - Phycoeyitrin
PE-Cy5 - Phycoerythrin and a cyanine dye
PI – Iodeto de propídio
PKC – Proteína quinase C
PMNs – Células polimorfonucleares
PRRs – Receptor de reconhecimento padrão
PTK – Proteína tirosina quinase
RC - Restrição calórica
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium
Sb³⁺ - Antimoniais trivalentes
Sb⁵⁺ - Antimoniais pentavalentes
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SFB – Soro fetal bovino
SSC - Side Scatter
T CD4⁺ - Linfócito T auxiliar
T CD8⁺ - Linfócito T citolítico
TGF - Fator de crescimento e transformação
TGF –β - fator de crescimento e transformação
TGO - transaminase glutâmico oxalacética
TGP - transaminase glutâmico pirúvica
Th - Célula T auxiliar
TLRs - Receptores tipo Toll
TNF -α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg – Células T reguladoras
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. DEFINIÇÃO E HISTÓRICO DAS LEISHMANIOSES	16
1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL	18
1.2.1. Situação epidemiológica	18
1.2.2. Sintomatologia e Diagnóstico	19
1.2.3. Ciclo e Imunopatogênese	19
1.2.4. Tratamento	25
1.3. PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTI- <i>Leishmania</i>	26
1.3.1. Resveratrol	27
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	34
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	36
3.2. CEPA DE <i>L. infantum chagasi</i>	36
3.3. INFECÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTO	37
3.4. DOSAGEM DE TRANSAMINASES (TGO E TGP) E CREATININA	37
3.5. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DO BAÇO E FÍGADO E ESPLÊNOCITOS	38
3.6. ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA	39
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NOS SOBRENADANTES DO MACERADO DE BAÇO E FÍGADO	39
3.8. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DO MACERADO DE BAÇO E FÍGADO	40
3.9. DETERMINAÇÃO DE APOPTOSE EM ESPLÊNOCITOS COM ANEXINA V	40
3.10. IMUNOFENOTIPAGEM DOS ESPLÊNOCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
3.11. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO ESPLÊNICO E HEPÁTICO	42
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	42

4. RESULTADOS	43
4.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM RESVERATROL <i>IN VIVO</i>	44
4.2. EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM RESVERATROL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>L. infantum chagasi</i>	45
4.3. EFEITO DO TRATAMENTO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E óxido nítrico NOS ANIMAIS TRATADOS COM RESVERATROL.....	46
4.4. AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS NO BAÇO E FÍGADO DE ANIMAIS TRATADOS COM RESVERATROL.....	47
4.5. IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS B E T NO BAÇO DE ANIMAIS TRATADOS COM RESVERATROL.....	49
4.6. AVALIAÇÃO DE APOPTOSE NOS ESLENÓCITOS DE ANIMAIS TRATADOS COM RESVERATROL.....	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEFINIÇÃO E HISTÓRICO DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses consistem em um grande espectro de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Classe Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae). Baseado nos principais sintomas clínicos, este complexo de doenças pode ser classificado de forma geral, em dois grupos: a leishmaniose tegumentar ou cutânea e a leishmaniose visceral (LV), tipo mais grave da doença (CECÍLIO et al., 2014).

As leishmanioses são doenças antigas, historicamente retratadas em desenhos, papiros, estátuas e cerâmicas, que representam formas humanas com mutilações nos lábios e narizes, características da leishmaniose cutânea (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). Diversos documentos relatam a ocorrência da leishmaniose cutânea nas populações do continente asiático e também pré e pós-Colombianas, como visto em textos Incas que relatam lesões de trabalhadores rurais dos Andes, durante a colonização espanhola nas Américas (TUON et al., 2008).

Não existem documentos que registrem a forma visceral da doença antes do século XIX. Os primeiros relatos de LV são provenientes da Grécia, em 1835, e em seguida na Índia, em 1869 (SOUZA et al., 1981), onde a doença recebeu o nome de Kala-azar, ou doença negra, por causar aumento da pigmentação na pele, podendo deixá-la cinza escuro (KHADEM; UZONA, 2014). Em 1903, o médico escocês Willian Leishman isolou o protozoário causador da doença no baço de um soldado indiano, identificando-o como um possível parasita do gênero *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903). Meses depois, Charles Donovan relatou casos parecidos e este microrganismo passou a ser denominado corpos de Leishman-Donovan. Naquele mesmo ano, Ronald Ross observando os parasitas deduziu que estes pertenciam a um novo gênero e não se tratavam de tripanossomas alterados, como Leishman relatava, sugerindo o nome *Leishmania donovani* em homenagem aos pesquisadores (ROSS, 1903).

Nessa época, o vetor transmissor do parasita ainda era desconhecido. Em 1905, André Pressat especulou sobre a relação de dípteros flebotomíneos (Ordem Diptera, Família Psychodidae) com as leishmanioses. Em 1912, Lutz e Neiva publicaram um trabalho sobre o *Phlebotomus*, também conhecido como mosquito-palha, ressaltando a voracidade com que as fêmeas atacavam repetidas vezes o homem para se alimentarem de seu sangue. Eles tinham uma forte suspeita do papel transmissor destes insetos na disseminação do parasita

(BENCHIMOL; SÁ, 2006), confirmada em 1920 e 1922, por Cerqueira e Aragão (REY, 2001).

Em 1908, Charles Nicolle descreve uma nova espécie causadora de LV, a *L. infantum*, cuja área endêmica englobava países europeus da Bacia do Mediterrâneo, como Portugal e Espanha (MAURICIO et al., 1999). No estudo, o pesquisador ainda acrescenta a participação dos cães como reservatórios da leishmaniose através de estudos experimentais (REY, 2001).

O primeiro caso de LV relatado na América do Sul foi descrito no Paraguai, em 1913, em uma necropsia de um paciente originário do Brasil (MIGONE, 1913). Em 1934, no Nordeste do Brasil, formas amastigotas do parasita foram encontradas em pacientes que faleceram com suspeita de febre amarela (BADARÓ; DUARTE, 1996). Em 1937, Evandro Chagas descreveu, pela primeira vez, o agente etiológico da LV americana, classificando o parasita como *Leishmania chagasi* (LIMA et al., 2010). Porém estudos posteriores mostraram que sequências de DNA de várias cepas desta espécie eram idênticas a cepas de *L. infantum* (MAURICIO et al., 1999). Após longas discussões sobre a taxonomia desta espécie, Lainson e Shaw sugeriram chamar a espécie de *L. infantum chagasi* (LAINSON; SHAW, 2005).

Até os anos 70, as espécies eram classificadas de acordo com aspectos clínicos e área endêmica da doença. Estudos observando a ecologia do ciclo das leishmanioses em animais reservatórios e vetores também baseavam a classificação. Com a introdução da análise izoenzimática e hibridização de DNA, os pesquisadores puderam classificar as espécies com mais precisão (WHO, 2010).

Depois de estudos bioquímicos e moleculares, além das características clínicas e epidemiológicas, foi possível traçar um panorama das infecções. Foi determinado que no Velho Mundo, a leishmaniose cutânea é causada principalmente pela *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, diferentemente das Américas, onde o maior causador desta forma é a *L. mexicana*, sendo que *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são as maiores responsáveis por lesões mucocutâneas. Os parasitas observados na forma visceral da doença foram: *L. donovani*, na África, Ásia e Europa e *L. infantum chagasi*, comumente causador de LV nas Américas (MURRAY et al., 2005).

1.2. LEISHMANIOSE VISCERAL

1.2.1. Situação epidemiológica

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, com aproximadamente um milhão de novos casos estimados, e estão entre as seis endemias prioritárias no mundo (WHO, 2014). Dentre essas, a forma visceral das leishmanioses está associada a altas taxas de mortalidade, levando de 20.000 a 30.000 mortes anualmente. Este dado posiciona as leishmanioses como segunda causa de mortes mundiais relacionada a parasitas, depois da malária (WHO, 2014). Por ano, são registrados aproximadamente 58 mil casos de LV, em todo o mundo. Porém, estima-se que de 150 a 350 mil novos casos de LV não são registrados, muitos destes ocorrendo de forma subclínica ou assintomática (ALVAR et al., 2012).

A LV tem ampla distribuição e pode ser encontrada na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, sendo que cerca de noventa por cento dos casos estão concentrados na Índia/Bangladesh/Nepal, Sudão e Brasil (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2014). A Organização Mundial de Saúde estimou em 2012, que 10 a 20% destes casos irão a óbito, mesmo com acesso ao tratamento (ALVAR et al., 2012).

A LV já foi descrita em pelo menos 12 países na América Latina, porém o Brasil detém aproximadamente 97% dos casos notificados, especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2014; PAHO, 2013). Na década de 80, esta região registrava cerca de 90% dos casos brasileiros, tendo caráter eminentemente rural. Após este período, a doença se espalhou por todo o território nacional, alcançando as periferias dos grandes centros urbanos nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2014).

A incidência de LV no Sudeste não é a maior em comparações com as demais regiões do país, porém o Espírito Santo, durante o período de 2008 a 2011, apresentou um total de 19 casos, com média de 05 casos por ano. Destes casos 60% ocorreram em crianças na faixa etária de 0 a 9 anos. (BRASIL, 2012; BRASIL, 2014).

1.2.2. Sintomatologia e Diagnóstico

A LV é uma doença infecciosa, não contagiosa, que segue com hiperplasia do sistema mononuclear fagocítico, afetando o baço, o fígado, as mucosas do intestino delgado, a medula óssea, os linfonodos e outros tecidos linfóides. A sintomatologia na fase aguda pode variar de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Em área endêmica, alguns indivíduos podem apresentar um quadro clínico discreto, evoluindo para cura espontânea. Nos outros pacientes, se não houver tratamento, a infecção segue com febre irregular, geralmente associada a emagrecimento e aumento da hepatoesplenomegalia. A progressão da doença conta com febre contínua e comprometimento do estado geral, incluindo hemorragias, icterícia e ascite. Infecções bacterianas e sangramentos geralmente determinam o óbito nestes pacientes (BRASIL, 2014).

O diagnóstico laboratorial da LV inclui observação microscópica dos parasitas em amostras de aspirados do baço ou medula óssea, fígado, linfonodos e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), que podem ser cultivadas para aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Outras possibilidades são a detecção de antígenos na urina, testes sorológicos e a detecção de DNA do parasita por PCR (reação em cadeia da polimerase), que é mais sensível que o exame microscópico, porém necessita de alto investimento, sendo inviável nos locais endêmicos, em sua maioria países em desenvolvimento (ELMAHALLAWY et al., 2014).

1.2.3. Ciclo e Imunopatogênese

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxênico, contendo uma fase no trato digestivo do flebotomíneo e outra em hospedeiros vertebrados. Canídeos silvestres, marsupiais, roedores e, principalmente, cães funcionam como reservatórios do protozoário (BRASIL, 2014).

Parasitas deste gênero são dimórficos, apresentando em seu ciclo de vida duas formas evolutivas: a forma promastigota e a forma amastigota. A primeira é caracterizada por um corpo alongado e a presença de flagelo. São formas bastante móveis e podem ser encontradas no intestino e glândulas salivares de flebotomíneos. Por outro lado, as formas amastigotas não

são móveis e possuem morfologia arredondada, vivendo exclusivamente no interior das células do hospedeiro (GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

As fêmeas de flebotomíneos, durante seu repasto sanguíneo, podem aspirar macrófagos parasitados de um indivíduo infectado ou um hospedeiro reservatório. O desenvolvimento e migração do parasita no trato gastrointestinal do inseto são acompanhados por mudanças morfológicas. As formas amastigotas adquiridas, ao atingirem o intestino médio do inseto, se transformam em formas promastigotas procíclicas, não infectantes (DAVIES et al., 1990). Assim como outros tripanossomatídeos, estes parasitas necessitam se aderir à parede intestinal do vetor apropriado para estabelecer uma infecção real, onde se multiplicam, por divisão binária, durante a passagem do sangue em digestão. A próxima fase é a metaciclogênese, onde a partir da forma promastigota procíclica ocorre o desenvolvimento da forma infectante transmissível denominada de promastigota metacíclica (PIMENTA et al., 1992). Durante as modificações morfológicas, o parasita também sofre mudanças em suas moléculas de superfície, como por exemplo, o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (gp63), que funcionam como importantes fatores de virulência (DAVIES et al., 1990). Ocorre o aumento da expressão de LPG e gp63 no segundo e sétimo dia pós-repasto sanguíneo, respectivamente (DAVIES et al., 1990).

A forma promastigota metacíclica não sofre divisões e se desprende do intestino do vetor, migrando para a porção mais anterior intestinal média, onde num novo repasto sanguíneo poderá ser regurgitada e introduzida na pele de um hospedeiro vertebrado (LAINSON; SHAW, 1988). Após a introdução do protozoário no organismo, o parasita deve se evadir dos mecanismos extracelulares de defesa, invadir as células-alvo, modificar o ambiente intracelular e estabelecer a infecção (SACKS; SHER, 2002).

Participando da resposta imune inata, o sistema complemento é uma das primeiras barreiras que o parasita deve enfrentar. Este sistema é um grupo composto por mais de 30 proteínas solúveis no sangue que interagem entre si, e estão envolvidas na destruição de diversos parasitas, como a *Leishmania* (DUNKELBGEERR; SONG, 2010). Experimentos *in vitro*, com formas promastigotas de *L. major*, *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. infantum chagasi* mostraram que 85-90% destes parasitas são lisados dentro de, aproximadamente, dois minutos em contato com soro humano (DOMINGUEZ et al., 2002). A lise ocorre devido à formação de poros na membrana, causados pelo complexo C5b-9, também conhecido como complexo de ataque à membrana (MAC). Porém, devido às modificações nos fatores de virulência do parasita, muitas células do parasita não sofrem danos pela ação do complemento, como por exemplo, o alongamento da estrutura do LPG nas formas

promastigotas que dificulta a ligação do complexo MAC ao protozoário (MCCONVILLE et al., 1992). Além disso, esses fatores podem alterar moléculas do complemento, como a gp63 que cliva a C3b em iC3b, forma inativa da molécula, impedindo a formação do complexo MAC (BRITTINGHAM et al., 1995).

Como não conseguem penetrar ativamente nas células do hospedeiro, os parasitas dependem da ação fagocítica destas. Através de receptores celulares, células locais, como macrófagos, células dendríticas (DCs) e linfócitos T, reconhecem os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como LPG e gp63, e iniciam o processo de fagocitose. Moléculas do complemento aderidas aos patógenos, como C3b e iC3b, também facilitam a entrada nas células, pois funcionam como opsoninas (TEIXEIRA et al., 2006). Juntamente com as células do tecido, macrófagos locais produzem diversas quimiocinas que iniciarão a cascata de respostas imunes (SPELLBERG, 2000).

Com a picada do mosquito, alguns microvasos são rompidos e é iniciada uma forte resposta inflamatória local, com participação das células locais e recrutamento de novas células (GLAICHENHAUS et al., 2011). Adicionalmente, as formas promastigotas induzem a secreção da quimiocina Proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e a quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL1) pelos macrófagos, que atraem monócitos e neutrófilos, respectivamente (MOUGNEAU et al., 2011).

Neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da infecção. Após fagocitarem o parasita, estas células começam a secretar citocinas, como a IL-8, que atraem mais neutrófilos (LAUFS et al., 2002). Camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* apresentam um intenso infiltrado neutrofílico no local da inoculação, atingindo seu pico 6 horas após a infecção (THALHOFER et al., 2011). Estes leucócitos têm como principal função fagocitar e destruir patógenos invasores. Porém alguns microrganismos possuem a capacidade de sobreviver dentro destas células, modulando os mecanismos de fagocitose, como a *Leishmania* que consegue bloquear a indução da oxidação fagocítica, impedindo sua morte (LAUFS et al., 2002). O parasita também pode aumentar a meia vida do neutrófilo através da alteração da via de marcadores de apoptose, como a via da caspase-3, que sofre diminuição nas células infectadas (AGA et al., 2002). Outro recurso usado pela *Leishmania* é a modulação da fosforilação das quinases ERK1/2 e de moléculas como Bfl-1 e Bcl-2, que previnem a saída do citocromo c da mitocôndria e posterior ativação das caspases (SARKAR et al., 2013). O escape dos mecanismos de morte intracelular e o prolongamento da meia vida tornam os neutrófilos importantes células mantenedoras do parasita, durante o estágio inicial da infecção (LAUFS et al., 2002).

Enquanto formas promastigotas metacíclicas conseguem sobreviver neste ambiente hostil, as formas não-metacíclicas são rapidamente mortas (NADERER; MCCONVILLE, 2011). Além deste fator, Ribeiro-Gomes e colaboradores (2004) mostram que a depleção de neutrófilos diminui a carga parasitária em camundongos BALB/c suscetíveis e aumenta em animais C57BL/6 resistentes, indicando o importante papel destas células no controle da infecção.

Outro mecanismo utilizado pelos neutrófilos no controle do parasita é a liberação de redes extracelulares (NETs) contendo DNA, histonas e proteínas líticas dos grânulos citoplasmáticos. Este processo é denominado netose e é considerado um tipo de morte celular programada diferente da apoptose e da necrose. Fatores de virulência, como o LPG, podem estimular a liberação das NETs pelos neutrófilos que interagem com o patógeno, induzindo sua morte, seja pelas propriedades tóxicas das histonas e dos outros componentes, seja pelo aprisionamento e posterior fagocitose destes parasitas por outras células (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009).

Macrófagos e células dendríticas locais também participam na regulação inicial que leva a resistência ou a suscetibilidade à *Leishmania*. Ao contrário do que se observa com os macrófagos, as DCs são mais efetivas na apresentação de antígenos nas respostas primárias. Após a infecção pelo parasita, as DCs encontradas na pele são ativadas, e passam a ter a expressão de MHC I e II aumentada. Antes aderidas ao tecido, passam a ter a diminuição da expressão de E-caderina, o que permite sua migração para os linfonodos regionais, a fim de apresentar os antígenos de *Leishmania* às células efectoras do sistema imune, processo conhecido como diapedese. Outro fator importante é a manutenção da produção de IL-12, que nos macrófagos infectados é diminuída. Se por acaso, houver falha na produção de IL-12 pelas células dendríticas, ocorrerá uma extensa expansão de células T CD4⁺ auxiliares do perfil Th2, já que esta citocina guia o desenvolvimento de células CD4⁺ Th1 produtoras de IFN- γ , essenciais para a resolução da doença (KHADEM; UZONA, 2014).

Dois ou três dias após a infecção inicial, macrófagos são recrutados para o sítio de infecção através de quimiocinas MIP-1 secretadas pelos neutrófilos (MULLER et al., 2001). Chegando ao local os macrófagos reconhecem neutrófilos infectados em apoptose e os fagocitam, tendo suas funções microbicidas silenciadas pela *Leishmania* (CECÍLIO et al., 2014).

Após estabelecer a vida intracelular em um fagossomo, as formas promastigotas modificam o ambiente intracelular para iniciar a transformação em formas amastigotas. Através da ação do LPG e gp63, a *Leishmania* inibe a proteína quinase C (PKC), que

juntamente com proteínas tirosina quinase (PTK) regulam a ação microbicida, reduzindo a produção de intermediários reativos do oxigênio (GIORGIONE; TURCO; EPAND, 1996). Outra forma de controle exercida sobre os macrófagos é a inibição da síntese de IL-12 (MCDOWELL; SACKS, 1999). Diversos estudos em modelos experimentais, como o murino, mostram que a liberação de IL-12 pelas células apresentadoras de antígeno leva a diferenciação e proliferação de células TCD4⁺ Th1 (ALEXANDER; BRYSON, 2005). As células Th1 induzem a produção de Óxido Nítrico (NO), através do aumento da expressão do iNOS pela célula afetada. Como a *Leishmania* estabelece a infecção dentro do macrófago e prolifera, esta célula pode eventualmente entrar em apoptose. De forma semelhante ao que acontece com os neutrófilos, o parasita retarda o processo de morte e macrófagos não infectados chegam ao local para fagocitar a célula apoptótica contendo formas amastigotas do parasita (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

A polarização da resposta das células T auxiliares está intimamente ligada à suscetibilidade ou resistência ao parasita. Os linfócitos TCD4⁺ Th1 são responsáveis pela morte do parasita, através da produção de IFN- γ , que induz a geração de óxido nítrico (NO) e outros radicais por macrófagos e DCs, potencializando a resposta inata (COELHO-CASTELO et al., 2009). Também é sabido que a citocina TNF- α , produzida sobretudo por macrófagos, além de células T e células assassinas naturais (NK), age juntamente com o IFN- γ na morte de amastigotas (LIEW; O'DONNELL, 1993). Assim como os linfócitos Th1, os linfócitos T CD8⁺ possuem a capacidade de produzir IFN- γ e são importantes por sua ação citotóxica. Camundongos nude infectados com *L. donovani* não conseguem controlar a infecção visceral, devido à deficiência em células T. O controle também falha quando populações T CD4⁺ ou TCD8⁺ são transferidas de forma separada aos animais, mostrando que a resistência ao parasita somente é adquirida com a presença das duas populações (STERN et al., 1988).

A inabilidade de montar uma resposta Th1 leva o indivíduo a suscetibilidade, pela predominância da resposta Th2, na infecção por *L. major* (MOUGNEAU et al, 2011). Entretanto, indivíduos com LV não apresentam claramente essa dicotomia entre as respostas. Alguns estudos mostram existir um aumento de IL-4 e IL-10, com consequente perda da função do IFN- γ na doença ativa. Porém, outras investigações sugerem que a IL-10 é a maior contribuinte para a patologia e sua transcrição pode estar associada à presença de IFN- γ em condições exarcebadas (BHATTACHARYA; ALI, 2013). Também é notado o aumento da produção de IL-10 por células isoladas de pacientes com kala-azar (GHALIB et al., 1993). Assim como os camundongos resistentes que desenvolvem uma forte resposta imune contra o

parasita, muitos pacientes persistem com um pequeno número de parasitas durante a resolução da infecção. A produção de IL-10 tem uma importante função na supressão da resposta imune, sendo atribuída a ela, segundo alguns autores, a responsabilidade pela permanência dos protozoários (KAYE; SCOTT, 2011). Esta citocina suprime muitas funções de células NK e de células T por inibir a apresentação de antígenos e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ . Um estudo mostra a cura de camundongos infectados com *L. major* após a depleção de IL-10 (BELKAID et al., 2001). Acreditava-se que a IL-10 fosse uma citocina produzida especificamente por células Th2, porém estudos posteriores mostraram que ela pode ser secretada tanto por células Th2 quanto Th1 (TRINCHIERI, 2007). Esta citocina também é produzida por células T regulatórias (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), assim como outro potente anti-inflamatório, o TGF- β , que têm o papel de limitar os danos teciduais causados por respostas inflamatórias, limitando também a magnitude das respostas efetoras contra patógenos (KHADEM; UZONA, 2014).

A resposta também pode variar de acordo com o microambiente de infecção, já que a resposta imune à LV se mostra órgão-específica. Em diversos modelos de LV, é possível observar que a infecção esplênica permanece crônica após longo período de tempo, enquanto infecções no fígado possuem boa resolução da doença, associada à formação de granulomas (KHADEM; UZONA, 2014). Estes granulomas consistem em células de Kupffer parasitadas fundidas, células NK e células T que expressam marcadores de superfície de células NK (NKT) funcionais, e um manto de células mononucleares (células CD4⁺ e CD8⁺) ao redor, que tem sua população aumentada uma semana após a infecção, indicando proliferação local e também recrutamento do baço (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

No microambiente linfóide esplênico, a persistência do parasita gera certas mudanças, como o aumento da taxa de apoptose das células T, associado aos elevados níveis de TNF- α , já que membros da superfamília TNF são conhecidos por gerar morte celular apoptótica (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Outro fator importante para a disfunção do órgão é a alta produção de IL-10. A polpa branca se torna desorganizada e reduzida, enquanto a polpa vermelha aumenta, além da involução dos centros germinativos e perda da rede de células dendríticas foliculares (FDC) (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001).

A destruição das FDC e concomitante perda dos centros germinativos afeta a produção de células B, já que ocorre a proliferação dentro destes, juntamente com a mudança de isótipo e subsequente recombinação somática. Isto interfere na regulação da função das células B, contribuindo para a hipergamaglobulinemia e resposta policlonal associada a LV (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Pacientes doentes apresentam altos níveis de anticorpos contra

antígenos não relacionados ao parasita, como para haptenos, autoantígenos, além dos anticorpos anti-*Leishmania* (DEAK et al., 2010).

1.2.4. Tratamento

O tratamento das leishmanioses deve curar o paciente, reduzir o risco de recaída e minimizar a possibilidade de cepas resistentes aos medicamentos (PAHO, 2013). Antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) são a primeira linha de drogas contra todas as formas de leishmanioses. Os antimoniais foram introduzidos por Gaspar Viana, em 1912, na forma trivalente (Sb^{3+}) encontrada no tártaro emético. Entretanto, a formulação apresentava toxicidade, gerando dor no peito, tosse e depressão, além da difícil administração (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). A partir dos anos 40, esse medicamento foi substituído por sua forma pentavalente que é menos tóxica (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). No Brasil, o antimonial pentavalente adotado nos casos de LV foi o antimoniato de meglumina (Glucantime®), sendo o único distribuído pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

Acredita-se que os Sb^{5+} atuam nas formas amastigotas do parasita inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Estudos mostram que os antimoniais também podem atuar diretamente nos macrófagos estimulando o estresse oxidativo sobre o parasita internalizado (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Estes compostos são eliminados rapidamente do organismo, tendo meia-vida de aproximadamente 2 horas (BRASIL, 2014). Os Sb^{5+} possuem algumas limitações. Seu uso deve ser via parenteral, diário, por no mínimo três semanas (20 mg de $Sb/kg/dia$). Pacientes relatam dor durante as injeções intramusculares e efeitos colaterais sistêmicos, como náusea, vômito, fraqueza, mialgia, cólicas abdominais, diarreia, rash cutâneo, além de manifestações hepatotóxicas e cardiotóxicas. O aparecimento de resistência à droga também é outro problema recorrente (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

A partir dos anos 80, o antibiótico poliênico anfotericina B (deoxicolato) que possui atividade antifúngica também passou a ser usado no tratamento da LV devido ao seu poder anti-*Leishmania*. Posteriormente, sua formulação foi modificada para a forma lipossomal, onde é envolvido por colesterol e outros fosfolípídeos, mostrando menor toxicidade e maior eficácia em relação ao anterior (BERN et al, 2006). A anfotericina B ocupa a segunda linha de

drogas e é usada em pacientes que se mostram resistentes ao tratamento com antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2014).

O mecanismo de ação da droga envolve a ligação aos precursores de ergosterol do parasita, causando rompimento da membrana (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Entretanto, o medicamento também pode se ligar ao colesterol presente na membrana celular dos indivíduos parasitados gerando alta toxicidade e efeitos colaterais diversos, incluindo insuficiência renal, anemia, febre e hipocalcemia (LACHAUD et al., 2009). A forma menos tóxica, a anfotericina B lipossomal, possui elevado custo, mostra-se eficaz no tratamento de pacientes de LV na Índia, porém em estudos com pacientes sul-americanos infectados por *L. chagasi* se mostra pouco eficaz (BARRETT; CROFT, 2012).

Antimoniais pentavalentes e anfotericina B são as drogas recomendadas para o tratamento de LV causada por *L. infantum chagasi* pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2010). Todavia, seus inúmeros efeitos colaterais mostram a importância da pesquisa de novas drogas (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Neste contexto, a OMS recomenda a pesquisa de drogas injetáveis de curto prazo ou tratamento oral (RIDLEY, 2003).

1.3. PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTI-*Leishmania*

As plantas são reconhecidas por serem uma rica fonte de extratos biológicos ativos, óleos essenciais e diferentes compostos químicos. Existem vários laboratórios que se dedicam à pesquisa de substâncias derivadas de plantas contra as mais diversas doenças, como câncer, diabetes, processos inflamatórios ou infecções causadas por bactérias ou protozoários (HARVEY, 2008). Dentre as formulações estudadas, encontramos diversas plantas com ação anti-*Leishmania* (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Como exemplo, Mansour e colaboradores (2013), encontraram grande atividade anti-*Leishmania* estudando extratos de folhas de uva (*Vitis vinifera*). Os autores ainda mostraram que o extrato etanólico das folhas promovia a destruição das membranas citoplasmáticas e nucleares de *L. infantum chagasi*.

Também é possível encontrar estudos utilizando os metabólitos secundários de plantas (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Polifenóis, flavonóides,

saponinas, alcalóides, sesquiterpenos, polissacarídeos e outros compostos mostram atividade antiparasitária e imunomoduladora, alterando o balanço das respostas Th1-Th2 (CHOUAN, 2014). Morales-Yuste e colaboradores (2010) mostraram a atividade anti-*Leishmania* do alfabisabolol, um álcool sesquiterpeno abundante no óleo essencial de camomila (*Chamomilla recutita*), em promastigotas de *L. infantum chagasi*. Segundo os autores, este composto também possui ação anti-inflamatória.

Compostos conhecidos por seu poder microbicida são bons candidatos no estudo de novas formulações. Também conhecidos por fitoalexinas, esses compostos possuem baixo peso molecular e síntese desencadeada de forma natural pela planta a partir de situações de estresse ambiental e/ou ataque patogênico, sendo um mecanismo de autodefesa contra diversos patógenos, predadores, agentes químicos e físicos (JANG et al., 1997). O estudo de Luque-Ortega e colaboradores (2004) mostra que duas fitoalexinas encontradas na bananeira (*Musa acuminata*) inibiam formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum chagasi*. Anigofurone e 2-metil-9-fenil-fenaleno são compostos antifúngicos e foram isolados nos rizomas da planta após estímulo com *Fusarium oxysporum*.

Nesta conjuntura, uma fitoalexina que vêm se destacando por sua atividade anti-inflamatória e mais recentemente pela descoberta de sua ação anti-*Leishmania* é o resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxiestilbeno).

1.3.1. Resveratrol

O resveratrol é um polifenol presente em mais de 70 espécies de plantas, como amendoim (*Arachis hypogaea*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), *Veratrum grandiflorum*, *Polygonum cuspidatum* e em várias espécies de uvas, onde sua presença é mais conhecida e estudada (LUCAS; KOLODZIEJ, 2013).

Este polifenol foi isolado pela primeira vez em 1940, a partir da raiz de *Veratrum grandiflorum* (TAKAOKA, 1940) e posteriormente, em 1963, em raízes de *Polygonum cuspidatum* (NOMOMURA; KANAGAWA; MAKIMOTO, 1963), uma planta comumente usada na medicina japonesa e chinesa. Embora tenha sido descoberto em meados do século XX, o resveratrol começou a despertar interesse da comunidade científica a partir dos anos 90, através do trabalho de Siemann e Creasy (1992) que mostra efeitos cardioprotetores do vinho tinto. Este artigo introduz o termo “Paradoxo Francês” que consiste na discussão

epidemiológica da baixa taxa de mortalidade dos franceses por doenças coronarianas, apesar de sua dieta rica em gorduras saturadas, quando comparados aos americanos. Os autores associaram a diferença observada ao consumo diário de vinho pelos franceses e a partir dessa observação, pesquisadores começaram a investigar quais seriam os compostos responsáveis pelo fato (PARK; PEZZUTO, 2015).

Dentre os compostos presentes no vinho, o resveratrol é considerado o polifenol de maior eficácia biológica (FRÉMONT, 2000). A partir destas descobertas, dezenas de estudos começaram a mostrar que o resveratrol podia prevenir ou retardar a progressão de diversas doenças, incluindo o câncer (BAUR et al., 2006).

Em meados dos anos 90, enquanto estudos mostravam somente a ação antioxidante do resveratrol, Cai e colaboradores (1997) associaram o polifenol à inibição de ciclooxigenase (COX), atividade relevante na proteção ao câncer. O grupo estudou a atividade antiinflamatória do composto em modelo murino de edema de pata induzido por carragenina, observando supressão de inflamação. Este fato guiou a pesquisa no estudo da atividade antitumoral. Foi observada redução na liberação de radicais livres em linhagem celular de leucemia (HL-60). Após esta observação, eles investigaram os efeitos do polifenol em modelo murino de câncer de pele e com os resultado notaram a diminuição da doença / células cancerosas.

Kulkarni e Cantó (2015) relatam que a ação antitumoral de alguns compostos naturais pode ser comparada à restrição calórica (RC), quanto à proteção contra o desenvolvimento de tumores. A RC consiste numa redução moderada (normalmente 20-40%) da ingestão calórica, mantendo o consumo necessário de vitaminas e minerais. Esta intervenção aumenta a longevidade e protege as funções biológicas contra a deterioração. Fato comprovado em 1935, por McCay em experimentos com ratos, e confirmado posteriormente em outros modelos, como leveduras, vermes, insetos, peixes e mamíferos, onde foi possível identificar o aumento da atividade de sirtuínas como responsável do fenômeno (MCCAY; CROWELL; MAYNARD, 1989).

Dentre os vários polifenóis vegetais, Howitz e colaboradores (2003) testaram alguns possíveis ativadores de sirtuínas em cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, observando que o resveratrol era o mais potente e mimetizava a RC, aumentando a longevidade da levedura em até 70%, através do estímulo da sirtuína Sir2.

Na uva, a casca é responsável pela maior parte do resveratrol produzido pela planta, estimulada principalmente pela infecção por fungos (ADRIAN et al., 2000). Logo, os níveis de resveratrol dependem de fatores estressantes, tais como: ambiente de cultivo, clima,

exposições a patógenos e, no caso dos vinhos, pelo método de produção (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005). Por essas razões, o resveratrol encontrado nos vinhos pode variar bastante, podendo chegar a 9 mg/L, com a média situada entre 0,82 a 5,75 mg/L (SOUTO et al., 2001), enquanto no suco de uva comercial se situa entre 0,07 a 1,59 mg/L (DONG, 2003). A média dos vinhos brasileiros fica em torno de 3,57 mg/L, uma das mais altas do mundo. Isto se deve ao fato de que boa parte do vinho brasileiro provém da Serra Gaúcha, local de alta precipitação pluviométrica que, conseqüentemente, aumenta a proliferação fúngica na parte aérea das videiras (SOUTO et al., 2001).

Na estrutura química do resveratrol encontramos três grupos hidroxila reativos ligados a dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de metileno. Esta geometria molecular é base para diversos compostos presentes na natureza, diferindo quanto ao número e a posição das hidroxilas, substituição dessas hidroxilas por outros radicais, formação de dímeros, trímeros ou extensos polímeros e o isomerismo (isômeros geométricos *trans* e *cis*) (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997). O resveratrol é sintetizado naturalmente sob duas formas isômeras: *trans* e *cis*-resveratrol (3,4',5-trihidrox*is-trans*-estilbeno e 3,4',5-trihidrox*is-cis*-estilbeno) (ORALLO, 2006), representados na figura 1.

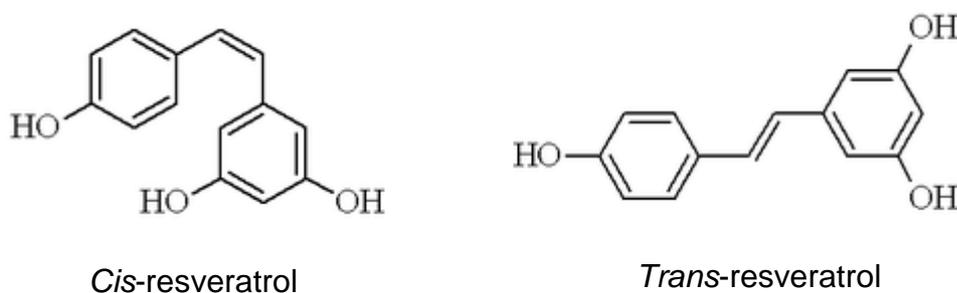


Figura 1: Estrutura química do *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno).

As formas isômeras são relativamente estáveis, sendo que a conversão do isômero *trans* em *cis*-resveratrol é resultado da exposição à radiação ultra violeta (UV) (TRELA; WATERHOUSE, 1996). O isômero *cis*-resveratrol é instável na forma sólida, por isso o isômero viabilizado comercialmente é o *trans*-resveratrol (GOLDBERG et al., 1995), e como resultado existem poucos estudos mostrando a atividade farmacológica do *cis*-resveratrol (ORALLO, 2006). Segundo Wang et al. (2002) não é possível encontrar o *cis*-resveratrol em uvas, diferentemente do vinho que possui este isômero em variadas concentrações, sugerindo a transformação do *trans*-resveratrol por isomerases produzidas por leveduras, durante a

fermentação ou pela quebra de polímeros e glicosídeos de resveratrol, além da transformação devido à radiação UV (FRÉMONT, 2000).

Orallo (2006) mostra que tanto o *cis*-resveratrol, quanto o *trans*-resveratrol exibem atividade antioxidante *in vitro*, bloqueando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), pela inibição da atividade da NADPH oxidase, e também inibem a produção de NO. Este estudo ainda relata que ambos isômeros são efetivamente absorvidos após administração oral em ratos. O autor conclui que os benefícios do resveratrol decorrem do efeito combinado do *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol e propõe a formulação de drogas com combinação dos isômeros.

A meia vida do resveratrol no organismo é curta, durando aproximadamente 8 a 14 minutos e sua molécula primária é metabolizada, sendo convertida a outros compostos secundários, com meia vida de cerca de 9 horas (BAUR et al., 2006). Segundo Walle e colaboradores (2004), aproximadamente, 70% do resveratrol administrado por via oral e intravenosa é absorvido pelo organismo do homem. Desta porcentagem, uma pequena parte permanece na forma inalterada, predominando a metabolização do polifenol em compostos formados por processos de sulfatação e glicuronidação, na interação com proteínas hepáticas de fase I e II (YU et al., 2002). Destes compostos o metabólito mais abundante no soro humano é o resveratrol glicoronídeo, de acordo com Vitaglione et al. (2005).

A ligação do resveratrol às proteínas do plasma, como a albumina sérica e a hemoglobina, permite a maior duração do polifenol no organismo e contribui para a sua distribuição nos tecidos, que se dá por difusão trans-epitelial e proteínas carreadoras. Estes processos são facilitados pela característica lipossolúvel do composto e pela elevada afinidade à proteína albumina (JANNIN et al., 2004).

O resveratrol tende a ser eliminado rapidamente da circulação sanguínea, depositando-se em diferentes órgãos, em variadas concentrações. Vitrac e colaboradores (2003), em experimentos com camundongos BALB/c, observaram maior deposição no duodeno, colon, fígado e rins, com menor detecção no baço, coração, cérebro e testículos, após administração oral de ¹⁴C-*trans*-resveratrol. No cólon e no baço, observou-se uma significativa atividade do polifenol, tendo ação moderada no coração, testículos e no cérebro.

Existem diversas propriedades biológicas e farmacológicas responsáveis pelos efeitos benéficos do resveratrol na prevenção e tratamento de diversas patologias (BAUR et al., 2006). Como exemplo, a potente capacidade antioxidante do polifenol decorre da ligação do composto aos radicais livres presentes no meio celular. Estes radicais são resultado do metabolismo celular, considerados iniciadores dos processos oxidativos, por possuírem

átomos com elétrons desemparelhados. A ligação destes átomos a estruturas celulares ocasiona o dano, e o resveratrol impede esta degradação celular, além de inibir a ativação de mediadores inflamatórios, como o NF- κ B. Dentre os efeitos antioxidantes observados, a cardioproteção foi bastante estudada mostrando que o composto previne a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (LEONARD et al., 2003) e inibe a agregação plaquetária (OLAS et al., 2002).

A atividade anti-inflamatória do resveratrol já foi estudada em modelos de doenças cardiovasculares, câncer, obesidade, diabetes e doenças neurodegenerativas (NAKATA; TAKAHASHI; INOUE, 2012).

O resveratrol também vem chamando atenção da comunidade científica por se mostrar ativo contra importantes microrganismos causadores de doenças humanas, como vírus (TANG et al., 2015), bactérias (CHAN, 2002), fungos (CHAN, 2002) e parasitas (MALLO; LAMAS; LEIRO, 2013; BOTTARI et al., 2015).

Em um estudo com herpesvirus, o polifenol reduziu a produção de partículas virais, além de ativar a caspase-3, induzindo a apoptose das células infectadas (TANG, 2015). Outro trabalho mostrou o efeito antimicrobiano do resveratrol sobre bactérias patogênicas da pele e dermatófitos em cultura. O composto diminuiu a porcentagem de crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Através de diluição seriada do polifenol, o autor notou que o crescimento do *S. aureus* diminuía em 80-90%, quando em concentração de 171 μ g/mL de resveratrol, enquanto as cepas de *E. faecalis* e *P. aeruginosa* tinham similar quantidade de inibição na concentração de 342 μ g/mL. Nos fungos testados, quantidade menor do polifenol foi requerida para a inibição do crescimento em 75%. Espécies de *Trichophyton*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum* tiveram seu crescimento reduzido em meio com concentrações entre 25-50 μ g/mL (CHAN, 2002).

Mallo, Lamas e Leiro (2013) testaram o efeito *in vitro* do resveratrol no crescimento de *Trichomonas vaginalis*, observando o decréscimo do número de trofozoítos, quando nas concentrações de 50 e 100 μ M. Os autores encontraram similaridade na atividade antiparasitária do resveratrol comparado com a droga referência Metronidazol. Ambos tratamentos diminuem o potencial de membrana hidrogenossomal ($\Delta\psi_m$), alvo importante para fármacos, já que este protozoário não possui mitocôndria.

Modelos murinos de parasitoses tratados com resveratrol também mostram caminhar para a resolução da infecção pela morte dos parasitas e modulação do sistema imune. Camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com o polifenol mostraram

redução de cistos no cérebro, quando comparados ao controle não tratado, além de diminuição de espécies reativas de oxigênio, que causam neurodegeneração no curso da doença (BOTTARI et al., 2015).

No campo das parasitoses, podemos encontrar estudos *in vitro* avaliando a ação do resveratrol em espécies de *Leishmania*. Kedzierski et al. (2007) foram os primeiros a relatar os efeitos do resveratrol sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. major*. Este composto mostrou atividade anti-*Leishmania* em estudos *in vitro* com *L. major* (KEDZIERSKI et al., 2007; LUCAS; KOLODZIEJ, 2013); *L. donovani* (DINESH, 2014) e *L. amazonensis* (FERREIRA et al., 2014), mostrando ser um candidato promissor no tratamento das leishmanioses. No entanto, todos os estudos encontrados na literatura relatam a propriedade anti-*Leishmania* desse composto somente em testes *in vitro*, assim pretendemos neste estudo avaliar a eficácia do tratamento com resveratrol em modelo murino de leishmaniose visceral.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do tratamento com resveratrol *in vivo* sobre a leishmaniose visceral murina causada por *L. infantum chagasi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade do tratamento pelas dosagens de TGO, TGP e creatinina.
- Avaliar o efeito do tratamento com resveratrol sobre a carga parasitária do baço e fígado após a infecção com *Leishmania infantum chagasi*.
- Avaliar a produção das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TGF- β , TNF- α e óxido nítrico em sobrenadante de baço e fígado de animais infectados e tratados.
- Avaliar os aspectos histológicos do baço e fígado de animais infectados e tratados.
- Avaliar o perfil de linfócitos B, T CD8⁺, T CD4⁺ e Tregs no baço de animais infectados e tratados.
- Avaliar os efeitos do tratamento sobre a apoptose de esplenócitos de animais infectados e tratados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 6-8 semanas de idade, com peso corporal de 25 ± 5 g foram usados neste estudo. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal Fluminense e mantidos em gabinetes no biotério do laboratório de Imunobiologia, sob controle do ciclo claro-escuro de 12h e controle de temperatura e umidade, recebendo água filtrada, ração comercial (Purina®) *ad libitum* e maravalha autoclavada. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a regulação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES), aprovado como projeto número 049/2015.

3.2 CEPA DE *L. infantum chagasi*

A cepa de *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1975/PP75) usada para realizar a infecção dos animais foi gentilmente cedida pela professora Elenice M. Lemos, do laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI-UFES). Os parasitas foram cultivados em meio Grace's (Sigma-Aldrich®, EUA) com pH 6,8, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) inativado a 56°C por 30min, 0,2% de hemina (Sigma-Aldrich®), 0,5% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 5% de urina humana. As culturas eram mantidas até o final da fase logarítmica de crescimento em estufa refrigerada BOD a 24°C e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Para manter a infectividade, esporadicamente, camundongos BALB/c eram infectados pela cepa e eutanasiados para isolamento do protozoário em cultura de células do baço e fígado.

3.3. INFECCÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTO

No final da fase logarítmica, a cultura de promastigotas de *L. infantum chagasi* foi centrifugada a 3000rpm/5°C/10min e lavada duas vezes com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2). O sedimento foi suspenso em PBS para a realização da contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e posterior ajuste da concentração. Grupos contendo de quatro a sete camundongos foram infectados por veia caudal com 1×10^7 parasitas/animal e o início dos tratamentos se deu 24h após a infecção, conforme demonstrado na figura 2. Um grupo de animais recebeu resveratrol, via gavagem oral, na concentração de 50 mg/kg/dia, diluído em veículo, composto de álcool 10% e óleo de girassol. Como controle negativo, um grupo de animais recebeu somente o veículo, também via gavagem oral. Como controle positivo, outro grupo de animais recebeu Antimoniato de meglumina (Glucantime®) na concentração de 50 mg/kg/dia (via intraperitoneal), dose considerada sub-ótima segundo Murray (2008). Todos os grupos receberam o tratamento ou placebo durante dez dias ininterruptos.

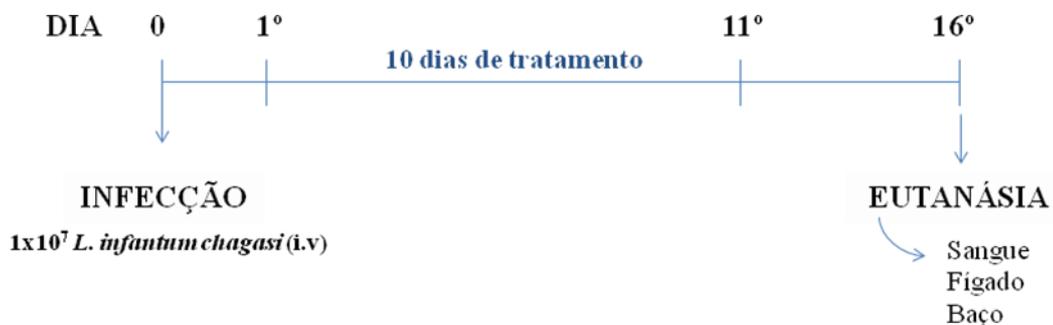


Figura 2: Delineamento experimental para avaliação da ação anti-*Leishmania* do resveratrol *in vivo*.

3.4. DOSAGEM DE TRANSAMINASES (TGO E TGP) E CREATININA

Os camundongos foram anestesiados com 20µL de anestésico quetamina:xilazina (10:1) na cavidade peritoneal, após o término dos tratamentos. Procedeu-se então a coleta de uma amostra de sangue, com uma ponteira embebida em solução de EDTA. Para a dosagem da Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) e

creatinina, foi realizado um ensaio colorimétrico com o sistema comercial Doles®, utilizando amostras do soro dos animais testados. Para testar a validade do teste, um novo grupo de animais recebeu Tetracloreto de Carbono (CCl₄). Seguindo as instruções do fabricante, foi preparada uma curva de calibração contendo diluições seriadas da substância padrão, iniciando nas concentrações de 1000µg/mL para TGO e TGP e 0,05 µg/mL para Creatinina. Em seguida, foi adicionado 1mL do reagente de cor em cada tubo, contendo amostras ou curva padrão e após a homogeneização, estes permaneceram, em temperatura ambiente, repousando por 20min. Decorrido este tempo, foram acrescentados em cada tubo 10mL de Hidróxido de Sódio 0,4M, misturando-os por inversão e após 2min de repouso, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 505nm (Varioskan Flash – Thermo®).

3.5. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DO BAÇO E FÍGADO E ESPLENÓCITOS

Após o término do tratamento, os camundongos foram eutanasiados para a remoção do baço e fígado.

Os órgãos foram removidos em condições assépticas, e individualmente, transferidos para tubos cônicos (Falcon) independentes, previamente identificados e contendo 3 mL de Grace's (Sigma-Aldrich®). Em seguida, cada órgão foi macerado em peneira de nylon de 100µm (BD Falcon, Spectrun), acopladas a um tubo cônico de 50 mL, com o auxílio de um êmbolo de seringa, obtendo uma suspensão do macerado de órgãos. Para análise da carga parasitária, alíquotas da suspensão gerada foram retiradas e posteriormente o macerado foi submetido à centrifugação a 3000rpm/4°C/10min em um tubo cônico de 50 mL, para retirada do sobrenadante usado na dosagem de citocinas e NO.

Para a obtenção dos esplenócitos usados na imunofenotipagem e análise de apoptose, uma alíquota do baço foi transferido para tubos cônicos (Falcon) independentes, previamente identificados e contendo 3 mL de RPMI (Sigma-Aldrich®) pH 7,2, suplementado com bicarbonato de sódio 3,7mg/mL, HEPES 4,7mg/mL (Sigma®) e SFB inativado 10%. O órgão foi macerado para a obtenção de células, conforme descrito acima, e posteriormente centrifugado a 1500 rpm/4°C/10min.

As células foram ressuspensas em 6mL de solução de lise de hemácias (TRIS Base 1,21 mg/mL e cloreto de amônio 8,3mg/mL em água deionizada) pH 7,2, por 7 min. Após

este período, foram adicionados 10 mL de PBS e as células foram submetidas a nova centrifugação a 1500 rpm/4°C/10min, a fim de descartar o sobrenadante e suspender o precipitado em 5 mL de RPMI, para a contagem de células. As células foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para 1×10^6 /mL, a fim de serem marcadas e analisadas em citometria de fluxo.

3.6. ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA

Para estimar a quantidade de parasitas presentes no baço e fígado dos animais, os camundongos tiveram os órgãos retirados para a realização da técnica de diluição limitante, método descrito por Buffet et al. (1995).

Para isto, os órgãos foram macerados conforme descrito acima. Duas alíquotas de 200µL do macerado de cada órgão foram transferidas para poços da primeira fileira de placas de fundo plano de 96 poços (BRANDplates), que tiveram seus poços subsequentes preenchidos com 150µL de Grace's, para posterior diluição seriada 1:4.

As placas foram incubadas em estufa BOD por dez dias a 26°C. Após este período cada placa foi observada ao microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) para observação do último poço contendo formas promastigotas. O número de parasitas por órgão foi determinado pela maior diluição logarítmica na qual a forma promastigota podia ser visualizada e sua correlação com o peso do órgão avaliado.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NOS SOBRENADANTES DO MACERADO DE BAÇO E FÍGADO

Os sobrenadantes dos órgãos macerados foram coletados a fim de quantificar a concentração de óxido nítrico (NO). Essa análise foi realizada indiretamente por meio da mensuração das concentrações de nitrito pelo método colorimétrico de Griess, como descrito por Green et al. (1990). Como curva padrão foi utilizado N_2NO_3 na concentração de 50µM para subsequente diluição. O reagente de Griess foi preparado utilizando iguais volumes de uma solução a 2,5% de H_3PO_4 Sulfanilamida (Sigma-Aldrich®) e outra solução com 1% de

α -Naftiletilenoaminohidrocloro (NEED) (Sigma-Aldrich®) na concentração de 0,1%. Na reação, alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes foram depositadas em duplicata em placas de 96 poços, para posterior adição de 50 μ L do reagente de Griess. Após 10 min, em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 540nm usando um leitor (SpectraMax, Molecular Devices).

3.8. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DO MACERADO DE BAÇO E FÍGADO

Ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) foram utilizados para mensurar a concentração das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e TGF- β presente nos sobrenadantes do baço e fígado dos animais testados. A dosagem foi realizada utilizando o sistema comercial eBioscience® com pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinilados da eBioscience, seguindo a recomendação do fabricante.

Placas de alta absorção (Costar®) foram sensibilizadas com o anticorpos de captura durante 18h, a 25°C. Em seguida, os poços foram lavados com solução de lavagem (PBS e 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich®)) e as amostras foram adicionadas e incubadas na mesma temperatura por 2 horas. Após este período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo biotinilado por 1 h/25°C. Finalmente, outra lavagem seguida da adição e incubação com estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience®) por 30 min/25°C.

A revelação ocorreu com a adição de solução tampão citrato de fosfato com 5% de ABTS e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%, sendo a reação interrompida com dodecil sulfato de sódio 1% (SDS) (Gibco®). A quantificação relativa das citocinas foi determinada espectrofotometricamente a 415nm usando leitor (Varioskan Flash – Thermo®).

3.9. DETERMINAÇÃO DE APOPTOSE EM ESPLÊNOCITOS COM ANEXINA V

Esplenócitos apoptóticos foram detectados utilizando o sistema Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Alexis (Lausen, Suíça). A presença de fragmentação do DNA

também foi avaliada através da marcação com Iodeto de Propídeo (PI), caracterizando diferentes estágios de apoptose. Após a lise das hemácias, as células ajustadas para $1 \times 10^6/\text{mL}$ foram marcadas com Anexina V-FITC e PI, em presença de um tampão de ligação contendo cálcio (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2). As células foram incubadas em temperatura ambiente, por 15 min e lavadas com tampão de ligação, para análise por citometria de fluxo, utilizando um citômetro de fluxo Attune®. Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa FlowJo versão 10 (TreeStar, Ashland, OR, USA).

3.10. IMUNOFENOTIPAGEM DOS ESPLÊNOCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise das populações de esplenócitos, $1 \times 10^6/\text{mL}$ de células dos animais testados foram colocados em placas de 96 poços e centrifugadas a 1300 rpm/2min. As células foram ressuspendidas e incubadas em 375 μL de facs buffer contendo anticorpos monoclonais anti-receptores de superfície celular anti-CD3/FITC, anti-B220/APC, anti-CD4/PerCP, anti-CD8/PE, anti-CD25/FITC, anti-Foxp3/PE e antiCD62L/APC, na proporção de 1:200 e mantidas a 4°C/30min. Após o tempo, as células receberam mais 100 μL de buffer e foram lidas pelo citômetro de fluxo Attune®.

Para análise de células T reguladoras, as células foram previamente marcadas com anticorpo anti-CD4/PerCP e anti-CD25/FITC, como descrito anteriormente. Após a marcação extracelular, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em solução de permeabilização, permanecendo incubadas por 30 minutos a 4°C. Após este período, as células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em solução de permeabilização contendo a marcação intracelular anti-Foxp3/PE, na proporção de 1:200 por 30 minutos a 4°C. Então, as células foram lavadas com solução de permeabilização e ressuspendidas em FACs buffer para aquisição no citômetro.

3.11. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO ESPLÊNICO E HEPÁTICO

Fragmentos do baço e fígado dos animais, com cerca de 50-100mg foram removidos e imersos em solução fixadora de Bouin (água destilada saturada de ácido pícrico acrescido de 25% de formol 10% e 5% de ácido acético glacial) por um período de 24h. Em seguida, procederam-se várias etapas de desidratação em série crescente de alcoóis (70°, 85°, 95° e 100°), a diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia de luz.

As imagens foram capturadas por câmera acoplada ao microscópio ótico por meio do software DinoCapture 2.0.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0. Foi feita a análise de variância (ANOVA) de uma via, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação das médias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRATAMENTO COM RESVERATROL *IN VIVO*

Como primeiro objetivo, avaliamos a toxicidade do tratamento, através da análise dos níveis de transaminases (TGO e TGP) e de creatinina no soro dos animais 24 horas após o regime de tratamento ou administração de tetracloreto de carbono (CCl_4) por via intraperitoneal, como controle positivo.

De acordo com a avaliação destes parâmetros bioquímicos, observamos que não houve aumento dos níveis de TGO, TGP e creatinina nos animais tratados com resveratrol (Fig. 3) em comparação ao grupo que recebeu somente o veículo. De forma diferente, animais tratados com Glucantime apresentaram aumentos significativos de TGO e creatinina, quando comparados ao veículo ou ao grupo tratado com resveratrol. Conforme esperado, aumento significativo de TGO, TGP e creatinina ($p < 0,0001$) foram observados no grupo com CCl_4 .

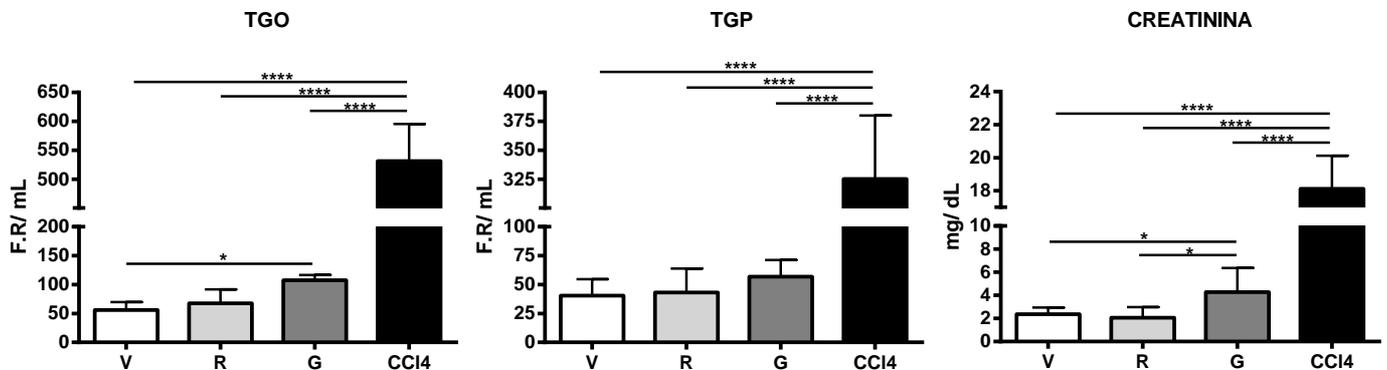


Figura 3: Avaliação da toxicidade aos diferentes tratamentos realizados em camundongos BALB/c, infectados com *L. infantum chagasi*. Dosagem de TGO (A), TGP (B) e creatinina (C) no soro de camundongos que receberam veículo (óleo + álcool 10%) ou resveratrol (50mg/Kg/dia) ou foram tratados com Glucantime (antimoniato de meglumina) (50mg/Kg/dia), durante 10 dias. Controles positivos das análises foram camundongos não infectados que receberam tetracloreto de carbono (CCl_4) por via intraperitoneal 24 horas antes da eutanásia. A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizada individualmente, utilizando o soro dos animais coletado 24 horas após o término dos tratamentos. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 10 animais.. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$. V= Veículo, R= Resveratrol, G= Glucantime.

4.2. EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM RESVERATROL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *L. infantum chagasi*

O próximo passo de nosso trabalho foi avaliar se o efeito anti-*Leishmania* do Resveratrol, observado *in vitro* por Kedzierski et al. (2007), Dinesh et al. (2014) e Ferreira et al. (2014) também existiria *in vivo*. Para isto, camundongos BALB/c foram infectados com 10^7 formas totais de *L. infantum chagasi* e vinte e quatro horas depois da inoculação, iniciaram um regime de tratamento de dez dias.

Os animais tratados com resveratrol apresentaram significativa redução do parasitismo no baço (77%) e fígado (90%), quando comparados ao grupo veículo. Em relação ao grupo tratado com o Glucantime, o resveratrol apresentou bom desempenho e reduziu o parasitismo no baço a níveis semelhantes ao tratamento com a droga padrão (Fig. 4).

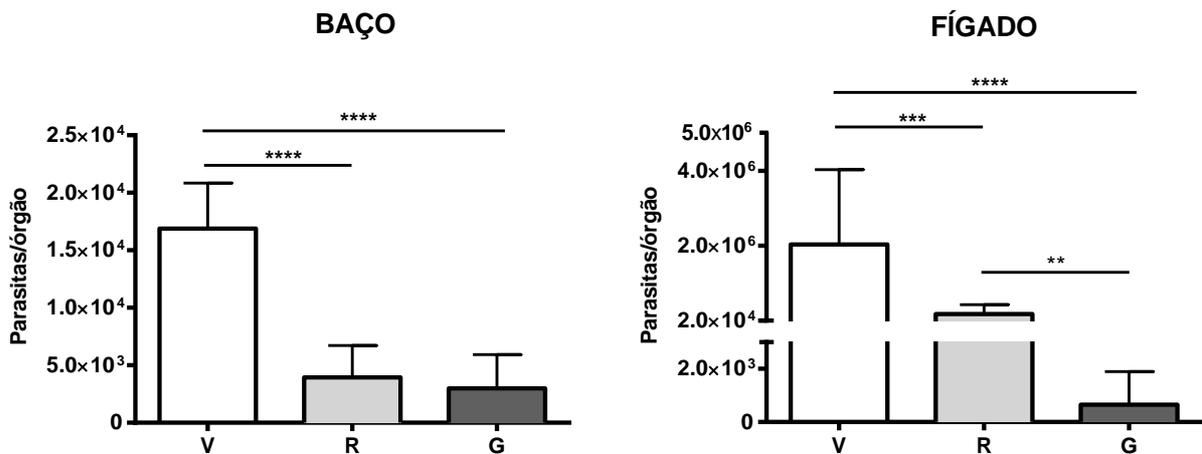


Figura 4: Carga parasitária do baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*. Os animais foram infectados com 1×10^7 formas promastigotas de *L. infantum chagasi* via endovenosa, seguido do tratamento (Conforme descrito na figura 2), iniciado 24 horas após a infecção. O número de parasitas foi determinado no baço e fígado através da técnica de diluição limitante (LDA). Os dados representam a média \pm desvio padrão de 20 animais/grupo. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. V= Veículo, R= Resveratrol, G= Glucantime.

4.3. EFEITO DO TRATAMENTO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO

Uma vez comprovada a redução da carga parasitária, nos propusemos a avaliar a produção de citocinas e óxido nítrico (avaliado na forma de nitrito) no baço e fígado dos animais tratados.

Conforme demonstrado na figura 5, os animais apresentaram diferença na produção de citocinas entre os órgãos analisados. No baço, animais tratados com resveratrol apresentaram redução significativa na produção de TNF- α e IL-10 quando comparado aos grupos controles. Nesse órgão, não observamos diferenças significativas na produção das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-4 e TGF- β bem como na dosagem de óxido nítrico.

Quanto ao fígado, notamos um significativo aumento na produção de TNF- α e TGF- β em relação ao grupo tratado com a droga padrão Glucantime. Além disso, o tratamento com resveratrol levou a uma redução nos níveis de IL-6, IL-17 e IL-4. Não observamos diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis de óxido nítrico, IL10 e IFN- γ no sobrenadante desse órgão.

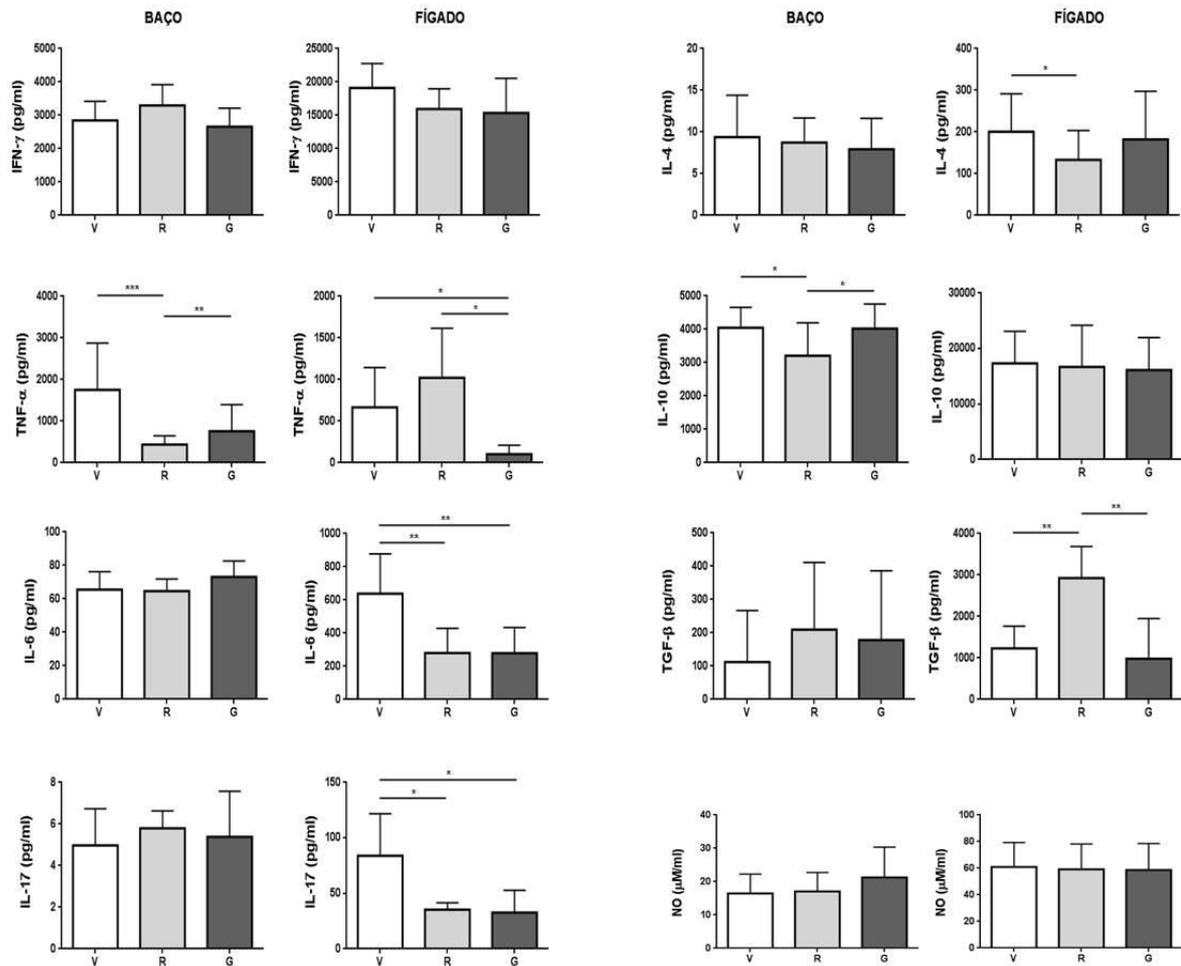


Figura 5: Efeito dos tratamentos sobre a produção de citocinas e óxido nítrico (nitrito). Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-4, IL-10, TGF- β , e nitrito foram determinados pelos métodos de ELISA sanduíche para as citocinas e Griess para nitrito. Camundongos BALB/c infectados e tratados (Conforme descrito na figura 2), tiveram o baço e o fígado retirados e processados separadamente para obtenção do sobrenadante. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 10 animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. V= Véiculo, R= Resveratrol, G= Glucantime.

4.4. AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS NO BAÇO E FÍGADO

Na tentativa de compreender a estrutura dos tecidos infectados e a morfologia das células após os diferentes tratamentos, realizamos a histologia dos tecidos provenientes do baço e fígado dos camundongos infectados.

No fígado dos animais infectados que receberam veículo como tratamento, as lesões foram discretas. Havia aumento do número de células de Kupffer e a presença de raros granulomas formados por macrófagos dispostos em no máximo duas camadas. Não houve identificação de amastigotas típicos, embora tenham sido observados corpúsculos basófilos

intracelulares em alguns macrófagos, mas sem a presença do halo piriforme e do corpúsculo representando o cinetoplasto. No grupo resveratrol o aspecto foi semelhante, embora a frequência de granulomas tenha sido menor. No grupo tratado com glucantime não foram observados granulomas frouxos e a quantidade de células de Kupffer aparentava ser bem menor (Figura 6).

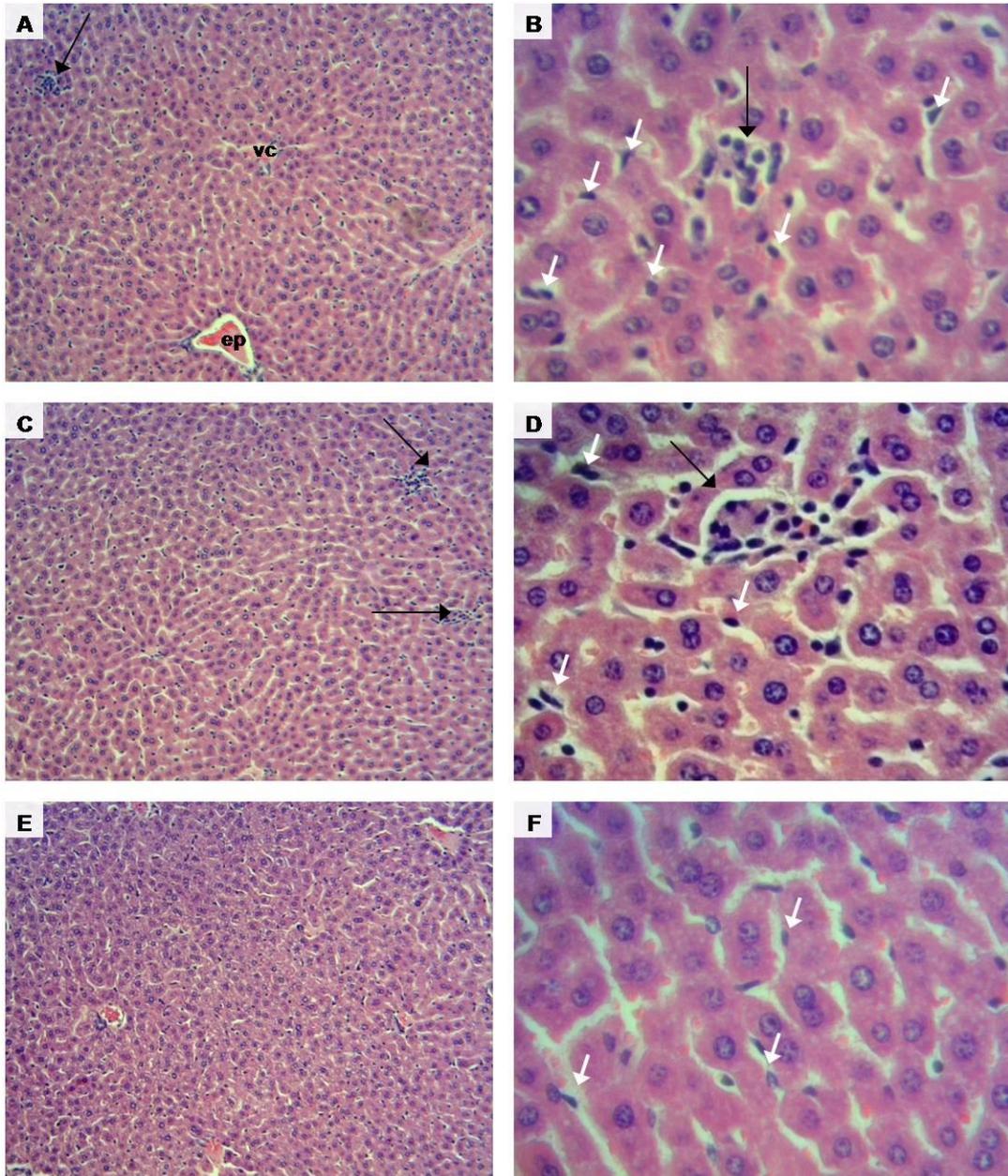


Figura 6: Aspecto histológico do fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi*. A e B. Fígado de animal que recebeu somente veículo. A: observar pequeno granuloma (seta preta); B: detalhe em maior aumento mostrando outro pequeno granuloma (seta preta) e grande quantidade de células de Kupffer (setas brancas). C e D. Fígado de animal tratado com resveratrol. C: dois pequenos granulomas (setas pretas). D: detalhe em maior aumento mostrando a reação das células de Kupffer (setas brancas). E e F. Fígado de animais tratados com Glucantime. E: ausência de granulomas e menor reação das células de Kupffer. F: detalhe em maior aumento mostrando a menor reação das células de Kupffer (setas brancas). vc=veia central; ep= espaço porta. Figuras A, C e E observadas com objetiva 10x; Figuras B, D e F observadas com objetiva de 40x. Coloração: H.E.

Em todos os grupos os animais apresentaram esplenomegalia (grupo Veículo: $172 \pm 22,5$ mg; Resveratrol: $171 \pm 29,5$ mg e Glucantime: $167 \pm 21,9$ mg). Os pesos médios apresentados são todos maiores do que o peso médio de animais não infectados da colônia do laboratório (peso médio foi de 128 ± 10 mg). O estudo histológico mostrou aspecto semelhante nos três grupos: um estado reacional folicular, com aumento do número e do tamanho dos folículos linfáticos (Figura 7). Como no fígado formas amastigotas típicas não foram observadas.

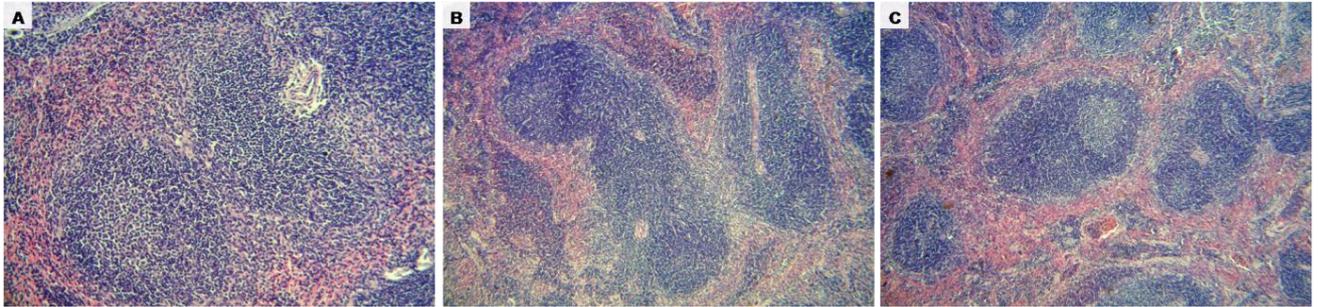


Figura 7: Reação histológica no baço após infecção com *L. infantum chagasi*. Em A, baço representativo do grupo que recebeu somente veículo, em B, do grupo tratado com resveratrol e, em C, do grupo tratado com Glucantime. Figuras observadas com objetiva de 10X. Coloração: H.E.

4.5. IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS B E T NO BAÇO DE ANIMAIS TRATADOS COM RESVERATROL

Como células T e B participam ativamente na resistência ou suscetibilidade à infecção por *Leishmania*, nos propusemos a examinar se o tratamento com o Resveratrol poderia interferir na frequência de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, T reguladoras (Tregs) e linfócitos B. Após a eutanásia, esplenócitos foram isolados individualmente e marcados com os anticorpos monoclonais anti-CD4-PerCP, anti-CD8-PE, anti-B220-APC, anti-CD25-FITC e anti-Foxp3-PE para serem adquiridos por citometria de fluxo.

O grupo tratado com Glucantime apresentou aumento na população de linfócitos B (Fig. 8A) em relação ao grupo que recebeu somente veículo. De forma diferente, observou-se uma redução na frequência de linfócitos T CD4⁺ no grupo tratado com resveratrol e Glucantime quando comparado ao grupo veículo (Fig. 8C). De forma semelhante, a frequência de linfócitos Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) se mostrou reduzida no grupo resveratrol em relação ao grupo veículo, porém sem diferença significativa entre os grupos (Fig. 8D).

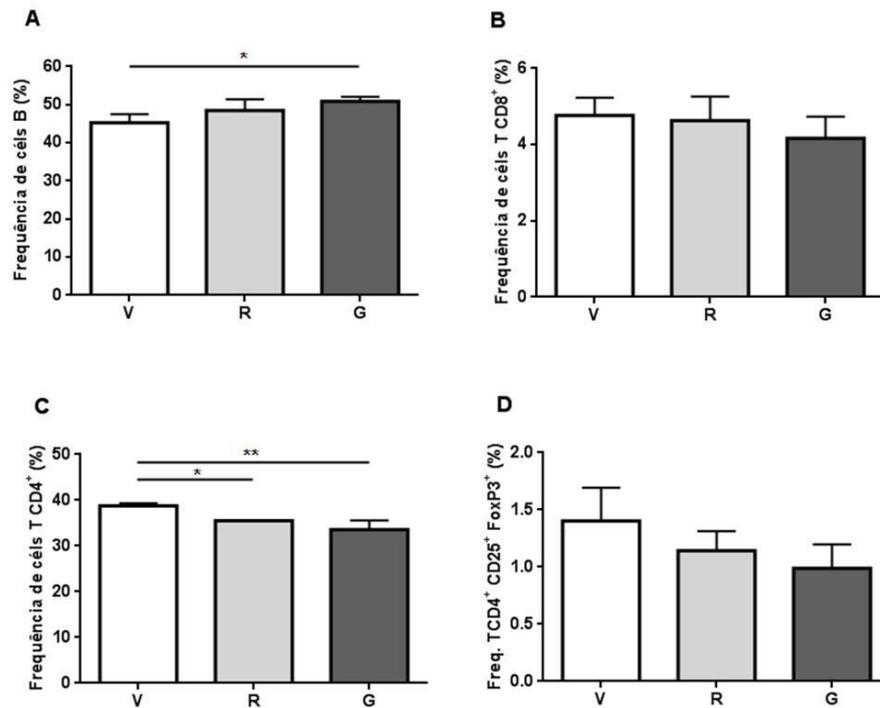


Figura 8: Frequências de linfócitos B, T CD8⁺, T CD4⁺ e Tregs. Esplenócitos (1×10^6) de camundongos BALB/c infectados e tratados conforme descrito acima, obtidos no dia da eutanásia foram marcados com anticorpos monoclonais anti-B220, -CD8, -CD4, -CD25 e -Foxp3. Frequências das populações de linfócitos B (A), T CD8⁺ (B), T CD4⁺ (C) e Treg (D). Os dados representam a média \pm desvio padrão de 8 animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. V= Veículo, R= Resveratrol, G= Glucantime.

4.6. AVALIAÇÃO DE APOPTOSE NOS ESPLÊNOCITOS DE ANIMAIS TRATADOS COM RESVERATROL

É sabido que a persistência da *Leishmania* no ambiente esplênico provoca a apoptose dos esplenócitos nos animais infectados. Com o objetivo de avaliarmos se o tratamento com resveratrol poderia influenciar na viabilidade celular, efetuamos um ensaio onde se verificou o estado apoptótico de esplenócitos obtidos após os diferentes tratamentos. Para isso, os esplenócitos foram isolados e marcados com Anexina V-FITC e PI para serem adquiridos por citometria de fluxo.

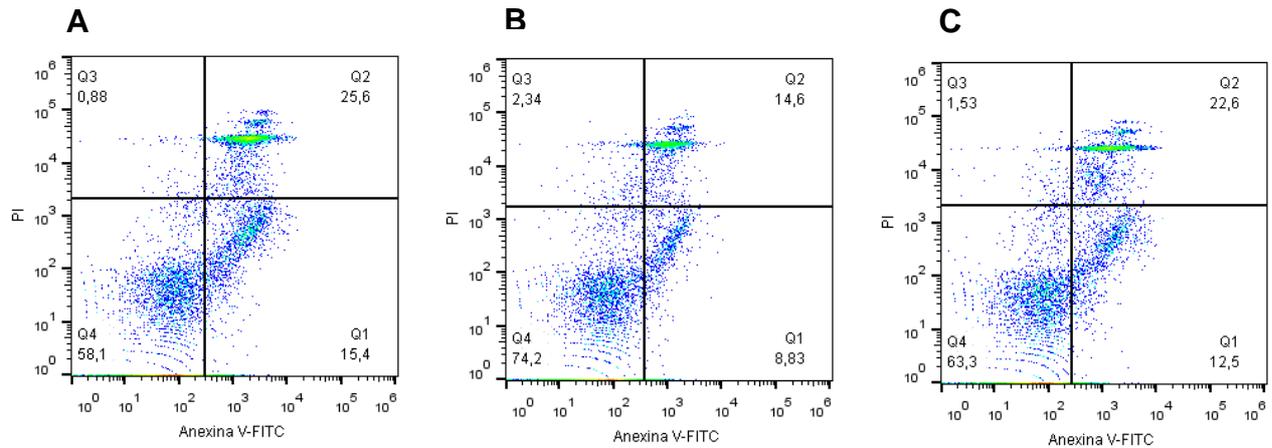


Figura 9: Avaliação de apoptose em esplenócitos após tratamento com resveratrol. Esplenócitos (1×10^6) de camundongos BALB/c infectados e tratados conforme descrito acima, obtidos no dia da eutanásia foram marcados com Anexina V e iodeto de propídio (PI) para a determinação dos estágios apoptóticos por citometria de fluxo. Q1 – Apoptose inicial, Q2 – Apoptose tardia e Q4 – células não apoptóticas. Representação esquemática dos quadrantes nos diferentes grupos tratados: (A) Veículo, (B) Resveratrol e (C) Glucantime.

Foi demonstrada uma redução significativa de apoptose tardia nos esplenócitos dos animais tratados com resveratrol, tanto quando comparado com o grupo veículo ($p < 0,01$), quanto com o grupo tratado com Glucantime ($p < 0,05$) (Fig. 10). Além disso, avaliamos a apoptose inicial na população de linfócitos T $CD4^+$, entretanto não encontramos diferenças significativas entre os grupos estudados (dado não mostrado).

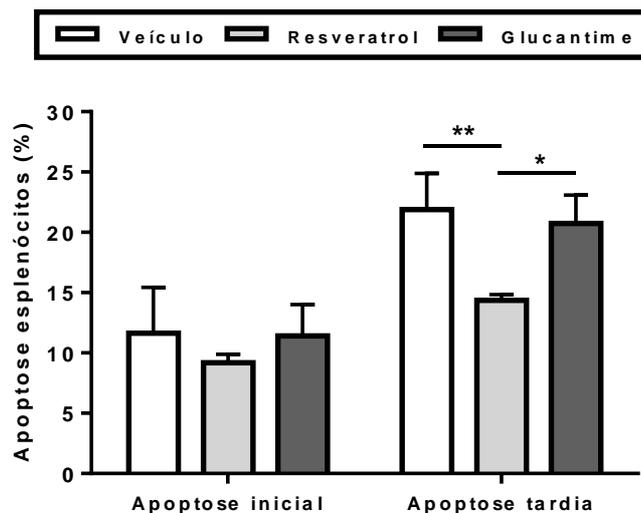


Figura 10: Avaliação de apoptose inicial e tardia em esplenócitos após tratamento com resveratrol. Esplenócitos (1×10^6) de camundongos BALB/c infectados e tratados conforme descrito acima, obtidos no dia da eutanásia foram marcados com Anexina V e iodeto de propídio (PI). Os dados representam a média \pm desvio padrão de 8 animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave das doenças causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, já que sua cronicidade leva o indivíduo infectado a um estado de imunossupressão sistêmica. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), os medicamentos recomendados para o tratamento da LV humana, causada por *L. infantum chagasi*, são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B, tanto na sua forma desoxicolato, quanto na forma lipossomal. No entanto, essas drogas apresentam toxicidade considerável, além do desenvolvimento de resistência por diversas cepas do parasita.

Produtos naturais são usados no tratamento de parasitoses durante séculos, sendo uma ótima alternativa na busca de novas terapias para diversas infecções, como as causadas por *Leishmania* (WINK, 2012). Segundo Wink (2012), 28% das novas drogas registradas entre 1981 e 2006 são produtos naturais ou seus derivados. Os extratos de plantas possuem uma infinidade de biomoléculas capazes de modular a resposta imune ou mesmo atuarem diretamente sobre parasitas (CHOUHAN et al., 2014). Dentre os diversos candidatos de produtos naturais testados contra leishmanioses, o resveratrol vem se destacando, por mostrar eficácia em testes *in vitro* contra *L. major*, *L. donovani* e *L. amazonensis*, conforme descrito por Kedzierski et al. (2007), Dinesh et al. (2014) e Ferreira et al. (2014), respectivamente. Entretanto, estudos *in vivo* que demonstram a ação do polifenol no tratamento de infecções por parasitas do gênero *Leishmania* são inexistentes, até o presente momento. Desta forma, neste trabalho avaliamos pela primeira vez a ação anti-*Leishmania* do resveratrol em modelo experimental murino de leishmaniose visceral causada por *L. infantum chagasi*.

Parasitas do gênero *Leishmania* são eucariotos e por isso podem apresentar propriedades bioquímicas e moleculares iguais a de seus hospedeiros. Em consequência disso, a pesquisa de novas drogas deve avaliar tanto eficácia quanto a toxicidade com o modelo estudado (WINK, 2012). O resveratrol tem demonstrado ser bem tolerado em modelo murino, mesmo em concentrações altas (100 mg/kg/dia), como atestam Schwingel et al. (2014). Corroborando com este dado, nosso estudo mostrou que o soro de animais tratados com resveratrol não apresentou aumento dos parâmetros bioquímicos avaliados: transaminase glutâmico pirúvica (TGP), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e creatinina. A fim de verificar a validade do teste, um grupo de camundongos recebeu tetracloreto de carbono (CCl₄) e apresentou aumento no nível dos três parâmetros bioquímicos, haja visto o efeito tóxico deste composto, conforme relatam Lee et al. (2007). Os biomarcadores TGO, TGP e creatinina podem identificar possíveis danos causados por drogas experimentais (ADLER, 2010), já que níveis plasmáticos alterados de TGP indicam dano hepático (ENNULAT et al., 2010). O TGO indica não só hepatotoxicidade, como também cardiotoxicidade, possíveis

danos aos músculos esqueléticos, rins e pulmões (NISHIMURA et al., 2013) e a creatinina, é uma proteína normalmente produzida no metabolismo dos músculos, sendo eliminada no processo normal de filtração glomerular nos rins, um bom indicador das funções renais (ADLER, 2010). Freitas et al. (2015) mostram que camundongos tratados com Glucantime apresentam aumento destes parâmetros, devido a toxicidade do antimonial. Em concordância com esse estudo, observamos a aumento nos níveis de TGO e creatinina nos animais tratados com Glucantime, em relação aos grupos veículo e resveratrol.

Suscetíveis à infecção com *L. infantum chagasi*, utilizamos camundongos BALB/c como modelo experimental. Em pesquisas anteriores do nosso grupo, Leal et al. (2015) estudaram a cinética de infecção da *L. infantum chagasi* PP75 em camundongos BALB/c, observando que o pico do parasitismo no fígado e baço destes animais era alcançado em aproximadamente 15 dias pós infecção, e após as duas semanas iniciais a carga parasitária dos órgãos avaliados diminuía em mais da metade, se mantendo reduzida em comparação à infecção inicial. Neste sentido, condicionamos a eutanásia dos animais infectados e tratados ao pico do parasitismo, 15 dias após a infecção. Nossos resultados mostram que o grupo tratado com resveratrol apresentou diminuição significativa da carga parasitária no baço e fígado, quando comparado ao grupo controle (veículo). Da mesma forma, o grupo que recebeu o tratamento convencional com Glucantime (antimoniato de meglumina) apresentou redução da carga parasitária nos dois órgãos avaliados, sendo a maior redução observada no fígado, estando de acordo com os achados de Buffet et al. (1996).

Os mecanismos de ação do resveratrol sobre diversos parasitas ainda não estão totalmente elucidados. É possível encontrar estudos mostrando que o resveratrol age interferindo na cadeia respiratória destes, atuando em mitocôndrias ou organelas semelhantes a estas. Em *Philasterides dicentrarchi*, o polifenol causa estresse oxidativo, inibição de enzimas antioxidantes e alterações na mitocôndria (LAMAS et al., 2009; MORAIS et al., 2013). Em *Trichomonas vaginalis* foi observada uma disfunção nos hidrogenossomos, após tratamento com resveratrol. Em tripanossomatídeos, o alvo principal da droga são os cinetoplastos (MALLO et al., 2013). Em outro estudo, Pais-Morales et al. (2015) mostraram que o resveratrol provoca acúmulo de ROS em trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, evento este possivelmente associado a indução de apoptose observada nestes protozoários. De forma semelhante, estudos *in vitro* com parasitas do gênero *Leishmania* mostraram perda do potencial de membrana mitocondrial e consequente apoptose do parasita, em *L. infantum chagasi* (TOLOMEO et al., 2013) e *L. amazonensis* (FERREIRA et al., 2014), após 48 horas de tratamento com resveratrol. Outro mecanismo, observado por Dinesh et al. (2014) é a

inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase que participa na biossíntese de isoprenóides, como o ergosterol, molécula constituinte da membrana do parasita.

Além das propriedades microbicidas, vários estudos mostram os efeitos moduladores do resveratrol sobre a inflamação causada por organismos invasores, conforme demonstrado por Pais-Morales et al. (2016) utilizando hamsters infectados por *E. histolytica*, bem como por Cho et al. (2015) com nematóides e Bottari et al. (2015), em modelo de infecção murina por *Toxoplasma gondii*. Nestes estudos, foi observada uma acentuada redução do parasitismo e da inflamação, com diminuição ou ausência da formação de abscessos, além da restauração do tecido afetado. Segundo Liu et al. (2015), o resveratrol pode atuar diretamente sobre a produção de mediadores inflamatórios, reduzindo a produção exacerbada de citocinas, assim como agir sobre o controle do ciclo celular e a apoptose. Em concordância com estes trabalhos, nosso estudo demonstrou que camundongos infectados com *L. infantum chagasi* e tratados com resveratrol apresentaram modulação da produção de mediadores inflamatórios.

Em camundongos, a resposta imune durante a infecção por *L. donovani* ou *L. infantum chagasi* varia marcadamente entre diferentes órgãos, como o baço e o fígado e, assim como na LV humana existe concomitância entre resposta inflamatória e reguladora (KUMAR; NYLÉN, 2012). Nossos resultados mostram um diferente perfil na produção de citocinas entre o baço e o fígado. No microambiente esplênico, encontramos valores reduzidos de TNF- α e IL-10 no grupo tratado com resveratrol, quando comparado aos outros grupos estudados. A produção da citocina TNF- α está intimamente ligada ao desenvolvimento de uma resposta efetiva contra parasitas do gênero *Leishmania*, participando ativamente na morte do parasita por estimular a geração de NO e outros radicais livres nos macrófagos infectados (COELHO-CASTELO et al., 2009). Entretanto, sua produção excessiva no tecido está associada a dano à arquitetura tecidual e a disfunção imunológica observada no estado crônico inflamatório da infecção (STANLEY; ENGWERDA, 2007). A gravidade da LV é associada ao dano tecidual causado por mediadores inflamatórios (COSTA et al., 2013; SANTOS et al., 2016). O resveratrol é um potente inibidor de proteassomas impedindo a ativação do NF- κ B, e conseqüentemente a transcrição dos genes destes mediadores, como o TNF- α (QUERESHI et al., 2012). Ato et al. (2002) ainda acrescentam que elevados níveis de TNF- α estão ligados ao aumento da produção de IL-10, o que contribui significativamente para o estabelecimento da infecção por *L. infantum chagasi*. Diversos estudos demonstram que altos níveis de IL-10 resultam na resistência do parasita na célula do hospedeiro, por desativar as funções do macrófago infectado (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001).

No fígado dos animais tratados com resveratrol quando comparados ao grupo veículo, encontramos valores aumentados de TNF- α e TGF- β , enquanto as citocinas IL-4, IL-6 e IL-17 se mostraram reduzidas. Murray et al. (2000) demonstra que, diferentemente do baço, o alto nível da citocina pró-inflamatória TNF- α é essencial para o desenvolvimento de uma resposta efetiva contra *L. infantum chagasi* no fígado. Ao passo que, outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e a IL-17, vêm sendo associadas à persistência do parasita e sua produção exacerbada está relacionada com inflamação excessiva e destruição do tecido (SZULC-DABROWSKA et al., 2015). Murray (2008) avaliando a influência da IL-6 em modelo murino de leishmaniose visceral por *L. donovani* observou que animais com baixa produção de IL-6 no microambiente hepático, apresentavam menor carga parasitária. De forma semelhante, Terrazas et al. (2015) mostraram que camundongos IL-17^{-/-} são resistentes à infecção por *L. donovani*, apresentando baixa carga parasitária no fígado e baço. Ambos os autores também encontraram valores reduzidos de IL-4 no fígado, importante citocina de perfil Th2, assim como em nosso estudo. Muitos trabalhos mostram que a administração de resveratrol reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-17, como atesta Li et al. (2007) que ao estudarem os efeitos imunomoduladores do polifenol em modelo murino de leucemia observaram a redução acentuada de IL-6 no soro dos animais que receberam 50mg/kg de resveratrol por três dias.

Juntamente com a citocina pró-inflamatória TNF- α , citocinas anti-inflamatórias, como o TGF- β , são produzidas no granuloma em formação, sendo requeridas a fim de balancear o desenvolvimento da imunidade protetora (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Ferreira et al. (2014) demonstram que macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* secretam quantidades elevadas de TGF- β quando incubados com resveratrol e estimulados com IFN- γ , fato associado a ação anti-inflamatória do composto. Adicionalmente, Suenaga et al. (2008), mostraram que o resveratrol aumenta a produção de TGF- β das células via receptores de estradiol.

Quanto às populações de linfócitos estudadas, observamos uma diminuição na quantidade de linfócitos T CD4⁺ no baço dos animais tratados com resveratrol em relação ao grupo veículo. Whang et al. (2014), estudando esplenócitos isolados de camundongos BALB/c, cultivados *in vitro* e tratados com resveratrol, observaram o efeito inibitório do polifenol sobre a população de linfócitos T CD4⁺, que diminuía a ativação e proliferação destas células. Neste mesmo estudo, Whang et al. (2014) ainda indicam que mais da metade dos linfócitos T CD4⁺ tratados com resveratrol se encontravam em apoptose inicial. De forma contrária, em nosso estudo encontramos valores reduzidos de apoptose em linfócitos T CD4⁺,

assim como em esplenócitos de modo geral, onde o grupo tratado com resveratrol mostrou redução significativa na apoptose tardia. Mukherjee et al. (2010) relatam que o resveratrol pode funcionar tanto como um agente pró-apoptótico, quanto anti-apoptótico, dependendo da dosagem. Células renais tratadas com altas doses de resveratrol apresentam perda da integridade da membrana e consequente perda de sua função, segundo Caddeo et al. (2008). Além disso, Pearson et al. (2008) mostram que camundongos tratados com altas doses de resveratrol (1800 mg/kg/dia) morrem dentro de 3 a 4 meses, por insuficiência renal. Entretanto, animais tratados com doses moderadas (25-100 mg/kg/dia) apresentam redução de apoptose decorrente do envelhecimento (MUKHERJEE et al., 2010) e aterosclerose (DUDLEY et al., 2008). Outro fator associado à diminuição de apoptose nos tecidos após o tratamento com resveratrol é a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , segundo Verçosa et al. (2012).

Como primeiro trabalho *in vivo* da ação anti-*Leishmania* do resveratrol em camundongos infectados com *L. infantum chagasi*, pudemos comprovar a eficácia da droga em leishmaniose murina experimental, sendo que a dose administrada e o regime aos quais os animais foram submetidos não foram capazes de esterilizá-los da infecção, porém reduziram a carga parasitária de forma significativa. Portanto, nosso estudo demonstra que o resveratrol representa uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose visceral.

6. CONCLUSÃO

Com base em nossos resultados, podemos concluir que a administração oral do Resveratrol na dose de 50 mg/kg/dia durante 10 dias não induz toxicidade sistêmica em camundongos e apresenta efeito anti-*Leishmania infantum chagasi in vivo*, demonstrado pela redução do parasitismo hepático e esplênico. Além disso, o resveratrol previne a apoptose de esplenócitos, favorecendo a resposta imune protetora.

7. REFERÊNCIAS

- ADLER, S. Novel Kidney Injury Biomarkers. **J. Renal Nutrition**, v. 20, n. 5, p. S15-S18, set. 2010.
- ADRIAN M, J. et al. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 6103–6105, 2000.
- AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J. Immunology**, v. 169, n. 2, p. 898-905, jul. 2002.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J et al. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post-colombian historical source. **Hist Cienc Saude Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 852-882, set./dez. 2003.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- ATO, M. et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nat. Immunol.**, v.3, n.12, p.1185-1191, dez. 2002.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, v. 2, p. 1234-1259, 1996.
- BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British medical Bulletin**, v. 104, p. 175-196, 2012.
- BAUR, J. A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, p. 337-342, nov. 2006.
- BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1497-1506, 2001.
- BENCHIMOL, J. L.; SÁ, M. R. Adolpho Lutz obra completa volume II. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006, 508p.
- BERN, C. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 7, p. 917-924, out. 2006.
- BHATTACHARYA. P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 2, p. 128-134, mar.-abr. 2013.
- BLACKWELL, J. M. et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. **Cell Microbiol.**, v. 3, n. 12, p. 773-784, dez. 2001.
- BLACKWELL, J. M. et al. Genetics and visceral leishmaniasis of mice and man. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 5, p. 254-266, mai. 2009.

BOTTARI, N. B. et al. Sulfamethoxazole-trimethoprim associated with resveratrol for the treatment of toxoplasmosis in mice: Influence on the activity of enzymes involved in brain neurotransmission. **Microbial Pathogenesis**, v. 79, p. 17-23, jan. 2015.

BOYDENS, C. et al. Relaxant and antioxidant capacity of the red wine polyphenols, resveratrol and quercetin, on isolated mice corpora cavernosa. **J. Sex. Med.**, v. 12, n. 2, p. 303-12, fev. 2015.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 1. ed., 5ª reimp., 2014, 120 p.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, v. 155, n. 6, p. 3102-3111, set. 1995.

BUFFET, P. A. et al. Culture Microtitration: a Sensitive Method for quantifying *Leishmania infantum* tissues of infected mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2167-2168, set. 1995.

CADDEO, C. et al. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. **Int. Pharma**, v. 363, p. 183-191, 2008.

CHAN, M. M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 99-104, 2002.

CHO, H. S. Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. **Biofouling**, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2015.

CHOUAN, G. et al. Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 5, p. 193, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829566> >.

CHOUHAN, G. et al. Apoptosis mediated leishmanicidal activity of *Azadirachta indica* bioactive fractions is accompanied by Th1 immunostimulatory potential and therapeutic cure *in vivo*. **Parasit. Vectors**, v. 8, n. 183, mar. 2015.

CAI, M. J. L. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-220, jan. 1997.

CECÍLIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, out. 2014.

COELHO-CASTELO, A. A. M. Resposta imune a doenças infecciosas. Rev. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 42, n. 2, p. 127-142, 2009.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathog. Glob. Health**, v. 107, n. 2, p. 78-87, mar. 2013.

- DAVIES, C. R. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 101, p. 3337-3343, dez. 1990.
- DEAK, E. et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, n. 5, p. 1355-1368, mai. 2010.
- DINESH, N. et al. Exploring *Leishmania donovani* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) as a potential drug target by biochemical, biophysical and inhibition studies. **Microb. Pathog.**, v. 66, p. 14-23, jan. 2014.
- DOMINGUEZ, M. et al. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 4, p. 451-459, fev. 2002.
- DONG, Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. **Mutation Research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 523-524, fev./mar., 2003.
- DUDLEY, J. et al. Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. **J. Nutr. Biochem.**, v. 20, n. 6, p. 443-452, jun. 2009.
- DUNKELBGEERR; J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell. Res.**, v. 20, n. 1, p. 34-50, jan. 2010.
- ELMAHALLAWY, Ehab Kotb et al. Diagnosis of leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 8, n. 8, p. 961-972, mai. 2014.
- ENNULAT, D. et al. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. **Toxicological Sciences**, v. 116, n. 2, p. 397-412, mai. 2010.
- FERREIRA, C. et al. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: *In vitro* effect of its association with amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6197-6208, out. 2014.
- FREITAS, E. O. et al. Immuocillins ImmA and ImmH are effective and non-toxic in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 12, dez. 2015.
- FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. **Life Sci.**, v. 66, p. 663-673, 2000.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELII, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-36, 2009.
- GHALIB, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 324-329, 1993.
- GLAICHENHAUS, N. et al. Cell biology and Immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 286-296, 2011.

GIORGIONE, J. R.; TURCO, S. J.; EPAND, R. M. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, n. 21, p. 11634, 11639, out. 1996.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. 3'-Nucleotidase/Nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 4, p. 1732-40, abr. 2014.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microb.**, v. 17, n. 9, p. 1286-1294, set. 2015.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, p. 191-196, Set. 2003.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218-220, Jan. 1997.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604-15, jul. 2011.

KEDZIERSKI, L. et al. In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 102, p. 91-97, 2007.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiol**, v. 9, n. 7, p. 901-15, 2014.

KULKARNI, S. S.; CANTÓ, C. The molecular targets of resveratrol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1852, n. 6, p. 1114-1123, jun. 2015.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front. Immunol.**, v. 3, n. 251, ago. 2012.

LACHAUD, L. et al. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. **Clin. Infect. Diseases**, v. 48, n. 2, p. e16-e22, 2009.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the new world. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 2. Ed. Londres: E Arnold, p. 313-349, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 63, n. 2, p. 134-145, 1988.

- LAMAS, J. et al. Resveratrol promotes an inhibitory effect on the turbot scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* by mechanisms related to cellular detoxification. **Vet. Parasitol.**, v.161, p. 307-315, 2009.
- LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p. 826-835, fev. 2002.
- LEAL, J. M. et al. Intranasal vaccination with killed *Leishmania amazonensis* promastigotes antigen (LaAg) associated with CAF01 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice challenged with *Leishmania (infantum) chagasi*. **Parasitology**, v. 142, n. 13, nov. 2015.
- LEE, C. et al. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl₄-induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.888-895, 2007.
- LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. **Br Med J.**, v. 1, n. 2213, p. 1252-1254, Mai. 1903.
- LEONARD, S. S. et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 1017-1026, 2003.
- LI, T. et al. Resveratrol induces apoptosis, influences IL-6 and exerts immunomodulatory effect on mouse lymphocytic leukemia both *in vitro* and *in vivo*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, n. 9, p. 1221-1231, set. 2007.
- LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 32, p. 161-259, 1993.
- LIU, F. C. et al. Anti-Inflammatory and Organ-Protective Effects of Resveratrol in Trauma-Hemorrhagic Injury. **Mediators Inflamm.**, v.2015, n.643763, 2015.
- LIMA, L. V. R. et al. Canine Visceral Leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 52, p. 259-265, 2010.
- LUCAS, I. K.; KOLODZIEJ, H. *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol originates from its cytotoxic potential against host cells. **Planta Med.**, v. 79, p. 20-26, 2013.
- LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenil-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 5, p. 1534-1540, mai. 2004.
- MALLO, N et al. Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2476-2484, jun. 2013.
- MANSOUR, R. et al. The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum*. **Iran J. Pharm. Res.**, v. 12, n. 3, p. 349-355, 2013.

- MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.
- MCCAY, C. M.; CROWELL, M. F.; MAYNARD, L. A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. **Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 155-171, mai. 1989.
- MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **EMBO J.**, v. 11, n. 10, p. 3593-3600, out. 1992.
- MCDOWELL, M. A. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, n. 4, p. 438-443, ago. 1999.
- MIGONE, L. E. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.
- MORAIS, P. et al. Effect of resveratrol on oxygen consumption by *Philasterides dicentrarchi*, a scuticociliate parasite of turbot, v. 164, p. 206-217, 2013.
- MORALES-YUSTE, M. et al. Activity of (-)-alpha-bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3-4, p. 279-281, mar. 2010.
- MOUGNEAU, E. et al. Cell biology and immunonology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 286-296, 2011.
- MUKHERJEE, S. et al. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose response**, v. 8, p. 478-500, 2010.
- MULLER, K. et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, n. 1-2, p. 73-76, nov. 2001.
- MURRAY, H. W. et al. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **J. Immunol.**, v.49, p.307-310, 2000.
- MURRAY, H. W. Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. **Infect. Immun.**, v.76, n.9, p.4088-4091, set. 2008.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in Leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
- NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. **Essays Biochem.**, v. 51, p. 81-95, 2011.
- NAKATA, R.; TAKAHASHI, S; INOUE, H. Recent advances in the study on resveratrol. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 3, p. 273-279, mar. 2012.

- NISHIMURA, Y. et al. Genomic biomarkers for cardiotoxicity in rats as a sensitive tool in preclinical studies. **J. Appl. Toxicol.**, v.33, p.1120-1130, 2013.
- NOMOMURA, S.; KANAGAWA, H.; MAKIMOTO, A. Chemical constituents of polygonaceous plants. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) **Yakugaku Zasshi**, v. 83, p. 988-990, 1963.
- OLAS, B. et al. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. **Thromb. Res.**, v. 107, p. 141-145, 2002.
- ORALLO, F. Comparative studies of the Antioxidant Effects of *Cis*- and *Trans*-Resveratrol. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 87-98, 2006.
- PAHO. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**. Washington, D. C.: Pan American Health Organization, WHO. 2013. 60 p.
- PAIS-MORALES, J. et al. Resveratrol induces apoptosis-like death and prevents *in vitro* and *in vivo* virulence of *Entamoeba histolytica*. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. jan. 2016.
- PARK, E.; PEZZUTO, J. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1852, n. 6, p. 1071-1113, Jun. 2015).
- PEARSON, K. J. et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. **Cell Metab.**, v. 8, p. 157-168, 2008.
- PIMENTA, P. F. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1812-1815, jun. 1992.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.
- QUERESHI, A. A. et al. Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor. **Lipids in Health and Disease**, v.11, p.76-93, jul. 2012.
- REY, L. Leishmania e Leishmanioses: Os parasitos. In: _____. **Parasitologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro, p. 214-226, 2001.
- RIDLEY, R. G. Drug against parasitic diseases. WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2003, p. 13-21.
- ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **Br Med J.**, v. 2, n. 2239, p. 1401, nov. 1903.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, nov. 2002.
- SANTOS, P. L. et al. The severity of leishmaniasis correlates with elevated levels of serum IL-6, IL-27 and scCD14. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 1, jan. 2016.

SARKAR, Arup et al. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 202, p. 25-35, jun. 2012.

SCHWINGEL, T. E. et al. Effects of the compounds resveratrol, rutin, quercetin, and quercetin nanoemulsion on oxaliplatin-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.387, n.9, p.837-848, set. 2014.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 43, p. 49-52, 1992.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **J. Nut. Biochem.**, v. 16, p. 449-466, 2005.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific J. Trop. Med.**, v. 5, n. 6, p. 485-497, jun. 2012.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 139-149, jun. 2004.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clin. Biochem.**, v. 30, n. 2, p. 97-113, mar. 1997.

SOUTO, A. A. et al. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC. **J. Food Comp. Anal.**, v. 14, p. 441-444, 2001.

SOUZA, M. A. et al. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. 1 – Flebotomíneos de área de procedência de caso humano autóctone. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, p. 161-168, 1981.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sci.**, v. 67, n. 5, p. 477-502, jun. 2000.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, Queensland, v. 85, p. 138-147, 2007.

STERN, J. J. et al. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 140, n. 11, p. 3971-3977, jun. 1988.

SUENAGA, F. et al. A possible link between resveratrol and TGF-beta: resveratrol induction of TGF-beta expression and signaling. **FEBS Left.**, v.582, n.2, p.586-590, mar. 2008.

SZULC-DABROWSKA, L. et al. Th17 lymphocytes in bacterial infections. **Postepy Hig. Med. Dosw.**, v. 69, p. 398-417, abr. 2015.

TAKAOKA, M. J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes fil.). **J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University**, v. 3, p. 1-16, 1940.

TANG, F. Y. et al. Resveratrol induces cell death and inhibits human herpesvirus 8 replication in primary effusion lymphoma cells. **Chem. Biol. Interact.**, v. 242, p. 372-379, dez. 2015.

TEIXEIRA, M. J. et al. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 1, p. 32-40, jan. 2006.

TERRAZAS, C. et al. IL-17^a promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **FASEB J.**, fj. 15-277202, nov. 2015.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 1, p. 108-117, jan. 2011.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

TOLOMEO, M. et al. TTAS a new stilbene derivative that induces apoptosis in *Leishmania infantum*, **Exp. Parasit.**, v. 133, p. 37-43, 2013.

TUON, F. F.; AMARO NETO, V.; AMATO, V. S. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 158-166, jul. 2008.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.**, v.189, p.162-170, 2012.

VITAGLIONE, P. et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 49, n. 5, p. 495-504, mai. 2005.

VITRAC, X. et al. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. **Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 2219-2233, abr. 2003.

WANG, Y. et al. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **J. Agric. Food Chem.**, v. 30, n. 3, p. 431-435, jan. 2002.

WHANG, Z. et al. Resveratrol possesses protective effects in a pristine-induced lupus mouse model. **Plos one**, v. 9, n. 12, dez. 2014.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO technical report series, n. 949. 2010. Publicado pela World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 05 out. 2015.

WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v.17, p.12771-12791, out. 2012.

WALLE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab. Dispos.**, v. 12, p. 1377-1382, dez. 2004.

YU, C. et al. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. **Pharm. Res.**, v. 19, n.12, p. 1907-1914, dez. 2002.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan. Visceral Leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, supl. 1, S27-S28, abr. 2001.