



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**Estudo *in vitro* da atividade antileishmania e linfoproliferativa do ácido gálico em
combinação com o sulfato de paromomicina**

REBECCA SAYURI BARBOSA HANADA

Manaus – AM
Fevereiro de 2026

REBECCA SAYURI BARBOSA HANADA

Estudo *in vitro* da atividade antileishmania e linfoproliferativa do ácido gálico em combinação com o sulfato de paromomicina

Projeto de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Mestra em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Linha de Pesquisa: Pesquisa clínica e análise de dados em imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos (UFAM)

Coorientadores: Dr. Bruno Bezerra Jensen (INPA)

Dra. Antônia Maria Ramos Franco Pereira (INPA)

Manaus – AM

Fevereiro de 2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- H233e Hanada, Rebecca Sayuri Barbosa
Estudo in vitro da atividade antileishmania e linfoproliferativa do ácido gálico em combinação com o sulfato de paromomicina / Rebecca Sayuri Barbosa Hanada. - 2026.
76 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): José Fernando Marques Barcellos.
Coorientador(a): Bruno Bezerra Jensen.
Coorientador(a): Antonia Maria Ramos Franco Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2026.
1. Leishmaniose cutânea. 2. Terapia combinada. 3. Imunomodulação. 4. Compostos fenólicos. I. Barcellos, José Fernando Marques. II. Jensen, Bruno Bezerra. III. Pereira, Antonia Maria Ramos Franco. IV. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. V. Título
-

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois foi Ele quem me deu forças quando achei que não ia conseguir continuar. Agradeço a Ele por todas as bênçãos que me recaíram durante esse tempo, e por sempre iluminar o meu caminho. Agradeço também a Virgem Maria por sempre interceder por mim, por sempre me proteger e me guardar em seu manto sagrado;

Ao meu orientador, Dr. Fernando Marques, por todo o apoio e parceria durante esses dois anos, o senhor foi essencial no meu desenvolvimento como profissional;

A minha coorientadora, Dr^a Antonia Franco, por ter me acolhido no grupo de pesquisa, por ter sido uma grande mentora e minha chefinha favorita. Obrigada por todos os ensinamentos e conversas, a senhora é muito especial e querida por mim;

Ao meu coorientador, Dr. Bruno Jensen, vulgo meu pai científico, que me acolheu desde a iniciação científica e virou um grande amigo que eu levo para a vida. Obrigada por ter acreditado em mim quando nem eu sabia que eu era capaz, obrigada por nunca ter soltado a minha mão, e obrigada por ter tornado essa experiência da pós-graduação mais “leve”;

A toda a equipe do LABLDC/INPA, a Dr^a Meire, Dr^a Paula, Dr Yury, a dona Ivonei e Ana Cleide (vulgo Naná), obrigada por todo o apoio e acolhimento. Aos meus amigos de pós-graduação, Mayara, Rafaela e Afrânio, vocês foram essenciais nessa trajetória, obrigada pela companhia e cafés compartilhados. As alunas de IC, Juliana, Laís e Sandra, obrigada por serem meu suporte, por me acompanharem e me auxiliarem com todos os experimentos, espero ter contribuído com o aprendizado de vocês;

A minha mãe, Andréa Barbosa, por ter sido meu ponto de apoio em todos os momentos da minha vida. Ela é e sempre será minha melhor companhia, a que me acalenta e que diz que vai ficar tudo bem quando a vida está um caos. Agradeço por todos os momentos de carinho e apoio, das broncas até as risadas incontroláveis... obrigada por ser minha melhor amiga, eu te amo eternamente mamãe;

Ao meu pai, Cicero Hanada (*in memoriam*), por ter sido meu maior incentivador nos estudos, por nunca ter descreditado do meu potencial e por ter sido o melhor pai do mundo. Queria muito que você estivesse aqui, espero que você esteja orgulhoso e que tenha no mínimo soltado fogos aí do céu. Eu te amo eternamente pai, você sempre viverá em minhas memórias;

Ao meu noivo, Guilherme Cavalcante, por toda a paciência e parceria que construímos durante esses anos juntos. Ele sempre me incentivou a seguir meus sonhos e nunca duvidou do meu potencial, foi meu porto seguro quando tudo estava desmoronando, e meu suporte emocional nas crises de ansiedade. Eu te amo do tamanho do universo, obrigada por sempre me escutar e me confortar quando preciso;

Aos meus irmãos, Rodrigo e Sanay, e ao meu sobrinho, Caio, por todo apoio emocional e por sempre serem os primeiros a estarem de pé comemorando todas as minhas conquistas, vocês são essenciais na minha vida;

A minha família, por serem a minha base e meu lugar de conforto favorito. A minha avó Arlete, que comemora sem nem entender ao certo o que é o mestrado, mas fala para todas as amigas dela que a neta dela é mestranda; aos meus tios, Paulo e Maurício, e tias, Adriana e Bruna, que tanto amo como se fossem meus pais; aos meus primos, Amanda, Ana Paula, Maurício Júnior, Maria Fernanda, Maria Eduarda e Matheus, que são meus irmãos de alma e que eu amo de paixão; e ao meu avô Múcio (*in memoriam*), que não presenciou grande parte da minha carreira acadêmica, mas sei que está comemorando muito lá do céu;

Aos meus amigos, Charles, Elvira, Deise e Thaísa, vocês estiveram comigo durante tantos altos e baixos, tantas noites mal dormidas e tantas ligações de horas incontáveis falando sobre como estamos cansados ou com altas demandas. Estivemos juntos na graduação, estamos juntos na pós, e espero levar vocês para sempre na vida;

A todos os meus amigos que me apoiaram durante essa trajetória, mesmo que de longe, o apoio, carinho e compreensão de vocês foi essencial para mim nessa trajetória, eu amo vocês;

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, por todo o apoio e suporte nesses dois anos de mestrado;

A UFAM, por ter sido minha segunda casa desde a graduação até a pós;

A todos que me ajudaram de forma direta e indireta para o desenvolvimento desse projeto, muito obrigada;

Por fim, a Fundação de Amparo em Pesquisas da Amazônia (FAPEAM) pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho;

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada de elevada morbidade ocasionada pela *Leishmania*, cuja evolução depende do equilíbrio da resposta imune inata e adaptativa. Apesar da importância dos linfócitos T CD4⁺ no controle parasitário, o tratamento farmacológico é indispensável, porém limitado devido a toxicidade, efeitos adversos e resistência parasitária. Nesse contexto, terapias combinadas, como a associação do sulfato de paromomicina com compostos naturais bioativos, destacam-se como estratégias terapêuticas promissoras. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antileishmania e a atividade imunomodulatória da combinação entre o ácido gálico (AG), e o sulfato de paromomicina (PAR), frente a *Leishmania guyanensis*. A metodologia incluiu ensaios in vitro para avaliação da atividade inibitória sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. guyanensis*, bem como da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7. Adicionalmente, PBMCs de voluntários saudáveis (n = 13) foram estimuladas com AG, PAR, sua combinação (AG+PAR), Glucantime® (GLU) e fito-hemaglutinina (PHA). Após 72h, analisaram-se a linfoproliferação (BrdU) e a produção de citocinas por citometria de fluxo, com integração dos parâmetros imunológicos por correlação de *Spearman*. Com relação ao resultado, AG apresentou atividade antileishmania em promastigotas, (IC₅₀ de 142,5 - 126,5 µM), enquanto PAR e AG+PAR foram pouco ativos (IC₅₀ >150 µM). AG e PAR não foram citotóxicos (CC₅₀ >150 µM), ao passo que AG+PAR reduziu a viabilidade celular nas concentrações de 150 e 100 µM (CC₅₀ 131,2 – >150 µM). Em macrófagos infectados por amastigotas, AG e AG+PAR demonstraram elevada eficácia (IC₅₀ de 11,4 e 20,5 µM em 48 h, respectivamente), ao passo que PAR manteve baixa atividade (IC₅₀ >150 µM). Na avaliação imunológica, GLU apresentou maior linfoproliferação (61,5%), seguida por GA (46,2%) e por PAR e AG+PAR (30,8%). O AG modulou preferencialmente o eixo TNF/IL-6, o PAR associou-se à IL-10, e a combinação AG+PAR exibiu perfil integrado e balanceado entre citocinas pró e anti-inflamatórias, sem estímulo proliferativo direto, enquanto GLU promoveu ativação ampla. Em conclusão, a associação AG+PAR apresentou sinergismo antileishmania promissora em *L. guyanensis*, e demonstrou um padrão imunomodulatório complementar e balanceado, modulando vias inflamatórias sem induzir proliferação celular, configurando-se como um candidato promissor para o desenvolvimento de um possível novo fármaco, e por fim, adequar o protocolo terapêutico da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; Terapia combinada; Imunomodulação.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a neglected disease with high morbidity caused by *Leishmania*, whose progression depends on the balance between innate and adaptive immune responses. Despite the importance of CD4⁺ T lymphocytes in parasite control, pharmacological treatment is still indispensable, but limited due to toxicity, adverse effects, and parasite resistance. In this context, combination therapies, such as the association of paromomycin sulfate with bioactive natural compounds, stand out as promising therapeutic strategies. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antileishmania and immunomodulatory activity of the combination of gallic acid (GA) and paromomycin sulfate (PAR) against *Leishmania guyanensis*. The methodology included *in vitro* assays to evaluate the inhibitory activity on promastigote and amastigote forms of *L. guyanensis*, as well as cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages. Additionally, PBMCs from healthy volunteers (n = 13) were stimulated with GA, PAR, their combination (GA+PAR), Glucantime[®], and phytohemagglutinin (PHA). After 72 hours, lymphoproliferation (BrdU) and cytokine production were analyzed by flow cytometry, with integration of immunological parameters by Spearman's correlation. Regarding the results, GA showed antileishmania activity in promastigotes (IC₅₀ of 142.5–126.5 µM), while PAR and GA+PAR were not active (IC₅₀ >150 µM). GA and PAR were not cytotoxic (CC₅₀ >150 µM), however GA+PAR reduced cell viability at concentrations of 150 and 100 µM (CC₅₀ 131.2 – >150 µM). In macrophages infected with amastigotes, GA and GA+PAR showed high efficacy (IC₅₀ of 11.4 and 20.5 µM at 48 h, respectively), while PAR remained low in activity (IC₅₀ >150 µM). In the immunological evaluation, GLU showed greater lymphoproliferation (61.5%), followed by GA (46.2%) and PAR and AG+PAR (30.8%). AG preferentially modulated the TNF/IL-6 axis, PAR was associated with IL-10, and the AG+PAR combination exhibited an integrated and balanced profile between pro- and anti-inflammatory cytokines, without direct proliferative stimulation, while GLU promoted broad activation. In conclusion, the AG+PAR combination showed promising antileishmania synergy in *L. guyanensis* and demonstrated a complementary and balanced immunomodulatory pattern, modulating inflammatory pathways without inducing cell proliferation, making it a promising candidate for the development of a possible new drug, and ultimately, to adapt the therapeutic protocol for tegumentary leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; Combination therapy; Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As 21 Doenças Tropicais Negligenciadas	15
Figura 2 - As duas formas evolutivas principais de <i>Leishmania</i>	17
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> no vetor flebotomíneo e no hospedeiro mamífero ...	18
Figura 4 - Resposta imune à infecção por <i>Leishmania</i>	19
Figura 5 - Linha do tempo do tratamento convencional da Leishmaniose Tegumentar	24
Figura 6 - Estrutura química de alguns compostos fenólicos	26
Figura 7- Fluxograma do delineamento experimental do estudo	28

CAPÍTULO

Figura 1 - A, B e C – Viabilidade celular (%) e D, E e F – percentual de macrófagos infectados após tratamento com ácido gálico (GA), paromomicina (PAR) e GA+PAR por 24 h e 48 h.....	46
Figura 2 - Análise morfológica de macrófagos RAW 264.7 infectados por amastigotas de <i>Leishmania guyanensis</i> após diferentes tratamentos	48
Figura 3 - Resposta linfoproliferativa relativa (%) de PBMCs estimuladas com ácido gálico (GA), paromomicina (PAR), associação GA+PAR e droga controle (GLUC).....	49
Figura 4 - Matrizes de correlação de Spearman entre citocinas, proliferação celular e densidade óptica do BrdU nas diferentes condições experimentais	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de casos de doenças negligenciadas no Brasil por região, entre 2010 e 2023.....	16
--	----

CAPÍTULO

Tabela 1- Concentração Inibitória de 50% (IC ₅₀) para as amostras quando avaliadas contra as formas promastigotas de <i>Leishmania guyanensis</i> e Concentração Citotóxica de 50% (CC ₅₀) em macrófagos de linhagem RAW 264.7.....	45
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG – Ácido Gálico

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

DNDi – Drug for Neglected Diseases initiative

DTNs – Doenças Tropicais Negligenciadas

GP63 – Glicoproteína 63

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IC - Concentração inibitória

IFN- γ - Interferon-gama

IL- 12 – Interleucina 12

IL- 5 – Interleucina 5

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

LPG – Lipofosfoglicano

LT - Leishmaniose Tegumentar

MHC-II – Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II

MS – Ministério da Saúde

NETs – Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAHO – Organização Pan-Americana de Saúde

PAR – Sulfato de Paromomicina

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão fosfato-salino

PHA – Fitohemaglutinina

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

RPMI 1640 - Rosewell Park Memorial Institute medium 1640

SC – Sistema Complemento

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFBi – Soro Fetal Bovino inativado

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

CD4⁺ - Marcador de Linfócito T CD4

TA – Temperatura Ambiente

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th1 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 1

Th2 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 2

Th17 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 17

TLR – Receptores do tipo Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral alpha

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Leishmaniose Tegumentar: um desafio entre as Doenças Tropicais Negligenciadas.....	14
2.1.1 Gênero <i>Leishmania</i>	15
2.2 Ciclo de transmissão e Resposta Imune da LT.....	17
2.3 Tratamento Convencional	20
2.4 Alternativa Terapêutica	24
2.4.1 Tratamento Associados	24
2.4.2 Compostos fenólicos.....	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Instituições envolvidas no projeto e delineamento experimental	28
4.2 Obtenção das amostras químicas.....	28
4.3 Manutenção de <i>Leishmania</i>	29
4.4 Determinação da atividade antileishmania e concentração inibitória 50% (IC ₅₀) das amostras químicas	29
4.5 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	29
4.6 Atividade <i>in vitro</i> antileishmania em amastigotas interiorizados em macrófagos	30
4.7 Índice de Seletividade Celular (SI).....	31
4.8 Aspectos éticos.....	31
4.9 Critérios de Elegibilidade	31
4.9.1 Critério de inclusão	31
4.9.2 Critério de exclusão.....	31
4.10 Coleta de amostras de sangue e extração de PBMCs	32
4.11 Ensaio de proliferação	32
4.12 Cálculo da resposta linfoproliferativa relativa e estratégia de normalização	32
4.13 Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas	33
4.14 Dosagem de citocinas.....	34
4.15 Análises Estatísticas	34
5. CAPÍTULO	35
6. PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	63
ANEXO A	63
ANEXO B	64
ANEXO C	75

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, ocasionada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, considerada endêmica em 90 países, presente em quase todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártida. Entre os anos de 2003 e 2023, foram registrados mais de 4,4 milhões de casos no mundo, evidenciando a relevância epidemiológica dessa enfermidade (WHO, 2024; PAHO, 2023). Em razão da sua elevada incidência, associação com condições socioeconômicas desfavoráveis e limitações terapêuticas, as leishmanioses, tanto na forma visceral quanto tegumentar, são classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), afetando principalmente populações vulneráveis, residentes em áreas rurais ou acesso limitado aos serviços de saúde (Meurer; Coimbra, 2022).

A LT é transmitida principalmente pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas do gênero *Lutzomyia*, apresentando um ciclo biológico heteróximo que envolve um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado. O parasita apresenta duas formas evolutivas principais: promastigota, presente no vetor, e amastigota, forma intracelular obrigatória encontrada no hospedeiro vertebrado. No organismo humano, *Leishmania* infecta preferencialmente células fagocíticas do sistema imune, como neutrófilos, mastócitos e, sobretudo, macrófagos, nos quais se multiplica. As manifestações clínicas da LT variam de acordo com a espécie envolvida e com a resposta imunológica do hospedeiro, podendo se expressar como formas cutânea localizada, disseminada ou mucocutânea, frequentemente associadas a lesões crônicas e desfigurantes (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Horta *et al.*, 2020; Rafique *et al.*, 2023).

A resposta imune à infecção por *Leishmania* é multifacetada e envolve mecanismos coordenados da imunidade inata e adaptativa. Inicialmente, células da imunidade inata, como neutrófilos e macrófagos, atuam como primeira linha de defesa, tentando conter a infecção por meio da fagocitose e da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Posteriormente, a resposta adaptativa é modulada principalmente por linfócitos T CD4⁺, sendo a resposta Th1 fundamental para o controle efetivo da infecção, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-2. Em contraste, uma resposta Th2, caracterizada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-5, pode contribuir para a proteção tecidual, porém compromete a eliminação efetiva do patógeno. Assim, o equilíbrio entre esses perfis imunológicos é determinante para a resolução espontânea da doença, quando esse equilíbrio não é alcançado, torna-se necessária a intervenção farmacoterapêutica (Reyaz *et al.*,

2023; Singh *et al.*, 2023).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda para o tratamento da LT o uso de fármacos como o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), anfotericina B (Anfotericin B[®]), isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) e miltefosina (Impavido[®]). Entretanto, esses medicamentos apresentam importantes limitações clínicas, incluindo efeitos adversos graves, além de restrições de uso devido aos altos níveis de citotoxicidade que podem causar, como nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, impactando significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Ademais, estudos recentes reportaram um aumento na resistência parasitária ao uso desses medicamentos, reforçando a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras (Akbari; Oryan; Hatam, 2017; Brasil, 2017; Brasil, 2018; Tiwari *et al.*, 2018; Roat *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a terapia combinada surge como uma alternativa promissora, baseada na associação de duas ou mais substâncias com mecanismos de ação distintos e potencial efeito sinérgico. Essa abordagem permite uma menor dosagem dos fármacos, diminui o tempo de tratamento, minimiza os efeitos tóxicos e reduz a resistência parasitária. Estudos prévios demonstraram resultados positivos com associações terapêuticas, como o uso concomitante de imiquimode (Ixium[®]) e Glucantime[®], promovendo melhor cicatrização das lesões e maior eficácia clínica com menor exposição aos medicamentos convencionais (Miranda-Verasteg *et al.*, 2009; sun; Sanderson; Zheng, 2016; Sundar; Chakravarty, 2018).

O sulfato de paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, tem sido amplamente investigado como candidatos para terapia combinada no tratamento da LT, estando disponível em formulações tópicas e sistêmicas (Matos *et al.*, 2020). Segundo a literatura, seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese proteica do protozoário, por meio da ligação à subunidade ribossômica 30S, levando à formação de complexos ribossômicos defeituosos e, conseqüentemente, à morte celular (Kip *et. al* 2018; Santiago *et. al*, 2023).

Paralelamente, o uso de produtos naturais tem se destacado como uma estratégia complementar na busca por novos esquemas terapêuticos. Dentre as diversas classes fitoquímicas, os compostos fenólicos apresentam amplo espectro de atividades biológicas. O ácido gálico, um composto fenólico amplamente distribuído em espécies vegetais, destaca-se por suas propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante. Além disso, estudos demonstram seu potencial imunomodulatório, especialmente pela estimulação da produção de óxido nítrico em macrófagos, contribuindo para a redução da carga parasitária

e para a modulação da resposta imunológica na LT (Bai *et al.*, 2021; Keshav; Goyal; Kaur, 2021; Pratyusha, 2022).

A investigação da interação entre o ácido gálico e o sulfato de paromomicina justifica-se pela possibilidade de efeitos sinérgicos entre essas moléculas, combinando a ação antiparasitária direta da paromomicina com o potencial imunomodulatório do ácido gálico. Essa associação pode resultar em maior eficácia terapêutica, redução da toxicidade, diminuição do tempo de tratamento e mitigação do desenvolvimento de resistência, contribuindo para o aprimoramento das estratégias terapêuticas atualmente disponíveis para a LT.

Portanto, o objetivo deste estudo é investigar a resposta do composto fenólico ácido gálico combinado com o sulfato de paromomicina, por meio de ensaios *in vitro* contra o parasita *Leishmania (Viannia) guyanensis*, avaliando o perfil de citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 e o efeito da resposta imunológica em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), visando identificar uma alternativa terapêutica potencialmente mais segura, eficaz e acessível para o tratamento da leishmaniose tegumentar, com aplicabilidade futura no desenvolvimento de esquemas terapêuticos combinados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmaniose Tegumentar: um desafio entre as Doenças Tropicais Negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças infecciosas que representam um crescente desafio para a saúde pública, afetando 848 milhões de pessoas em 2023. Essas doenças são predominantes em países em desenvolvimento, com clima tropical ou subtropical, onde diversos fatores ambientais e socioeconômicos contribuem para a sua disseminação. A maioria das DTNs possuem ciclos de vida complexos, sendo diretamente afetadas por alterações em seu habitat natural, um processo que foi intensificado desde a Revolução Industrial, no século XVIII, com a rápida industrialização que desencadeou um processo de urbanização desenfreada e aumentou o risco de disseminação e prevalência dessas doenças (Manderson *et al.*, 2009; Jayashankar *et al.*, 2024; WHO, 2024).

Essas mudanças impactam os padrões climáticos, afetando a temperatura, a umidade, a pluviosidade e outros fatores que podem resultar em um maior risco de disseminação dessas doenças. A população mais afetada pelas consequências dessas mudanças ecológicas é considerada socialmente vulnerável, com acesso limitado a água potável, saneamento básico e assistência médica, o que dificulta a prevenção, o diagnóstico e o tratamento adequado dessas enfermidades (Dhar; Kumar; Karmakar 2022; Oyeyemi *et al.*, 2024).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o grupo das DTNs é composto por 21 enfermidades (Figura 1), causadas por diferentes patógenos, como vírus, bactérias, protozoários, fungos e toxinas. Embora sejam consideradas doenças tratáveis e controláveis, existem poucas políticas públicas para a prevenção dessas doenças, além da falta de interesse das indústrias farmacêuticas em subsidiarem pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos destinados às DTNs (Yang; Zhou, 2022; WHO, 2024).

Como uma forma de responder à falta de incentivos para o desenvolvimento de medicamentos direcionados a pacientes negligenciados, instituições internacionais se uniram e, em 2003, fundaram a iniciativa Medicamentosa para Doenças Negligenciadas (Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi). Essa organização foi criada com o propósito de dar visibilidade às enfermidades que não possuem interesse comercial devido à falta de atratividade econômica, enfatizando ainda a necessidade de colaboração com os setores público e privado para reunir recursos e experiências que auxiliem no desenvolvimento de novos tratamentos seguros e eficazes para as DTNs (Burrows *et al.*, 2023; DNDi, 2024).

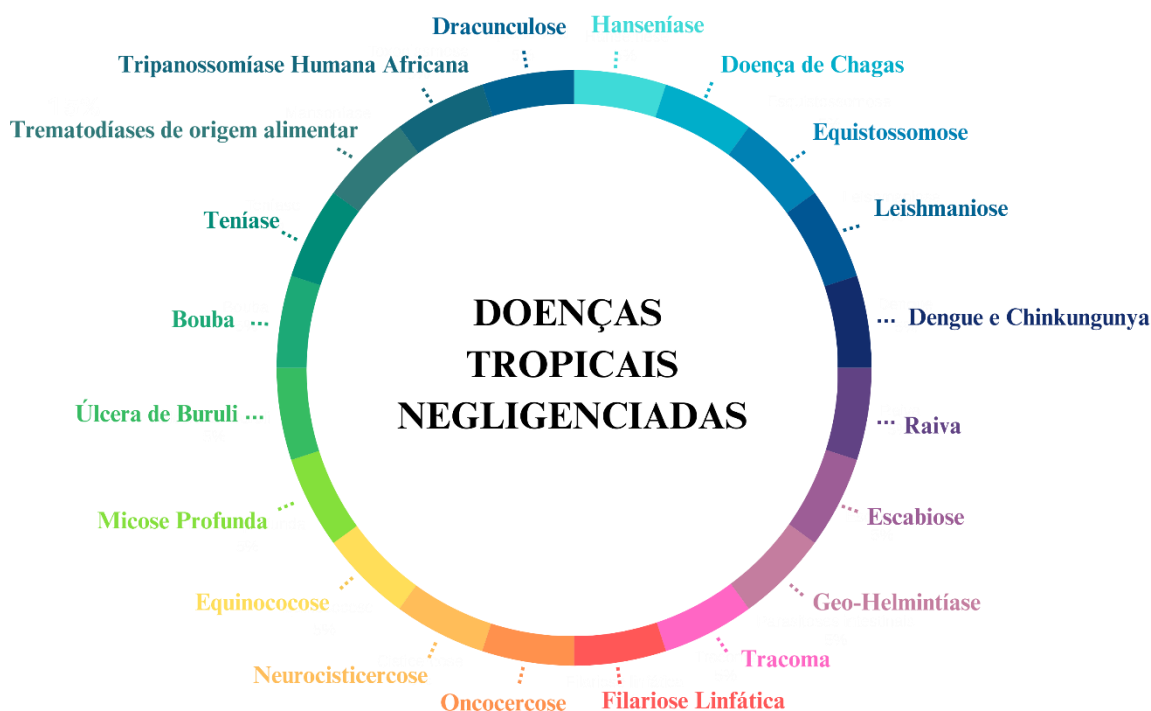


Figura 1. As 21 Doenças Tropicais Negligenciadas
Fonte: WHO, 2025

Com os incentivos da DNDi e de outras organizações, a OMS estabeleceu estratégias integradas a partir de metas por meio do plano de indicadores do Roteiro 2021-2030, visando o controle, a erradicação e a eliminação de pelo menos 60% das DTNs. Entretanto, apesar de um pequeno progresso apresentado no relatório de 2024, ainda existem desafios para a efetividade dessas metas, como a dificuldade de implementação das estratégias criadas, devido à carência de políticas públicas (Dwivedi *et al.*, 2024; Jayashankar *et al.*, 2024).

No Brasil, o levantamento feito pelo Ministério da Saúde nos anos de 2016 a 2020 demonstra um alto número de casos de DTNs, com destaque a acidentes ofídicos, hanseníase, esquistossomose, leishmaniose tegumentar, tracoma e leishmaniose visceral (Tabela 1). No entanto, é importante ressaltar que, por se tratar de doenças que acometem populações em vulnerabilidade social, há a subnotificação de casos devido à falta de sistemas de vigilância adequados e acesso limitado a unidades de saúde, o que impede a compreensão real dos impactos dessas DTNs no país (Schröder *et al.*, 2023).

Uma das principais DTNs é a Leishmaniose Tegumentar (LT), visto que o Brasil concentra 85% do número de casos de LT no mundo, com 263.793 casos entre 2010 a 2023 (tabela 1). A partir dos dados coletados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), é possível observar um destaque a região norte, sendo a área mais afetada com por essa doença, concentrando 44,5% dos casos confirmados (Al-Ma'amouri *et al.*, 2023;

Rafique *et al.*, 2023; WHO, 2024; OPAS 2024).

Tabela 1. Número de casos de doenças negligenciadas no Brasil por região, entre 2010 e 2023.

<i>Macrorregião</i>	<i>Acidentes Ofídicos</i>	<i>Dengue</i>	<i>Esquistossomose</i>	<i>Hanseníase</i>	<i>Leishmaniose Tegumentar</i>	<i>Leishmaniose Visceral</i>
<i>Norte</i>	236.925	654.887	744	91.658	117.273	7.791
<i>Nordeste</i>	1.012.476	2.486.420	14.870	202.566	74.714	23.811
<i>Sudeste</i>	1.141.281	7.110.635	77.543	72.132	28.838	8.202
<i>Sul</i>	381.265	1.388.283	660	16.677	4.575	155
<i>Centro-Oeste</i>	181.395	2.433.117	735	96.604	38.393	3.748
<i>Total</i>	2.953.342	14.073.342	94.552	479.637	263.793	43.707

2.1.1 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* foi descrito pela primeira vez em 1903 por Leishman e Donovan, englobando um grupo diversificado de protozoários responsáveis pelas leishmanioses, com pelo menos 20 espécies que podem infectar humanos (Santarém; Cardoso; Cordeiro-da-Silva, 2023). De acordo com Lainson (2010), a posição sistemática do parasita é a seguinte:

Reino: Protozoa (Goldfuss, 1818)

Filo: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1998)

Classe: Kinetoplastea (Honigberg, 1963)

Ordem: Trypanosomatida (Kent, 1880)

Família: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgênero: *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987)

Esse parasita é considerado heteróximo, necessitando de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida, e apresenta uma ampla diversidade genética entre as diferentes espécies, com duas formas morfofisiológicas principais: a forma promastigota, caracterizada por uma estrutura alongada e flagelada, encontrada no trato digestivo do inseto vetor; e a forma amastigota, com forma arredondada sem a presença de flagelo, encontrada no interior de células fagocíticas do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado (Akhoundi *et al.*, 2016; Santarém; Cardoso; Cordeiro-da-Silva, 2023).

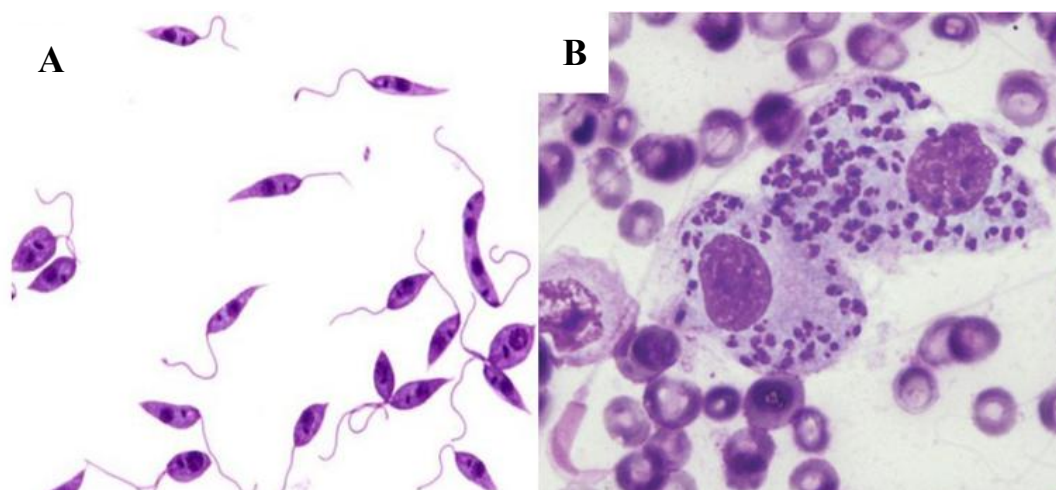


Figura 2. As duas formas evolutivas principais de *Leishmania*: a) promastigota e b) amastigota.
Fonte: Martins, 2016

Devido a rápida adaptação evolutiva desses protozoários a diferentes hospedeiros e ambientes, associada à grande biodiversidade do Brasil, é possível encontrar sete espécies causadoras da leishmaniose tegumentar em humanos, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três espécies de maior circulação a nível nacional são a *Leishmania (Viannia) guyanensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Além delas, na região norte e nordeste é possível ainda encontrar as espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*; *Leishmania (Viannia) naiffi*; *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (das Chagas *et al.*, 2022; Amorim *et al.*, 2023).

Embora o estado do Amazonas abrigue uma complexa biodiversidade, fatores climáticos afetam a população de vetores e, consequentemente, o padrão e o nível de transmissão de patógenos e propagação de doenças. Devido a estes fatores, encontram-se quatro espécies atuantes na região, sendo elas *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. naiffi* e *L. guyanensis*, sendo a última de maior prevalência (Chagas *et al.*, 2022).

2.2 Ciclo de transmissão e Resposta Imune da LT

A leishmaniose tegumentar é transmitida de forma vetorial por flebotomíneos fêmeas infectadas do gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecidos como mosquito-palha e birigui. O ciclo biológico desse parasita é heteróximo, necessitando de um hospedeiro intermediário (vetor) e do hospedeiro definitivo (vertebrado).

Como observado na Figura 3, o flebotomíneo adquire a forma amastigota a partir do repasto sanguíneo de um hospedeiro infectado, passando para o intestino médio, onde as formas amastigotas transformam-se até posteriormente se tornarem promastigotas metacíclicas

infectantes, que são transmitidas durante um novo repasto sanguíneo. No hospedeiro mamífero, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos, onde se diferenciam em formas amastigotas, multiplicando-se por divisão binária dentro de macrófagos, rompendo-os e infectando novas células, perpetuando o ciclo da infecção (Yasmin *et al.*, 2022).

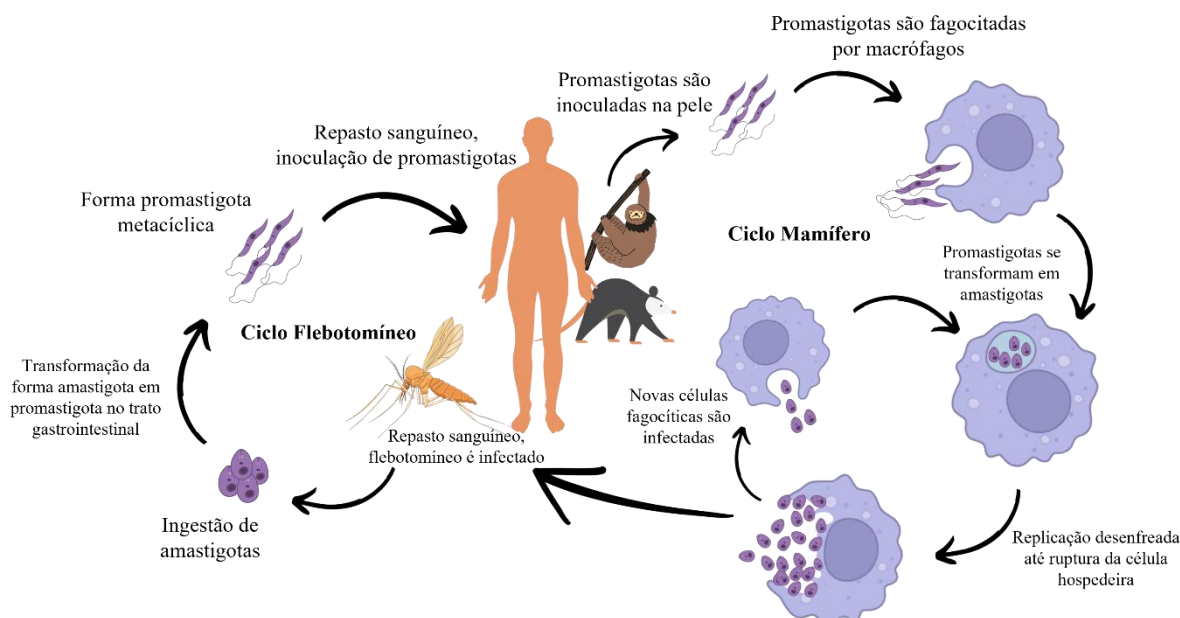


Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania* no vetor flebotomíneo e no hospedeiro mamífero (Fonte: Adaptado de Rafique *et al.*, 2023).

Ao realizar o repasto sanguíneo, esse inseto causa uma microlesão na pele e inocula as formas promastigotas, que interagem com componentes do sangue, recrutando o Sistema Complemento (SC) e ativando as vias clássica, alternativa e de lectinas. Apesar do SC conseguir opsonizar grande parte dessas promastigotas, o parasita possui mecanismos de escape mediados pela glicoproteína 63 (GP63) e pelos lipofosfoglicanos (LPG) presentes em sua membrana, que possuem afinidade por C3, inativando iC3b, e consequentemente bloqueando a montagem do complexo de ataque a membrana, inibindo a eliminação desses parasitas (Demarta-Gatsi; Mécheri, 2021; Serrano-Coll *et al.*, 2021)

As promastigotas sobreviventes secretam quimiocinas que atraem células fagocíticas, sendo os neutrófilos os primeiros a migrarem ao local da infecção. Esses neutrófilos reconhecem os patógenos através de Receptores Tipo Toll (TLR), desencadeando a ativação de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), e a produção das armadilhas extracelulares (NETs). Entretanto, o parasita desenvolveu mecanismos de evasão celular que inibem as ações leishmanicidas, aumentando o estresse oxidativo e atrasando a apoptose, usando-os efetivamente como um “cavalo de Tróia”, atraindo macrófagos ativados, que fagocitam os neutrófilos infectados e servem de reservatório para a proliferação parasitária

(Passelli; Billion; Tacchini-Cottier, 2021; D'Alessandro *et al.*, 2021; Costa-da-Silva *et al.*, 2022).

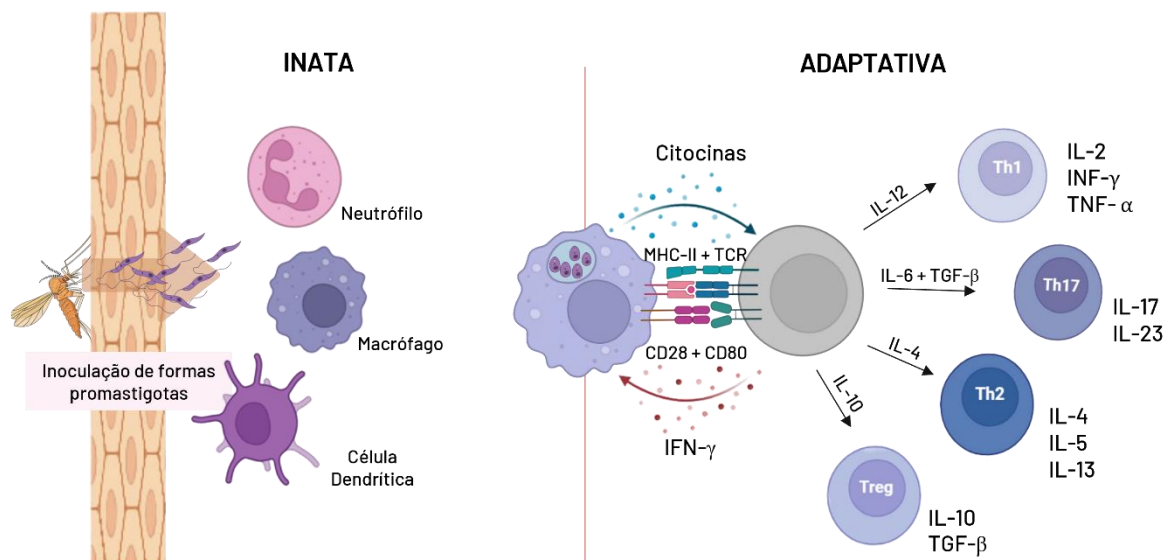


Figura 4. Resposta imune à infecção por *Leishmania*: Após a inoculação de formas promastigotas pelo flebotômio, os parasitas são fagocitados por células do sistema imune inato, onde se diferenciam em amastigotas. A resposta imune adaptativa subsequente, mediada por linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2 e Th17), influencia o controle da infecção, a persistência parasitária e os processos inflamatórios. (Fonte: Adaptado de Gabriel *et al.*, 2019).

Além disso, os macrófagos também são recrutados para o sítio de infecção, onde fagocitam as formas promastigotas, que são mantidas no fagolisossoma, ativando a produção de NO e ROS. Contudo, essas células desempenham um papel duplo na infecção por *Leishmania*, pois os parasitas conseguem escapar das ações leishmanicidas e inibir a produção de NO, transformando os macrófagos em reservatórios para sua proliferação. Durante esse processo, as promastigotas internalizam seu flagelo, adquirem uma morfologia arredondada e se reproduzem de forma não binária, o que leva a uma reprodução descontrolada, resultando na lise celular e liberando amastigotas no meio extracelular, para serem fagocitadas por novos macrófagos, perpetuando a infecção (Costa-da-Silva *et al.*, 2022; Nandan; Brar; Reiner, 2024).

Além dos macrófagos, outras células apresentadoras de antígenos (APCs) desempenham um papel fundamental na resposta à infecção, atuando como uma conexão entre a imunidade inata e adaptativa. Após reconhecerem os antígenos de *Leishmania*, as APCs migram para os linfonodos, onde interagem com células T naïve por meio do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), ocorrendo a liberação de citocinas que influenciam na diferenciação das células T CD4⁺, promovendo diferentes perfis de resposta imunológica: pró-inflamatória (IL-12), anti-inflamatória (IL-4) ou regulatória (IL-17). Dessa forma, a

ativação dessas vias pode direcionar a resposta imune para um perfil do tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2) ou tipo 17 (Th17), impactando o desfecho da infecção (Scott; Novais, 2016; Yasmin *et al.*, 2022).

A diferenciação da resposta imunológica varia conforme a espécie de *Leishmania* infectante, podendo resultar em maior suscetibilidade ou resistência à infecção, o que influencia diretamente na manifestação da forma clínica da doença. Respostas ligadas a Th1 tendem a ter um perfil pró-inflamatório, liberando citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12, que desempenham um papel fundamental no controle da infecção, normalmente associada a forma clínica da leishmaniose localizada, ocasionada por espécies como *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Scott & Novais, 2016; Saha & Silvestre, 2021).

Por outro lado, as respostas imunológicas do tipo Th2 possuem um perfil anti-inflamatório, com a produção de citocinas como IL-4 e IL-5, desempenhando um papel duplo na infecção, visto que, enquanto protegem contra danos teciduais, também podem interferir na eliminação parasitária, aumentando a suscetibilidade à infecção e favorecendo a progressão da doença, normalmente associada a forma clínica da leishmaniose cutânea difusa, ocasionada raramente por *L. amazonensis* (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016; Scott & Novais, 2016; Saha & Silvestre, 2021).

No entanto, a modulação da resposta Th2 é fundamental para manter o equilíbrio com a resposta Th1, visto que quando há uma hipersensibilidade tardia a essa resposta, os níveis de citotoxicidade aumentam devido à alta resposta pró-inflamatória, resultando em danos teciduais graves, estando associada a forma clínica da leishmaniose disseminada, podendo ainda haver o surgimento da leishmaniose mucocutânea, ocasionada por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016; Chauhan *et al.*, 2022).

Quanto a resposta Th17, caracterizada pela produção de IL-17, desempenha um papel crucial na promoção da inflamação e no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, promovendo uma resposta pró-inflamatória. No entanto, essa resposta deve ser equilibrada com as células T reguladoras (T reg), que liberam a citocina IL-10, com ação anti-inflamatória, tendo como principal função a homeostase imune e a prevenção da inflamação excessiva (Divenuto *et al.*, 2023; Morales-Primo *et al.*, 2024).

2.3 Tratamento Convencional

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza um protocolo terapêutico para o tratamento da LT, com a escolha do esquema sendo determinada pela região geográfica da infecção,

considerando a espécie infectante, a resposta imunológica do paciente e a manifestação clínica apresentada (Hendrickx *et al.*, 2018; Nieva *et al.*, 2021; Wijnant *et al.*, 2022, Sundar *et al.*, 2024).

Em 2017, o Ministério da Saúde criou o “Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar”, que indicava no protocolo terapêutico três medicamentos principais: o antimoniatto de meglumina (Glucantime®); desoxicolato de anfotericina b (Anforicin B®); e o isetionato de pentamidina (Pentacarinat®). Entretanto, recentemente houve uma readequação desse esquema pela Portaria nº 60 de 31 de outubro de 2018, a qual implementa a miltefosina (Impavido®) como medicamento de caráter emergencial contra LT, substituindo o uso do antimoniatto de meglumina, que teve o seu registro cancelado definitivamente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com a Resolução nº 11, de 2 de janeiro de 2025 (Brasil, 2017; Roatt *et al.*, 2020; Brasil 2018; Santiago; da Rocha Pita; Guimarães, 2021; Brasil 2025).

Os antimoniais foram introduzidos no tratamento da leishmaniose no ano de 1912, inicialmente com o tártaro emético, um antimônio trivalente Sb(III) que, apesar de ter sido eficaz na cicatrização das lesões, apresentava altos níveis de toxicidade. Em 1922, o primeiro antimônio pentavalente foi sintetizado, sendo considerado mais seguro para o paciente e com um menor tempo de tratamento, o que despertou a atenção das indústrias farmacêuticas (Azevedo Cardoso *et al.*, 2014; Júnior, 2024).

Com isso, no ano de 1945, surgiu os medicamentos Pentostan®/Glucantime®, cujo princípio ativo é o antimoniatto de meglumina. Este é caracterizado como um pró-fármaco, ou seja, quando está na sua forma pentavalente [Sb(v)] é uma substância inativa que, após passar pelo processo de redução pelo organismo, é transformada na forma trivalente [Sb(III)], tornando-se ativa. Bharadava *et al.* (2024) mostrou em seu estudo o mecanismo de ação do antimoniatto de meglumina, o qual inibe a enzima DNA topoisomerase tipo I e a beta-oxidação de ácidos graxos, levando a morte celular por apoptose (Lima *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2014).

Embora tenha sido a terapia de primeira escolha contra a LT por décadas, o tratamento com Glucantime® apresenta limitações significativas, exigindo aplicações diárias por três meses, podendo ser administrado por via endovenosa, intramuscular ou intralesional. Além disso, é um medicamento que possui diversos efeitos adversos e colaterais, podendo ocasionar danos no DNA, causando estresse oxidativo, assim como altos níveis de toxicidade após o processo de redução de Sb(v) para Sb(III), sendo contraindicado para pacientes com hepatopatias, nefropatias e cardiopatias. Estudos recentes demonstraram ainda resistência parasitária com a utilização do Glucantime® em diversas espécies de *Leishmania*, contribuindo

para falhas terapêuticas (Lima *et al.*, 2010; Mohammadzadeh; Behnaz; Golshan, 2013; Siqueira, 2014; Moreira *et al.*, 2017).

Outro medicamento utilizado no tratamento da LT é o isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]), pertencente ao grupo das diamidinas aromáticas. Esse antimicrobiano foi inicialmente sintetizado em 1937, com propriedades antifúngicas e antiparasitárias, sendo reposicionado para o tratamento da leishmaniose em 1952. Embora o mecanismo de ação desse medicamento não seja completamente elucidado e varie conforme o microrganismo, a teoria mais aceita sugere que ela atua por meio da inibição da topoisomerase mitocondrial, interferindo na transcrição e replicação do DNA do parasita, além de potencialmente modificar a sua estrutura mitocondrial (Assan *et al.*, 1995; Piccica *et al.*, 2021).

A administração do Pentacarinat[®] pode ser feita por via intramuscular ou endovenosa, sendo muitas vezes indicada a internação do paciente para monitoramento farmacoterapêutico, com a observação semanal de parâmetros bioquímicos e da evolução clínica. Apesar de ter sua alta taxa de cura, é uma substância que possui alta toxicidade já descrita na literatura, podendo interferir no metabolismo da glicose e causar um efeito diabetogênico, além de possuir diversas contraindicações (Assan *et al.*, 1995; Van Der Meide *et al.*, 2008).

Como parte da segunda linha de tratamento, o desoxicolato de anfotericina B (AmB[®]), desenvolvido em 1953, é um antifúngico da classe dos polienos, utilizado há sete décadas como tratamento de referência contra diversas infecções fúngicas. Considerada uma molécula anfipática, ou seja, composta por uma região hidrofílica e outra região hidrofóbica, conferindo uma baixa solubilidade. Sua ação antileishmania baseia-se na ligação ao ergosterol presente nas membranas do parasita, formando poros e alterando a permeabilidade da membrana, causando o extravasamento do conteúdo celular e resultando na morte celular (Vaghela *et al.*, 2024).

A administração da AmB[®] é realizada por via endovenosa e é utilizada para o tratamento das manifestações clínicas de forma cutânea e mucosa. Um dos problemas relacionados à anfotericina B é seus efeitos adversos e seu nível de toxicidade, que pode comprometer as funções renais e hepáticas do paciente. Além disso, o alto custo, a administração parenteral e a duração do tratamento são fatores que podem desencorajar o seguimento terapêutico, contribuindo para falhas no tratamento (Dash; Benival; Jindal, 2024; Akinosoglou *et al.*, 2024).

Com o objetivo de diminuir a toxicidade relacionada ao desoxicolato de anfotericina B, foi desenvolvida a anfotericina B lipossomal (AmBisome[®]), na qual a anfotericina B está encapsulada em vesículas lipossomais, o que melhora a estabilidade da molécula e promove uma maior permeabilidade de membrana. O mecanismo de ação dos lipossomas consiste na fixação ao ergosterol, enquanto a anfotericina B é liberada para formar os poros e causar

extravasamento do conteúdo celular. Apesar de todos os benefícios dessa terapia, o AmBisome® é considerado um medicamento de alto custo, variando entre R\$24.752,00 e R\$28.285,20, além da necessidade de administração parenteral, o que limita a sua acessibilidade (Frézard *et al.*, 2021; Perea, 2021; Brüggemann; Jensen; Lass-Flörl, 2022).

Implementada recentemente no esquema terapêutico da LT no Brasil, a miltefosina (Impavido®) é um antineoplásico cuja ação antileishmania foi descoberta nos anos 1980. Em 2011, foi incluída na lista de medicamentos essenciais da OMS com ação antileishmania, sendo o primeiro e único medicamento oral aprovado para o tratamento da LT. Em 2018, foi aprovado a Portaria nº 60 de 31 de outubro de 2018 pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC), aprovou a incorporação da miltefosina como tratamento de primeira linha da leishmaniose tegumentar no Sistema Único de Saúde – SUS (Monge-Maillo; López-Vélez, 2015; Brasil, 2018; Mohammad *et al.*, 2022; Astman *et al.*, 2024).

Estudos demonstraram que a miltefosina é mais eficaz em comparação ao antimoniato de meglumina, além de apresentar menor toxicidade devido à sua ampla distribuição e meia-vida de eliminação prolongada. O mecanismo de ação desse medicamento envolve a inibição da biossíntese de fosfolípidos e esteróis na membrana celular do parasita, interferindo na sinalização e na permeabilidade da membrana, causando morte celular por apoptose. Apesar dos benefícios, este medicamento está associado a efeitos adversos, como alterações gastrointestinais e hepatotoxicidade. Além disso, é uma substância teratogênica, com risco potencial de causar danos e morte fetal, sendo recomendado o uso de métodos contraceptivos por mulheres em idade reprodutiva durante o tratamento e por cinco meses após a terapia. Ademais, é contraindicado para crianças menores de 12 anos (Barratt; Saint-Pierre-Chazalet; Loiseau, 2009; Astman *et al.*, 2024).

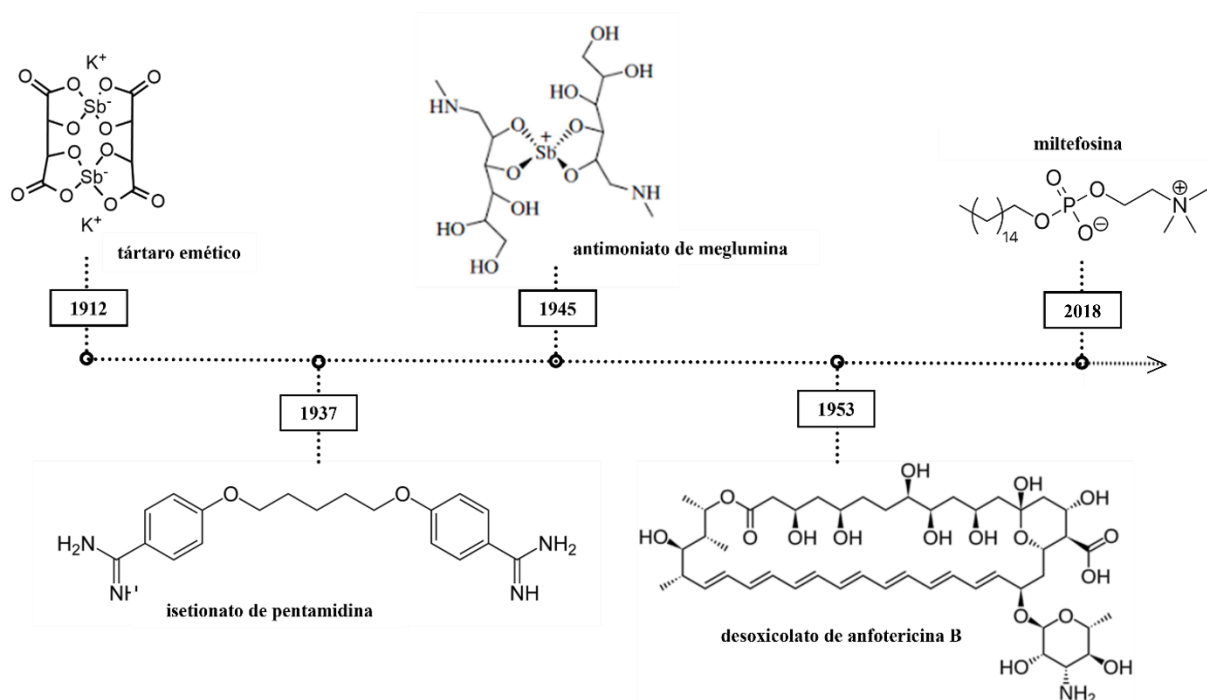


Figura 5. Linha do tempo do tratamento convencional da Leishmaniose Tegumentar no Brasil.

Fonte: Brasil, 2017; Brasil, 2018.

No entanto, apesar da disponibilidade desses medicamentos, diversos desafios ainda limitam a efetividade desses tratamentos, como as vias de administração invasivas, os efeitos tóxicos, a falha terapêutica e, além disso, os relatos recentes de resistência parasitária. Por isso, há a necessidade de investigar novas substâncias que possuam potencial bioativo antiparasitário, visando ajustar o protocolo terapêutico para um tratamento menos nocivo. Além disso, alternativas como o uso de combinações de medicamentos existentes podem retardar a resistência parasitária e aumentar a eficácia do tratamento (Pal *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2024).

2.4 Alternativa terapêutica

2.4.1 Terapia combinada

A terapia combinada é uma técnica utilizada como alternativa ao tratamento monoterapêutico, envolvendo a administração simultânea de dois ou mais medicamentos com mecanismos de ação diferentes, de modo que o efeito combinado dos medicamentos ultrapasse a soma dos seus efeitos individuais. Essa abordagem permite a redução da dosagem convencional, com o objetivo de minimizar os efeitos tóxicos, aumentar a eficácia, reduzir o tempo de tratamento e, ainda, auxiliar na diminuição da resistência parasitária e falha terapêutica (Calzetta *et al.*, 2024).

Estudos recentes relataram um aumento na resistência parasitária aos fármacos convencionais utilizados no tratamento da LT, além de uma alta taxa de falha terapêutica. Como incentivo aprovado pelo Ministério da Saúde afim de diminuir a falha terapêutica com o Glucantime[®], está a sua associação com a pentoxifilina, um vasodilatador periférico que age como imunomodulador no tratamento da LT (Aït-Oudhia *et al.*, 2011; Brasil, 2017; Brustolin *et al.*, 2021). Sadeghian & Nilforoushzadeh (2006), demonstraram em seu estudo que a combinação dessas duas drogas levou a uma melhora completa em 81,3% dos pacientes em comparação com 51,6% dos pacientes tratados apenas com o Glucantime[®] em monoterapia, aumentando a eficácia do tratamento e oferecendo maior segurança para os pacientes.

Outro exemplo de combinação terapêutica foi o estudo de Morais-Teixeira *et al.* (2015), que investigou a eficácia da combinação de esquemas com aplicação diária de paromomicina tópica, um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, já utilizado para o tratamento de LT, e baixas doses de antimoniato de meglumina via intramuscular e miltefosina via oral. Os resultados mostraram que as combinações realizadas foram mais eficazes na redução das lesões e diminuição da carga parasitária, quando comparadas ao regime monoterapêutico, evidenciando os benefícios da associação terapêutica.

2.4.2 Compostos fenólicos

Uma alternativa para a busca de novas moléculas bioativas que possam ser utilizadas na adequação de protocolos terapêuticos é a partir das plantas medicinais, que apresentam uma ampla diversidade de compostos com potencial farmacológico, como os metabólitos secundários. Esses compostos bioativos são subdivididos em classes fitoquímicas de acordo com suas variações estruturais, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, curcuminoides, ligninas e outros. Tais metabólitos secundários desempenham um papel importante como reguladores do desenvolvimento, crescimento e defesa contra patógenos e herbivoria em diversas plantas, vegetais, sementes e frutas, como é o caso da família Fabaceae, rica em ácidos fenólicos (Corona-Espana *et al.*, 2024; Altuntas & Korukluoglu, 2024).

Em destaque nas classes fitoquímicas temos os compostos fenólicos são metabólitos secundários, caracterizados por constituírem um grupo diversificado de compostos orgânicos que possuem um ou mais anéis fenólicos em sua estrutura química. Além disso, esses compostos são conhecidos por possuírem uma ampla variedade de propriedades bioativas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, cicatrizante, entre outras. Estudos recentes demonstraram que alguns compostos fenólicos possuem potencial antileishmania,

como é o caso da quercetina, que apresenta atividade antiparasitária ao estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos macrófagos (Lone *et al.*, 2024; Silva *et al.* 2024).

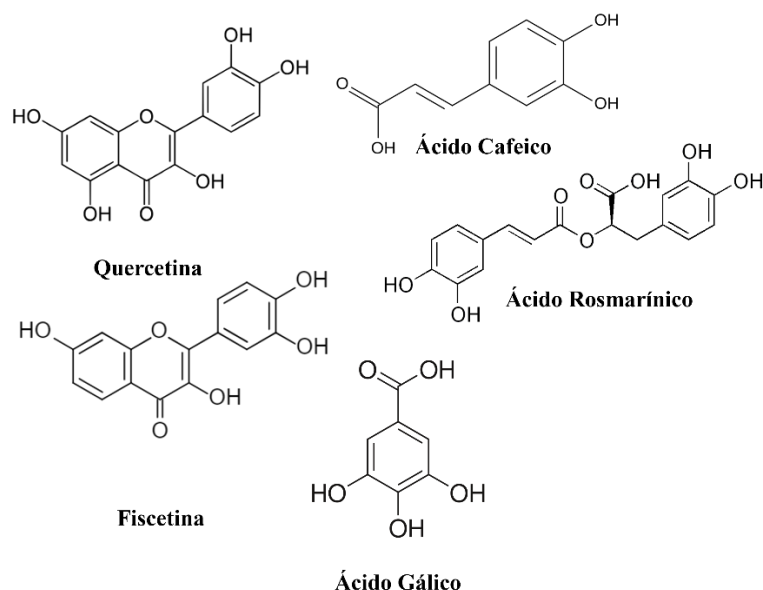


Figura 6. Estrutura química de alguns compostos fenólicos. Fonte: ChemSketch.

Outro composto é a fisetina, um flavonoide que demonstrou diminuir a ação da enzima arginase em algumas espécies de *Leishmania*, fazendo com que o parasita não consiga lidar com o estresse oxidativo. O estudo de Come *et al.* (2022), realizou experimentos *in silico* e *in vitro* com análogos do ácido cafeico e do ácido rosmarínico com alvo principal na enzima arginase de *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que houve inibição da arginase, o que reduziu a proliferação do parasita e melhorou os mecanismos de defesa do hospedeiro (Carter *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2024).

Sabe-se que o ácido gálico, devido ao seu baixo peso molecular e excelente atividade anti-inflamatória e antioxidante, também inibe esse alvo enzimático e, por isso, vem ganhando destaque quanto ao seu amplo potencial farmacológico. Estudos com *L. major* demonstram que esse composto fenólico induz a ativação de macrófagos, aumentando sua capacidade fagocítica, o volume lisossomal, a síntese de óxido nítrico e a liberação de cálcio citoplasmático, modulando uma resposta imunológica favorável à eliminação parasitária. Diante desse contexto, a avaliação desse composto fenólico frente a *L. guyanensis* torna-se de grande interesse, considerando sua atividade imunomodulatória, que possivelmente poderá modular uma resposta mais eficaz contra esses parasitas (Alves *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade antileishmania frente a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, o perfil citotóxico e o potencial imunomodulatório do ácido gálico associado ao sulfato de paromomicina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito sinérgico do composto fenólico ácido gálico e sulfato de paromomicina quanto à atividade contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania (Viannia) guyanensis*;
- Determinar a citotoxicidade do ácido gálico, do sulfato de paromomicina e da sua associação em macrófagos de linhagem RAW 264.7, visando o cálculo do índice de seletividade;
- Investigar o perfil imunomodulatório do ácido gálico e do sulfato de paromomicina, isolados e combinados, por meio de avaliação da resposta linfoproliferativa de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de voluntários humanos saudáveis;
- Quantificar a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no sobrenadante das culturas de PBMCs tratadas, a fim de compreender se estes fármacos *in vitro* estão ativando uma resposta imunológica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instituições envolvidas e delineamento experimental

Este projeto consiste em uma pesquisa experimental na área de bioprospecção de fármacos para o tratamento para a Leishmaniose tegumentar, uma das Doenças Tropicais Negligenciadas, com foco na atividade antileishmania, na citotoxicidade e na resposta linfoproliferativa de células mononucleares de sangue periférico de voluntários saudáveis, sendo desenvolvido nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, coordenado pela Dra. Antonia Maria Ramos Franco;
- Laboratório de Histologia Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, coordenado pelo Dr. José Fernando Marques Barcellos;
- Labmaster Medical Center, coordenado pelo Dr. Thiago de Jesus Bacha;
- Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), responsável pela colaboração pelo Dr. Allyson Guimarães Costa.

A seguir, é descrito o delineamento metodológico conforme o fluxograma na figura 7.

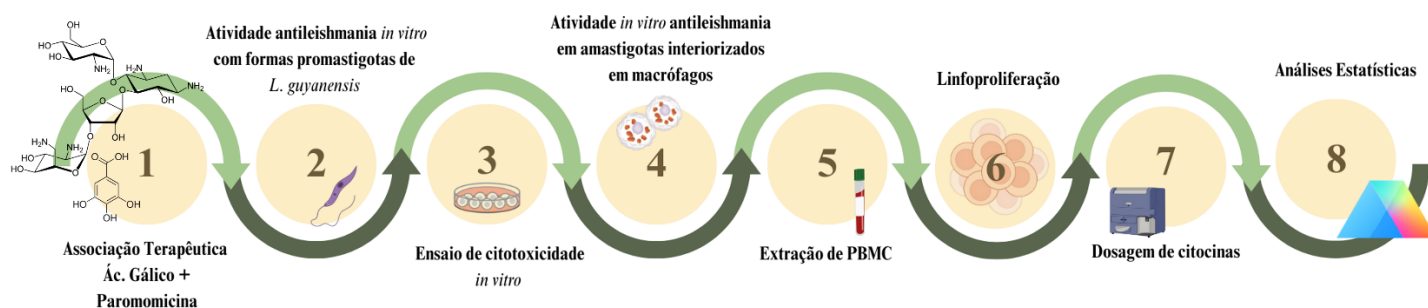


Figura 7. Fluxograma do delineamento experimental do estudo.

4.2 Obtenção das amostras químicas

A aquisição do ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico), o sulfato de paromomicina e a miltefosina foi por meio da Sigma Aldrich®, e o fármaco convencional Glucantime® (antimoniato de meglumina) foi cedido pela Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

4.3 Manutenção de *Leishmania*

Foi utilizada a espécie *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHO/BR/1975/M4147), mantidas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, INPA. As formas promastigotas de *L. guyanensis* utilizadas no bioensaio *in vitro* foram mantidas e cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) [Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA], completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) em estufa a 25 °C (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017).

4.4 Determinação da atividade antileishmania e concentração inibitória 50% (IC₅₀) das amostras químicas

A atividade antileishmania das substâncias foram avaliadas pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas. Promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (1×10^6 células/mL) foram incubadas com ácido gálico (GA) e sulfato de paromomicina (PAR) nas concentrações de 0,1; 1; 10; 100 e 150 µM. Para os ensaios combinatórios (GA+PAR), foram utilizadas concentrações e de 0,05+0,05; 0,5+0,5; 5+5; 50+50 e 75+75 µM. O Glucantime® (17; 34; 68; 137 e 273 µM) e a miltefosina (0,1; 1; 10; 50 e 100 µM) foram utilizados como drogas de referência, e como controle negativo foi utilizado o DMSO (Dimetilsulfóxido/Merck) na concentração de 1%.

A placa de Bioensaio na presença de promastigotas, controle e amostras testes, foi incubada em estufa a 25°C durante 24 e 48 horas. Após o período de incubação, foram removidos 110 µL do meio antigo e, em seguida, adicionado 10 µL do reagente MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil tetrazólio) [Sigma Aldrich®] na concentração de 10%. Após 4 horas na incubadora, foi adicionado 100µL de SDS (Dodecil sulfato de sódio) nos poços e, em seguida, a placa foi armazenada *overnight* em temperatura ambiente (TA), protegida da luz. A leitura da placa é colorimétrica em espectrofotômetro (Bio-Tek®), utilizando os comprimentos de onda de 595 nm. Os bioensaios foram realizados em triplicata e a média do número de células vivas foi utilizada para calcular a IC₅₀ (Adaptado de Stroppa *et al.*, 2017).

4.5 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

As substâncias foram submetidas aos testes para a determinação da concentração citotóxica (CC₅₀) de macrófagos não infectados. Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 ($1 \times$

10⁵ células/mL) foram cultivados previamente em placas de cultura de 96 poços contendo meio DMEM com a suplementação de 10% de SFBi (Biosul), durante 24 horas. Após este período, foi realizada a adição de novo meio contendo a presença de diferentes concentrações das substâncias: ácido gálico e sulfato de paromomicina nas concentrações de 0,1; 1; 10; 100 e 150 µM, GA+PAR nas concentrações de 0,05 + 0,05; 0,5 + 0,5; 5 + 5; 50 + 50 e 75 + 75 µM, a miltefosina nas concentrações 10; 5; 1; 0,5 e 0,1 µM; Glucantime® 273; 136; 68; 34 e 17 µM; o ácido gálico, sulfato de paromomicina e a combinação nas concentrações 150; 100; 10; 1 e 0,1 µM. O controle negativo foi o DMSO 1%.

A incubação dos macrófagos foi feita em estufa por 37°C e 5% de CO₂ por 24 e 48 horas na presença das amostras. Após este período de incubação, foi realizada a centrifugação das placas numa velocidade de 2.000 rpm por 10 minutos. Foram removidos 110 µL do meio antigo e, em seguida, adicionado 10 µL do reagente MTT na concentração de 10%. Após mais 3½ horas na incubadora, foi adicionado 100 µL de SDS nos poços e, em seguida, a placa foi armazenada *overnight* em temperatura ambiente. Após a absorção completa dos cristais de resazurina, foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (Bio-Tek®), utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os bioensaios foram realizados em triplicata e o cálculo para a obtenção do valor de CC₅₀ será por regressão não linear (Adaptado de Antinarelli *et al.*, 2017)

4.6 Atividade *in vitro* antileishmania em amastigotas interiorizados em macrófagos

Macrófagos murinos de linhagem RAW 264.7 (105/mL) foram cultivados em placa de 24 poços, onde lamínulas estéreis foram previamente acondicionadas nos poços, na concentração de 1 x 10⁵ células/mL, em meio DMEM completo, em estufa à 37°C por cerca de 24 horas. Após este período, os macrófagos foram infectados com 1 x 10⁶ promastigotas/mL de *L. guyanensis*, por duas horas. Em seguida, os poços foram lavados com meio DMEM para a remoção das promastigotas não interiorizados. Os macrófagos infectados foram incubados na presença das substâncias nas seguintes concentrações: ácido gálico e sulfato de paromomicina 150; 100; 50 e 10 µM; a combinação 75 + 75; 50 + 50; 25 + 25; 5 + 5; miltefosina 24; 12,5; 6 e 3 µM; Glucantime® 273; 27,3 e 2,7 µM. Após 24 e 48 horas de incubação em estufa a 37°C/5% CO₂, os poços foram lavados com meio DMEM, as células infectadas foram fixadas e coradas utilizando método panótico, e as lâminas de vidro foram removidas. Foram avaliados o número de macrófagos infectados (100 macrófagos por lâmina/réplica). A avaliação destes parâmetros foi realizada através de observação em microscópio óptico em aumento de 1000X (Adaptado de Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017)

4.7 Índice de Seletividade Celular (SI)

Para determinar a seletividade das concentrações com atividade antileishmania contra macrófagos de linhagem RAW 264.7, o índice seletivo (SI) foi obtido pela razão da CC₅₀ celular dividida pela concentração inibitória de 50% (IC₅₀) para promastigotas, durante as 48 horas, usando a seguinte equação:

$$SI = \frac{CC_{50} \text{ em macrófagos de linhagem Raw 264.7 (citotóxico)}}{IC_{50} \text{ contra amastigotas de } L. \text{ guyanensis}}$$

4.8 Aspectos éticos

Este trabalho tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) - CAAE/UFAM: 81512524.3.0000.5020. Foram atendidos neste projeto um total de 13 indivíduos (n=13) indivíduos saudáveis, e todos que concordaram em participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.9 Critérios de Elegibilidade

4.9.1 Critérios de Inclusão

Indivíduo independente de sexo e/ou orientação sexual, de dezoito a 59 anos de idade, que não apresentem manifestações clínicas de desenvolvimento de lesões causadas por *Leishmania*; não ter frequentado áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar nos últimos quinze dias anteriores; indivíduo que aceite participar do projeto e assine TCLE.

4.9.2 Critérios de Exclusão

Gestantes; diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores; comorbidades como diabetes; diagnóstico conhecido de doenças autoimunes.

4.10 Coleta de amostras de sangue e obtenção de PBMC

Para obtenção das células mononucleares humanas, foram diluídos o sangue periférico, coletados anteriormente, em meio RPMI completo (L-glutamina) na proporção de 1:1 e acrescentado, cuidadosamente, 8 mL Histopaque® - 1077. Os tubos foram levados à centrífuga sem freio a 2.400 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, foi realizada a remoção da camada de células mononucleares e transferida para um tubo falcon 15 mL para a realização de lavagens com meio RPMI completo e centrifugações a 4.400 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1mL de meio RPIM completo e as células foram contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan, ajustando concentração para 2×10^5 células / mL em meio RPIM completo (da Silva *et al.*, 2021)

4.11 Ensaio de proliferação celular

Em placas para cultivo com 96 poços de fundo chato, as PBMCs obtidas foram organizadas em triplicatas, com 100 μ L/poço (2×10^5 /mL). As células foram sensibilizadas com as amostras ácido gálico e sulfato de paromomicina em monoterapia (50 μ M), e a sua combinação GA + PAR (25 + 25 μ M). Como controle positivo de resposta linfoproliferativa, foi utilizado a *Phytohemagglutinin* (PHA) (10 μ g/mL) e o fármaco convencional Glucantime® (273 μ M), enquanto o controle negativo foram células que não receberam nenhuma estimulação. Em seguida, as PBMCs foram incubadas em atmosfera umidificada (95%) com 5% de CO₂, por 72 horas a 37 °C e, após 18 horas de incubação, foi adicionado BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) [10 mM mL⁻¹] (da Silva *et al.*, 2021).

O ensaio colorimétrico ELISA foi realizado com o Kit *BrdU Cell Proliferation ELISA* (Roche, Applied Sciences), seguindo as orientações do fabricante. Por fim, avaliou-se a incorporação de BrdU, com base no aumento médio da densidade óptica por espectrofotometria (absorvância a 450 nm). A estimulação da linfoproliferação de cada substância foi determinada com base no valor relativo entre a média aritmética das triplicatas do controle positivo e do controle negativo, em relação aos poços com células estimuladas.

4.12 Cálculo da resposta linfoproliferativa relativa e estratégia de normalização

A proliferação linfocitária foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), sendo a resposta determinada a partir da

densidade óptica (D.O.) mensurada em leitor de microplacas. Inicialmente, todas as leituras foram corrigidas pelo valor do branco (poços contendo apenas meio de cultura e reagentes), a fim de eliminar interferências de fundo.

As culturas foram estabelecidas com 2×10^5 células por poço e submetidas às seguintes condições: controle basal (células não estimuladas), estímulos experimentais e controle positivo de proliferação, utilizando fito-hemaglutinina (PHA). A PHA foi empregada como estímulo mitogênico inespecífico e considerada referência de máxima capacidade proliferativa no ensaio.

Como as diferentes condições foram avaliadas a partir de células do mesmo indivíduo, todos os cálculos foram realizados de forma intraindividual, preservando o delineamento pareado do estudo.

A resposta linfoproliferativa relativa ao controle basal foi calculada conforme a fórmula:

$$\text{Proliferação relativa (\%)} = \frac{\text{D.O. do estímulo}}{\text{D.O. do controle basal}} \times 100$$

Nesse modelo, o controle basal de cada participante foi considerado como referência interna (100%). Adicionalmente, para comparar a magnitude da resposta dos estímulos em relação ao controle positivo (PHA), foi realizada nova normalização intraindividual:

$$\text{Resposta relativa à PHA (\%)} = \frac{\text{Valor do estímulo}}{\text{Valor obtido com PHA}} \times 100$$

Com o objetivo de padronizar a análise, os valores foram limitados a 100%, de modo que nenhuma condição experimental ultrapassasse a resposta observada para a PHA no mesmo indivíduo. Valores superiores a 100% foram ajustados para esse limite máximo.

Essa estratégia de normalização permitiu comparações intraindividuais consistentes, reduzindo a variabilidade interindividual e garantindo maior robustez às análises estatísticas subsequentes.

4.13 Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas

Após o período de incubação das placas de proliferação celular, foi realizada centrifugação a 2.200 rpm por 15 minutos para recolher os sobrenadantes da cultura. Os sobrenadantes de cada poço foram transferidos individualmente para tubos de criopreservação e armazenados a -80°C até à dosagem de citocinas por citometria de fluxo.

4.14 Dosagem de citocinas

A quantificação das citocinas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o citômetro BD FACSCanto™ II, com análise pelo software FCAP Array v3, por meio da técnica Cytometric Bead Array (CBA). Foi empregado o kit BD™ Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (Cat. nº 560484, lote 29132; BD® Biosciences, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foram mensuradas as seguintes citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A.

4.15 Análises Estatísticas

A multiplicação das células parasitárias foi determinada por meio do ajuste de curvas sigmoidais, utilizando o software GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, EUA), com cálculo dos respectivos intervalos de confiança de 95%. As análises estatísticas dos níveis de linfoproliferação e citocinas também foram realizadas no GraphPad Prism 9.0. Após avaliação da distribuição dos dados, estes foram considerados não paramétricos; assim, as comparações entre grupos independentes foram conduzidas pelo teste de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Mann–Whitney para comparações múltiplas. Para comparações intraindividuais, respeitando o delineamento pareado do estudo, foi aplicado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas (Wilcoxon signed-rank test). A análise de correlação entre as variáveis imunológicas foi realizada por meio do coeficiente de correlação de Spearman, a fim de identificar associações monotônicas entre os níveis de citocinas e os parâmetros avaliados. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. CAPÍTULO

***In vitro* activity of gallic acid-paromomycin combination against *Leishmania guyanensis*
and human cell lymphoproliferative primary immune response**

Manuscrito submetido à Revista *Scientia Pharmaceutica*

***In vitro* activity of gallic acid-paromomycin combination against *Leishmania guyanensis* and human cell lymphoproliferative primary immune response.**

Rebecca Sayuri Barbosa Hanada^{1,2}, Antonia Maria Ramos Franco Pereira^{1,2}, Juliana Cavalcante de Araújo¹, Laís Gomes da Silva¹, Mayara Arguello da Silva^{1,2}, Rafaela Benício Santana^{1,2}, Sandra Tuye Velaca², Claudio Lucas Santos Catão¹, Estela Yasmin Coelho Oliveira³, Yury Oliveira Chaves², Allyson Guimarães da Costa¹, Adriana Malheiro Alle Marie¹, José Fernando Marques Barcellos¹, Bruno Bezerra Jensen²

¹Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil;

²Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil;

³Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil.

RESUMO

A leishmaniose cutânea permanece um desafio terapêutico devido à toxicidade, resistência parasitária e limitações dos fármacos convencionais, tornando a terapia combinada com compostos naturais imunomoduladores uma estratégia promissora. Este estudo avaliou a atividade antileishmania, citotóxica e o perfil imunomodulatório da resposta imune primária humana *in vitro* da associação entre ácido gálico (GA) e sulfato de paromomicina (PAR). Foram determinados os valores de IC₅₀ em promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e CC₅₀ em macrófagos RAW 264.7. Paralelamente, PBMCs de voluntários saudáveis (n=13) foram estimuladas por 72 h com GA, PAR e GA+PAR ou controles, avaliando-se a linfoproliferação (BrdU) e a produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A), seguida de análise de correlação de Spearman. O GA apresentou atividade moderada em promastigotas e elevada eficácia contra amastigotas intracelulares (IC₅₀=11,4 μ M), assim como GA+PAR (IC₅₀=20,5 μ M), enquanto PAR isolada mostrou atividade limitada. O Glucantime[®] induziu maior linfoproliferação (61,5%) e perfil de ampla ativação. GA modulou preferencialmente o eixo TNF/IL-6, PAR associou-se à IL-10, e GA+PAR exibiu perfil imunológico equilibrado entre citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, sem estímulo proliferativo direto. Em conjunto, GA+PAR demonstrou eficácia antiparasitária e padrão imunomodulador complementar, reforçando seu potencial como estratégia terapêutica alternativa.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; Terapia combinada; Imunomodulatório.

1. Introdução

A leishmaniose cutânea (CL) é uma doença infecciosa, não contagiosa, ocasionada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Trata-se de uma enfermidade endêmica em 90 países, sendo classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 21 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), afetando predominantemente populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica, com acesso limitado a serviços de saúde [1].

A resposta imune à infecção por *Leishmania* é multifacetada e envolve, inicialmente, a ativação de células da imunidade inata, principalmente macrófagos e neutrófilos, que atuam na tentativa de conter a multiplicação parasitária por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico. Essa resposta influencia o desenvolvimento da imunidade

adaptativa, na qual a diferenciação de subpopulações de linfócitos T desempenham papel determinante no controle ou progressão da doença [2-4].

A resposta Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12), está associada ao controle efetivo da infecção e à resolução das formas cutâneas localizadas, frequentemente observadas em infecções por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Em contrapartida, a resposta Th2, marcada pela secreção de interleucinas como IL-4 e IL-5, pode atenuar o dano tecidual, porém favorecer a evasão parasitária. Além disso, respostas mediadas por células Th17, via IL-17, contribuem para o processo inflamatório, enquanto células T reguladoras (Treg) e a produção de IL-10 são fundamentais para o controle da inflamação excessiva e manutenção da homeostase imunológica [5-8]. A ausência desse equilíbrio imunológico frequentemente resulta na necessidade de intervenção farmacológica.

O tratamento da LT preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil inclui fármacos como o antimoníato de meglumina, a anfotericin B, o isetionato de pentamidina e a miltefosina. Apesar da eficácia clínica, essas terapias estão associadas a efeitos adversos significativos, como nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, além de limitações relacionadas à via de administração e ao surgimento de cepas resistentes, o que compromete a adesão a o sucesso terapêutico [9-11].

Nesse cenário, a terapia combinada tem se destacado como uma estratégia promissora, uma vez que permite a redução das doses individuais, a diminuição da toxicidade e o retardo do desenvolvimento de resistência parasitárias. O sulfato de paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo que atua por meio da inibição da síntese proteica via ligação à subunidade ribossômica 30S, tem sido recomendado pela Organização Pan-Americana de Saúde para associação terapêutica no tratamento da LT, a utilização de compostos bioativos de origem natural sugere como uma abordagem complementar relevante. Dentre esses, o ácido gálico, um composto fenólico amplamente distribuído em plantas, destaca-se por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes. Adicionalmente, estudos indicam que o ácido gálico apresenta efeito imunomodulatório, estimulando a produção de óxido nítrico (NO) e potencializando a atividade microbicida de macrófagos, o que pode contribuir para a redução da carga parasitária [12-14].

A investigação da associação entre ácido gálico e o sulfato de paromomicina torna-se, portanto, relevante diante da possibilidade de efeitos sinérgicos decorrentes de seus

mecanismos de ação complementares, com potencial para aumentar a eficácia terapêutica, reduzir o tempo de tratamento e minimizar o desenvolvimento de resistência parasitária.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a resposta do composto fenólico ácido gálico combinado com o sulfato de paromomicina, por meio de ensaios *in vitro* contra o parasita *L. (V.) guyanensis*, avaliando o perfil de citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 e o efeito imunomodulatório em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de voluntários sadios, visando identificar uma possível estratégia terapêutica alternativa ou adjuvante para o tratamento da leishmaniose cutânea, contornando assim a elevada toxicidade e resistência parasitária.

2. Materiais e Métodos

2.1 Obtenção das amostras químicas

O ácido gálico, o sulfato de paromomicina e a miltefosina foram adquiridos da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). O Glucantime® (antimoniato de meglumina) [Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, Brasil] foi cedido pela Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2.2 Manutenção do parasito

Foi utilizada a espécie *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHO/BR/1975/M4147), mantida no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As formas promastigotas foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) [Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA], suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) [Gibco, Brasil], a 25 °C.

2.3 Determinação da atividade antileishmania e concentração inibitória 50% (IC₅₀) das amostras químicas

Promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (10⁶ células/mL) foram incubadas com ácido gálico (GA) ou sulfato de paromomicina (PAR) nas concentrações de 0,1; 1; 10; 100 e 150 µM. Para os ensaios combinatórios (GA+PAR), foram utilizadas concentrações de 0,05+0,05; 0,5+0,5; 5+5; 50+50 e 75+75 µM. O Glucantime® (17; 34; 68; 137 e 273 µM) e a miltefosina (0,1; 1; 10; 50 e 100 µM) foram utilizados como drogas de referência, e como controle negativo foi utilizado o DMSO (Dimetilsulfóxido/Merck) na concentração de 1%. As culturas permaneceram a 25 °C em incubadora BOD (ELETROLab®) por 24 e 48 horas. A viabilidade parasitária foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio). A absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro (BioTek®), e os valores de concentração que inibe o crescimento do parasita

em 50% (IC₅₀) foram determinados por regressão não linear. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes [15].

2.4 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada pela determinação da concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) em macrófagos não infectados da linhagem RAW 264.7. As células (10⁵ células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFBi, por 24 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com ácido gálico e sulfato de paromomicina (0,1; 1; 10; 100 e 150 µM), a combinação (0,05+0,05; 0,5+0,5; 5+5; 50+50 e 75+75 µM), miltefosina (0,1; 1; 10; 50 e 100 µM), e Glucantime® (17; 34; 68; 137 e 273 µM). O DMSO a 1% foi utilizado como controle negativo. As placas foram incubadas por 24 e 48 h, e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro, e os valores de CC₅₀ foram calculados por regressão não linear. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes [16].

2.5 Atividade *in vitro* antileishmania em amastigotas interiorizados em macrófagos

Macrófagos murinos de linhagem RAW 264.7 (10⁵/mL) foram cultivados em placa de 24 poços, onde lamínulas estéreis foram previamente acondicionadas nos poços. As células foram infectadas com promastigotas de *L. guyanensis* (10⁶/mL) e tratados com diferentes concentrações das substâncias ácido gálico e sulfato de paromomicina (10; 50; 100 e 150 µM), e da sua combinação (5+5; 25+25; 50+50; 75+75 µM). A miltefosina (3; 6; 12.5 e 24 µM) e o Glucantime® (2,73; 27,3 e 273 µM) foram utilizadas como controles positivos, e como controle negativo foi utilizado o DMSO 1%. Após 48 horas de incubação a 37 °C, os poços foram lavados, as lamínulas de vidro foram removidas e as células infectadas foram fixadas e coradas com método panótico. Foram avaliados o número de macrófagos infectados (100 macrófagos por lâmina/réplica). A avaliação destes parâmetros foi realizada através de observação em microscópio óptico em aumento de 1000X [17].

2.6 Índice de Seletividade Celular (SI)

Para determinar a seletividade das concentrações com atividade antileishmania contra macrófagos de linhagem Raw 264.7, o índice seletivo (SI) foi obtido pela razão da concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) dividida pela concentração inibitória de 50% (IC₅₀) para amastigotas, durante as 48 horas, usando a seguinte equação:

$$SI = \frac{CC_{50} \text{ em macrófagos de linhagem RAW 264.7}}{IC_{50} \text{ amastigota}}$$

2.7 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (CAAE: 81512524.3.0000.5020). Foram atendidos neste projeto um total de 13 indivíduos saudáveis, os quais, após concordarem com a participação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.8 Critérios de Elegibilidade

2.8.1 Critérios de Inclusão

Indivíduos independente de sexo e/ou orientação sexual, de 18 a 59 anos de idade, sem histórico de manifestações clínicas de desenvolvimento de lesões causadas por *Leishmania*; não terem frequentado áreas rurais/ periurbanas nos quinze dias anteriores; indivíduo que aceite a participar do projeto e assinem o TCLE.

2.8.2 Critérios de Exclusão

Gestantes; diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores; comorbidades como diabetes; diagnóstico conhecido de doenças autoimunes.

2.9 Coleta de amostras de sangue e extração de PBMC

O isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) é descrita com mais detalhes em Silva *et al.* (2021) [18]. Em resumo, 8 mL de sangue venoso periférico de indivíduos saudáveis foram coletados em tubos de polipropileno heparinizados. O sangue foi diluído em meio RPMI-1640 completo e Ficoll-Histopaque (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich®) foi adicionado. Após centrifugação a 2.200 rpm por 30 minutos, as PBMCs foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 completo e centrifugadas a 1.800 rpm por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, as PBMCs foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI suplementado e a concentração de PBMC foi ajustada para 2×10^5 células mL⁻¹.

2.10 Ensaio de proliferação celular

Em placas para cultivo com 96 poços de fundo chato, as PBMCs obtidas foram organizadas em triplicatas, com 100 µL/poço (2×10^5 /mL). As células foram sensibilizadas com as amostras ácido gálico e sulfato de paromomicina em monoterapia (50 µM), e a sua combinação GA + PAR (25 + 25 µM). Como controle positivo de resposta linfoproliferativa, foi utilizado a *Phytohemagglutinin* (PHA) (10 µg/mL) e o fármaco convencional Glucantime® (273 µM), enquanto o controle negativo foram células que não receberam nenhuma estimulação. Em seguida, as PBMCs foram incubadas em atmosfera umidificada (95%) com 5% de CO₂, por 72 horas a 37 °C e, após 18 horas de incubação, foi adicionado BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) [10 mM mL⁻¹] [18].

O ensaio colorimétrico ELISA foi realizado com o Kit *BrdU Cell Proliferation ELISA* (Roche, Applied Sciences), seguindo as orientações do fabricante. Por fim, avaliou-se a incorporação de BrdU, com base no aumento médio da densidade óptica por espectrofotometria (absorvância a 450 nm). A estimulação da linfoproliferação de cada substância foi determinada com base no valor relativo entre a média aritmética das triplicatas do controle positivo e do controle negativo, em relação aos poços com células estimuladas.

2.11 Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas

Após o período de incubação das placas de proliferação celular, foi realizada centrifugação a 2.200 rpm por 15 minutos para recolher os sobrenadantes da cultura. Os sobrenadantes de cada poço foram transferidos individualmente para tubos de criopreservação e armazenados a -80 °C até à dosagem de citocinas por citometria de fluxo.

2.12 Cálculo da resposta linfoproliferativa relativa e estratégia de normalização

A proliferação linfocitária foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), sendo a resposta determinada a partir da densidade óptica (D.O.) mensurada em leitor de microplacas. Inicialmente, todas as leituras foram corrigidas pelo valor do branco (poços contendo apenas meio de cultura e reagentes), a fim de eliminar interferências de fundo.

As culturas foram estabelecidas com 2×10^5 células por poço e submetidas às seguintes condições: controle basal (células não estimuladas), estímulos experimentais e controle positivo de proliferação, utilizando fito-hemaglutinina (PHA). A PHA foi empregada como estímulo mitogênico inespecífico e considerada referência de máxima capacidade proliferativa no ensaio.

Como as diferentes condições foram avaliadas a partir de células do mesmo indivíduo, todos os cálculos foram realizados de forma intraindividual, preservando o delineamento pareado do estudo.

A resposta linfoproliferativa relativa ao controle basal foi calculada conforme a fórmula:

$$\text{Proliferação relativa (\%)} = \frac{\text{D.O. do estímulo}}{\text{D.O. do controle basal}} \times 100$$

Nesse modelo, o controle basal de cada participante foi considerado como referência interna (100%). Adicionalmente, para comparar a magnitude da resposta dos estímulos em relação ao controle positivo (PHA), foi realizada nova normalização intraindividual:

$$\text{Resposta relativa à PHA (\%)} = \frac{\text{Valor do estímulo}}{\text{Valor obtido com PHA}} \times 100$$

Com o objetivo de padronizar a análise, os valores foram limitados a 100%, de modo que nenhuma condição experimental ultrapassasse a resposta observada para a PHA no mesmo indivíduo. Valores superiores a 100% foram ajustados para esse limite máximo.

Essa estratégia de normalização permitiu comparações intraindividuais consistentes, reduzindo a variabilidade interindividual e garantindo maior robustez às análises estatísticas subsequentes.

2.13 Dosagem de Citocinas

A quantificação das citocinas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o citômetro BD FACSCanto™ II, com análise pelo software FCAP Array v3, por meio da técnica Cytometric Bead Array (CBA). Foi empregado o kit BD™ Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (Cat. nº 560484, lote 29132; BD® Biosciences, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foram mensuradas as seguintes citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A.

2.14 Análises Estatísticas

A multiplicação das células parasitárias foi determinada por meio do ajuste de curvas sigmoidais, utilizando o software GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, EUA), com cálculo dos respectivos intervalos de confiança de 95%. As análises estatísticas dos níveis de linfoproliferação e citocinas também foram realizadas no GraphPad Prism 9.0. Após avaliação da distribuição dos dados, estes foram considerados não paramétricos; assim, as comparações entre grupos independentes foram conduzidas pelo teste de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Mann–Whitney para comparações múltiplas. Para comparações intraindividuais, respeitando o delineamento pareado do estudo, foi aplicado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas (Wilcoxon signed-rank test). A análise de correlação entre as variáveis imunológicas foi realizada por meio do coeficiente de correlação de Spearman, a fim de identificar associações monotônicas entre os níveis de citocinas e os parâmetros avaliados. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

O manejo terapêutico da leishmaniose cutânea baseia-se na apresentação clínica da doença, na espécie infectante e na resposta imunológica do hospedeiro. Apesar da existência de protocolos consolidados, os fármacos atualmente disponíveis apresentam limitações relevantes, como elevada toxicidade, longo tempo de tratamento e ocorrência de falhas clínicas, o que reforça a necessidade de estratégias alternativas e mais seguras. Devido a esses fatores, a terapia

combinada têm sido explorada como abordagem promissora, permitindo a redução de doses individuais, minimização de efeitos tóxicos e potencial aumento da eficácia terapêutica [19-21].

Compostos fenólicos, como o ácido gálico (GA), têm sido amplamente investigados por sua atividade antileishmania, associado principalmente à indução de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição. Estudos pré-clínicos têm sido realizados com essa substância, demonstrando que o GA atua como um inibidor da arginase da *Leishmania*, enzima-chave para o metabolismo do parasita, apresentando potencial terapêutico relevante contra diferentes espécies do gênero *Leishmania*, ainda em fase pré-clínica de investigação [22].

Estudos conduzidos por este grupo de pesquisa reforçam o potencial terapêutico de compostos fenólicos com atividade antileishmania, a partir da investigação do metil galato, um éster do ácido gálico, isolado de *Libidibia ferrea*, espécie vegetal nativa do Brasil. Evidências previamente obtidas pelo grupo demonstram que esse composto apresenta atividade antileishmania relevante, e sem perfil de citotoxicidade em macrófagos murinos (BALB/c) de cultivo primário, reforçando o potencial dos compostos fenólicos como candidatos promissores para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no controle da CL [23-25].

Em contraste, o sulfato de paromomicina (PAR), um aminoglicosídeo de uso clínico estabelecido, é um fármaco já empregado em protocolos terapêuticos para o tratamento da CL, geralmente utilizado em esquemas combinados. Diversos estudos demonstram a eficácia antileishmania dessa substância, bem como seu perfil de segurança, tanto de forma isolada quanto em associação com outros fármacos, reforçando seu papel como alternativa terapêutica aos antimoniais [26-28]. Adicionalmente, o estudo de Carter *et al.* (2022) [29] indica que a PAR pode interferir em vias metabólicas essenciais do parasita, como o metabolismo de poliaminas, considerado um alvo terapêutico promissor em *Leishmania*. Com isto, este estudo avaliou atividade antileishmania da associação entre o ácido gálico (GA) e o sulfato de paromomicina (PAR), assim como o efeito de cada composto isoladamente, em promastigotas e amastigotas de *Leishmania guyanensis*.

Nos ensaio antileishmania com promastigotas, GA em monoterapia, nas concentrações mais elevadas (150 e 100 μ M), apresentou maior efeito inibitório quando comparado à PAR e a associação AG+PAR, a qual demonstrou efeito sinérgico limitado. A análise dos valores de concentração inibitória de 50% (IC₅₀) revelou redução progressiva para o GA ao longo de 48 h (de 142,5 para 126,5 μ M), sugerindo aumento do potencial antileishmania de forma tempo-dependente. Em contraste, PAR na forma isolada e a combinação AG+PAR não atingiram IC₅₀

nas concentrações testadas, indicando que concentrações superiores a 150 μM seriam necessárias para produzir efeito significativo sobre promastigotas (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da atividade biológica antileishmania das amostras contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania guyanensis*, citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 e índice de seletividade em relação a amastigotas.

SAMPLES	Mø Raw 264.7		<i>L. guyanensis</i>				
			Promastigote		Amastigote		SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
	CC ₅₀ ± SD (µM)		IC ₅₀ ± SD (µM)		IC ₅₀ ± SD (µM)		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	
GA	>150	>150	142,5 ± 1,8	126,5 ± 14,6	89,1 ± 7,1	11,4 ± 8	32
PAR	>150	>150	>150	>150	118,1 ± 5,5	>150	-
GA + PAR	131,2 ± 6,6	>150	>150	>150	68,6 ± 4,6	20,5 ± 8,3	43
GLUC	>273	>273	>273	>273	59,2 ± 4,8	49,1 ± 7,2	-
MILT	29,1 ± 4,6	24,8 ± 8,2	7,4 ± 5,4	6,3 ± 2,5	1,5 ± 4	1,5 ± 2,7	16

- IC₅₀: a concentração capaz de inibir 50% dos parasitas
- CC₅₀: concentração capaz de inibir 50% das células
- SI: índice de seletividade
- SD: desvio padrão

Nos ensaios de citotoxicidade em macrófagos da linhagem RAW 264.7, GA e PAR não apresentaram um perfil de citotoxicidade significativo em nenhuma das concentrações testadas (Figura 1), com CC₅₀ de >150 μM (Tabela 1). Entretanto, a associação GA+PAR apresentou, em suas maiores concentrações (150 e 100 μM), uma pequena diminuição na população celular (Figura 1-C). Esse efeito pode estar relacionado à conhecida atividade antitumoral do GA, considerando que a linhagem RAW 264.7 é derivada de células tumorais murinas [31]. Em contraste, PAR apresentou perfil de segurança favorável, com CC₅₀ >150 μM ao longo de 48 horas (Tabela 1), corroborando dados prévios que demonstram sua boa tolerabilidade ao avaliar a associação entre o sulfato de paromomicina e o pamoato de pivínio, tanto em modelos de amastigotas axênicas e intramacrofágicas de *L. infantum* quanto em organoides murinos [30].

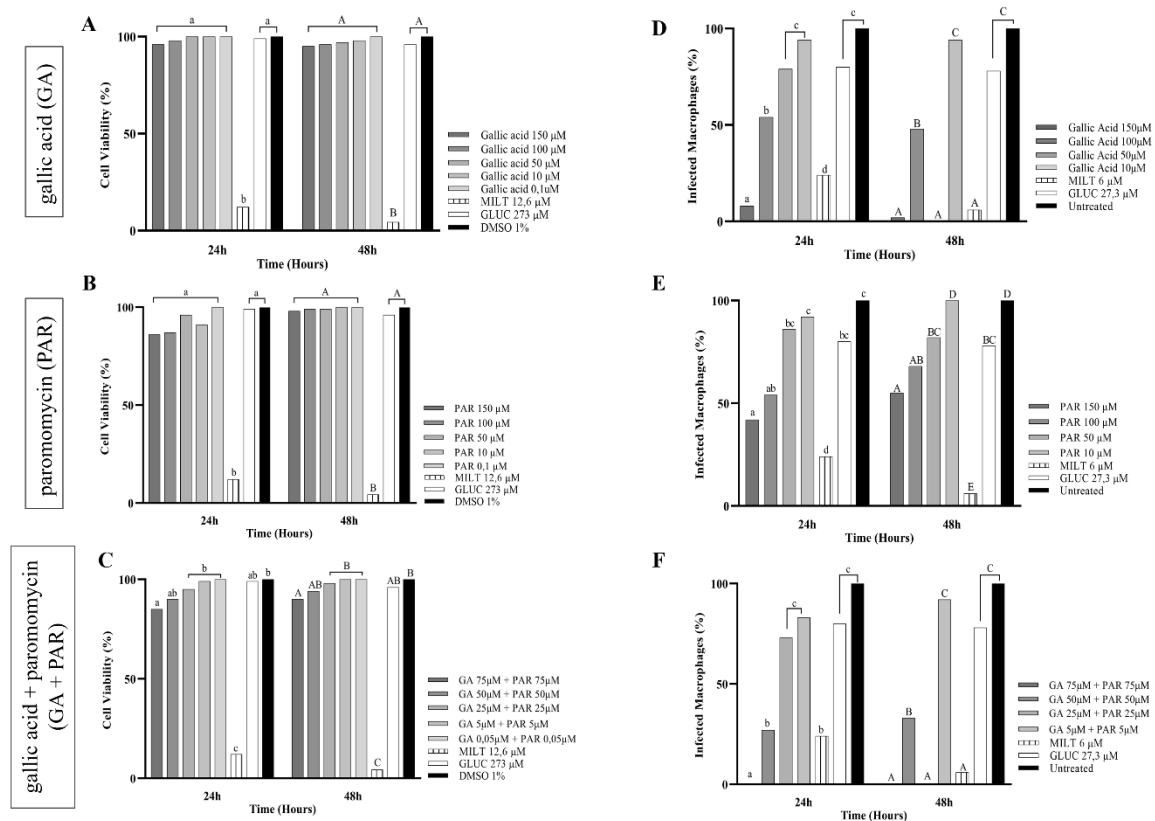


Figura 1. A, B e C – Viabilidade celular (%) e D, E e F – percentual de macrófagos infectados após tratamento com ácido gálico (GA), paromomicina (PAR) e GA+PAR por 24 h e 48 h. Miltefosina (MILT) e Glucantime® (GLUC) foram utilizados como controle positivo, DMSO 1% e células não tratadas como controle negativo. As diferenças estatísticas entre os grupos são representadas por letras. Para o tempo de 24 h foram utilizadas letras minúsculas (a, b, c) e, para 48 h, letras maiúsculas (A, B, C). Grupos identificados com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si, enquanto grupos com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$), conforme análise por ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey.

A miltefosina, utilizada como um dos controle positivo, apresentou elevada eficácia antileishmania, com IC_{50} entre 6.3 e 7.4 µM, porém associada a citotoxicidade relevante (CC_{50} entre 24.8 e 29.1 µM), em concordância com estudos que descrevem seus efeitos citotóxicos e genotóxicos em células leucocitárias humanas, associados à indução de dano ao DNA e apoptose celular, o que reforça o perfil de citotoxicidade dessa substância [32].

Em amastigotas intracelulares, observou-se redução dependente da concentração na taxa de infecção dos macrófagos tratados com GA, com IC_{50} de 89.1 a 11.4 µM. Por outro lado, a substância PAR apresentou uma menor atividade, com aumento da taxa de macrófagos infectados em 48 horas de ensaio. Os valores de IC_{50} variaram de 118,1 a >150 µM, indicando baixa eficácia nas concentrações avaliadas; ainda assim, o composto demonstrou desempenho relativamente superior frente às formas amastigotas quando comparado aos resultados observados em promastigotas (Tabela 1). Em contrapartida, a combinação GA + PAR apresentou atividade antileishmania nas maiores concentrações, com valores de IC_{50} variando

entre 68,6 e 20,5 μM , indicando potencial da associação terapêutica em comparação aos tratamentos em monoterapia, especialmente em relação à PAR.

A atividade antileishmania do GA como já mencionado, pode estar associada à sua capacidade de inibir a enzima arginase, a qual é essencial para a sobrevivência do parasita por sustentar sua proliferação via síntese de poliaminas e, simultaneamente, limitar a ação microbicida do óxido nítrico (NO) do hospedeiro. Dessa forma, a inibição da arginase pelo GA compromete a produção de poliaminas indispensáveis ao metabolismo do parasita e redireciona a arginina para a via da óxido nítrico sintase, potencializando a geração de NO e a resposta microbicida do hospedeiro [33,34]. Corroborando a esse mecanismo, estudos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c demonstraram que a exposição ao GA promove aumento do volume lisossomal e da liberação de NO em células infectadas, indicando um efeito imunomodulador favorável à inibição parasitária [31].

Por sua vez, o perfil de atividade da PAR frente às amastigotas reforça as limitações do seu uso em monoterapia e destaca a importância de abordagens terapêuticas combinatórias para ampliar a eficácia antiparasitária. Em concordância com esses achados, Coser et al. (2021) [32] demonstraram que a PAR é consistentemente mais ativa contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (IC_{50} de 0,62 a 108,6 μM) do que contra promastigotas (IC_{50} de 4,95 a 205 μM), apesar da elevada variabilidade de suscetibilidade entre espécies, corroborando seu melhor desempenho na forma intracelular do parasita.

A análise morfológica indicou redução da taxa de infecção após o tratamento com GA na concentração de 150 μM , evidenciada pela observação de raras estruturas compatíveis com amastigotas, assinaladas pela seta na Figura 2-A. Em contraste, a concentração de 10 μM apresentou maior número de macrófagos infectados, evidenciando menor eficácia antiparasitária, associada a alterações morfológicas discretas nos macrófagos (Figura 2-B). O tratamento com PAR, ilustrado nas Figuras 2 C e D (150 e 10 μM , respectivamente), revelou uma maior taxa de infecção com amastigotas intracelulares indicadas pelas setas, especialmente na menor concentração, associada à presença de prolongamentos citoplasmáticos.

Na associação GA+PAR, observou-se redução mais acentuada da taxa de macrófagos infectados na concentração de 150 μM , acompanhada por alterações nas células, como o aumento do volume nuclear indicado pela seta na Figura 2-E. Por outro lado, na concentração de 10 μM (Figura 2-F), verificou-se maior número de macrófagos infectados, evidenciando o caráter dose-dependente da ação da terapia combinada. Em contraste, a miltefosina exibiu elevada atividade antiparasitária associada a citotoxicidade acentuada, evidenciada na Figura 2-G pela presença de debris celulares indicados pela seta. Por fim, o Glucantime® apresentou

redução parcial de macrófagos infectados, com amastigotas residuais ainda indicadas pelas setas nas Figuras 2-I e 2-J.

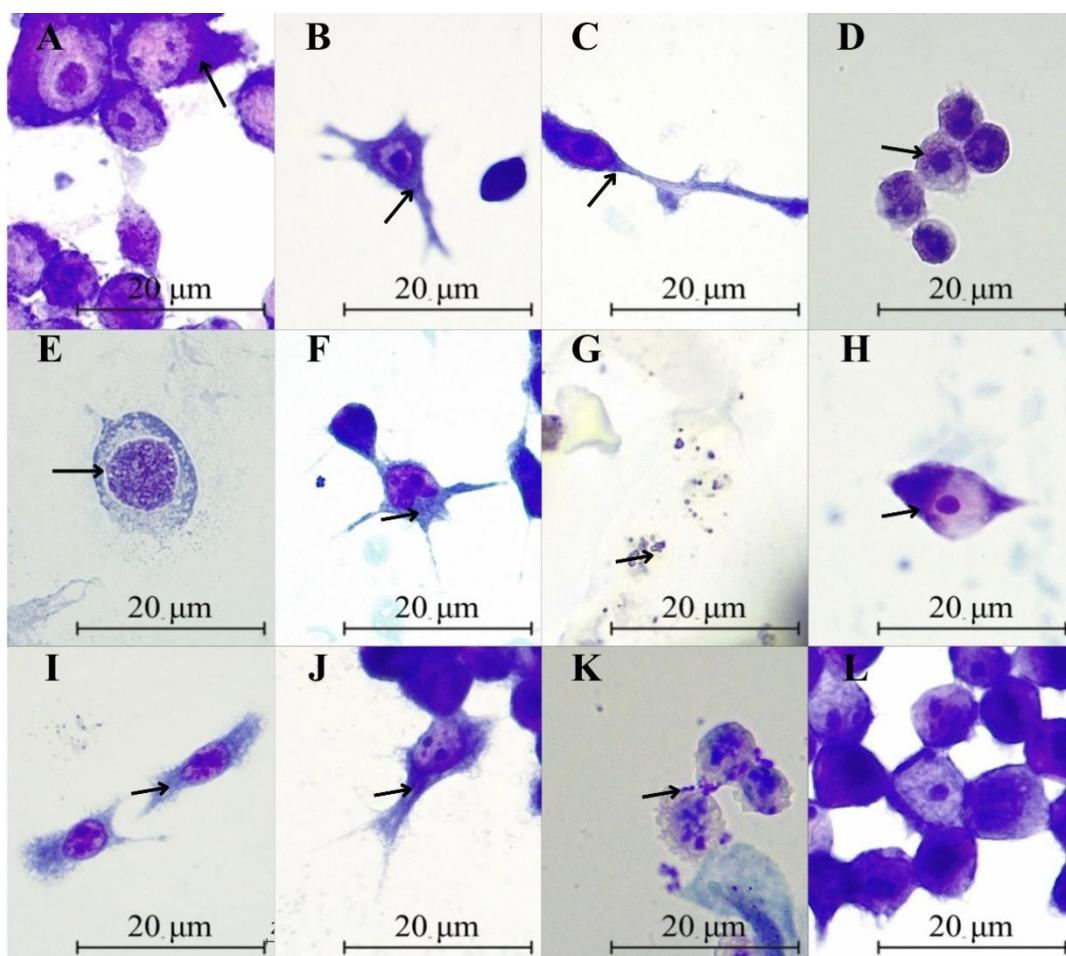


Figura 2. Análise morfológica de macrófagos RAW 264.7 infectados por amastigotas de *Leishmania guyanensis* após diferentes tratamentos. Macrófagos infectados tratados com ácido gálico (GA) a 150 μ M (A) e 10 μ M (B); sulfato de paromomicina (PAR) a 150 μ M (C) e 10 μ M (D); combinação GA+PAR a 150 μ M (E) e 10 μ M (F); miltefosina a 24 μ M (G) e 3 μ M (H); Glucantime® a 100 μ M (I) e 1 μ M (J). O painel K representa o controle DMSO 1%, L o controle infectado não tratado e M o controle não infectado.

Com relação aos parâmetros hematológicos dos voluntários sadios, observa-se que, de modo geral, a contagem total de leucócitos (WBC) permaneceu dentro da faixa de referência estabelecida (4.000–10.000 células/mm³) para a maioria dos indivíduos, sendo identificada apenas uma contagem discretamente reduzida no voluntário 6. As porcentagens de neutrófilos segmentados mantiveram-se dentro dos valores de referência em todos os participantes. As proporções de monócitos foram predominantemente normais, apresentando baixa variabilidade interindividual, enquanto as porcentagens de linfócitos demonstraram variabilidade moderada, com alguns indivíduos exibindo valores acima ou abaixo da faixa de referência, um achado comumente descrito em populações saudáveis [35,36] (Figura suplementar 1).

Esses resultados indicam a preservação da homeostase imunológica entre os participantes do estudo, sem evidências de infecção aguda, processos inflamatórios ou

distúrbios hematológicos. Dessa forma, os dados sustentam a adequação dos voluntários para a realização dos ensaios imunológicos subsequentes, minimizando a possibilidade de viés hematológico basal nos resultados experimentais.

A resposta linfoproliferativa relativa foi avaliada nas condições GA, PAR, GA+PAR e na droga controle (Glucantime® – GLUC), sendo adotado o ponto de corte de 50% para caracterização de respostas proliferativas de maior magnitude. Todas as análises foram conduzidas de forma intraindividual, respeitando o delineamento pareado do estudo (Figura 3).

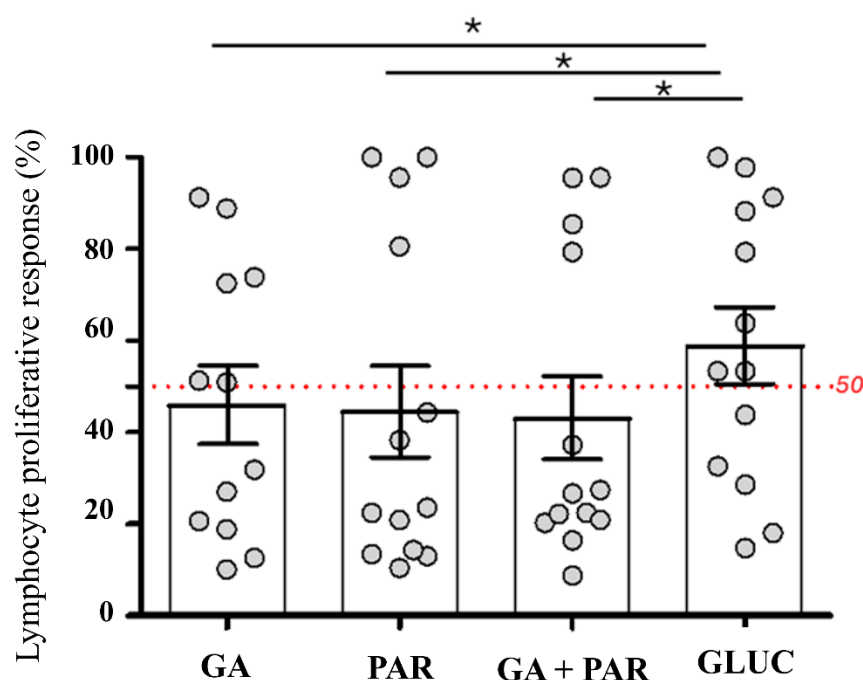


Figura 3. Resposta linfoproliferativa relativa (%) de PBMCs estimuladas com ácido gálico (GA), paromomicina (PAR), associação GA+PAR e droga controle (GLUC). Cada ponto representa um voluntário ($n = 13$), e a linha tracejada indica o ponto de corte de 50% para definição de maior magnitude proliferativa. As comparações intraindividuais, realizadas pelo teste de Wilcoxon pareado, demonstraram diferenças significativas entre GLUC e as condições experimentais (GA: $p = 0,0186$; PAR: $p = 0,0479$; GA+PAR: $p = 0,0161$), indicando menor intensidade proliferativa nas condições testadas em relação ao controle.

A comparação intraindividual das respostas foi realizada por meio do teste de Wilcoxon para amostras pareadas (Wilcoxon signed-rank test), apropriado para dados dependentes e com distribuição não paramétrica. As análises demonstraram que as respostas obtidas nas condições AG, PAR e AG+PAR foram significativamente diferentes daquelas observadas para a droga controle (GLUC), com valores de p iguais a 0.0186, 0.0479 e 0.0161, respectivamente.

De forma geral, os resultados indicam que, quando comparadas à droga controle, as condições experimentais apresentaram magnitude proliferativa inferior, tanto em termos de distribuição dos valores quanto na proporção de indivíduos que ultrapassaram o ponto de corte estabelecido. Esses achados reforçam o papel da GLUC como referência máxima de resposta proliferativa no presente ensaio.

A análise de correlação de Spearman revelou perfis imunomodulatórios distintos entre os tratamentos. Na condição basal (CEL), observou-se um conjunto restrito de correlações significativas. Entre elas, destacaram-se correlações positivas entre IL-6/IL-10 e IL-6/TNF, sugerindo co-regulação dessas citocinas em repouso. Também foram identificadas correlações positivas entre IL-2/IFN- γ , além de associação direta entre IL-2 e os parâmetros proliferativos, indicando influência desse mediador na atividade basal de proliferação (Figura 4).

O GA apresentou um perfil mais restrito, caracterizado por modulação pontual de eixos inflamatórios, evidenciada na Figura 4 pela associação positiva entre TNF e IL-6, sem correlação direta com a proliferação celular. A ausência de associações múltiplas com o ensaio de BrdU reforça essa interpretação, indicando que seu efeito regulador não está relacionado a um estímulo proliferativo direto. Esses achados estão em consonância com a literatura, que descreve o GA como um imunomodulador seletivo, capaz de interferir em vias inflamatórias centrais e reduzir mediadores como TNF- α e IL-6, sem induzir proliferação celular [12,38].

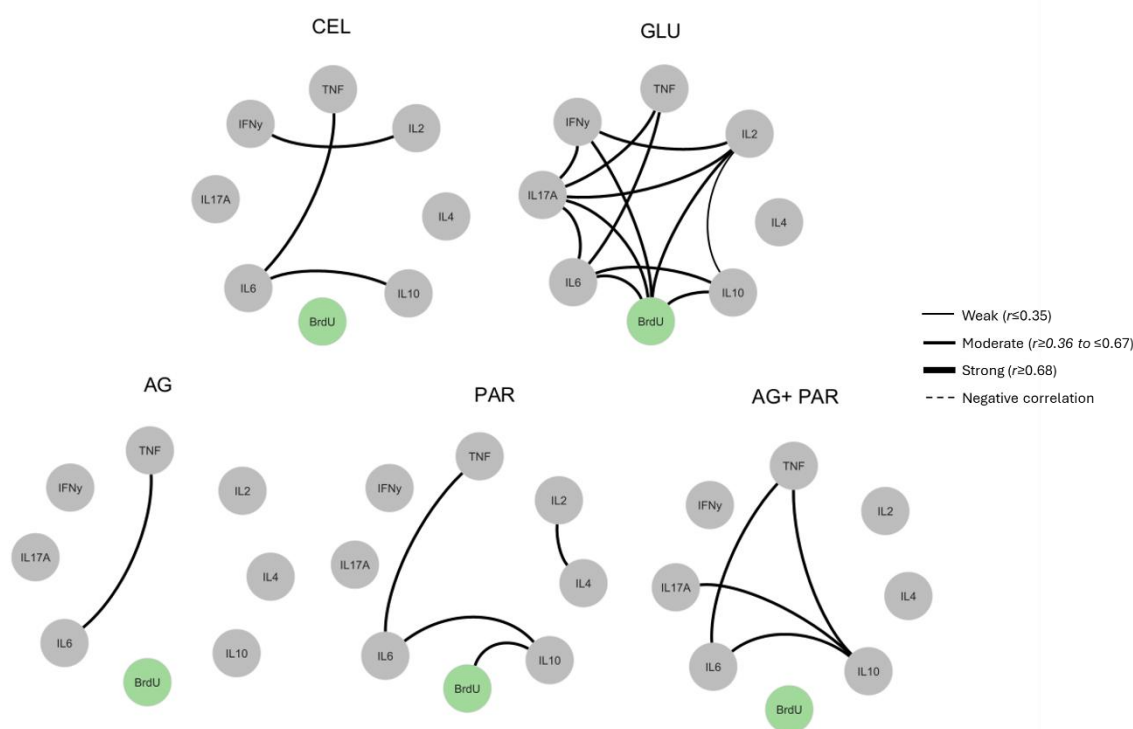


Figura 4. Matrizes de correlação de Spearman entre citocinas, proliferação celular e densidade óptica do BrdU nas diferentes condições experimentais. As matrizes representam as correlações entre os níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A e a densidade óptica do BrdU, indicador de proliferação celular, nas condições controle (CEL), estímulo com Glucantime® (GLUC), ácido gálico (AG), sulfato de paromomicina (PAR) e associação ácido gálico + paromomicina (AG+PAR). As linhas indicam correlações significativas, sendo a espessura proporcional à intensidade da correlação (fraca, moderada ou forte), enquanto as linhas tracejadas representam correlações negativas. A ausência de conexão indica correlações não significativas ($p > 0,05$).

O tratamento com PAR exibiu um padrão intermediário, identificando correlações positivas entre IL-2 e IL-4, além de associações que também estavam presentes na condição basal, como IL-10/IL-6 e TNF/IL-6. Pode-se observar ainda correlação entre IL-10 e a proliferação celular, bem como correlação positiva entre IL-10 e a D.O. (nm) do BrdU, indicando consistência no efeito desse mediador sobre atividade proliferativa (Figura 4). Este achado está alinhado com o papel descrito da IL-10 como um regulador central da expansão linfocitária e da limitação de respostas inflamatórias exageradas em infecções parasitárias [39].

O tratamento combinado GA + PAR exibiu um perfil integrado, reunindo características observadas nos tratamentos isolados. Foram encontradas correlações positivas entre IL-6/IL-10, TNF/IL-6, TNF/IL-10 e IL-17/IL-10, demonstradas na Figura 4, sugerindo possível sinergismo entre os compostos na organização de vias pró-inflamatórias. Entretanto, diferentemente dos demais tratamentos, não foram observadas correlações significativas envolvendo variáveis relacionadas à proliferação celular, indicando que a combinação pode modular vias inflamatórias sem impactar diretamente os mecanismos proliferativos. Tal perfil está de acordo com estudos que descrevem esquemas combinatórios capazes de induzir efeitos imunomoduladores sinérgicos, promovendo o controle da inflamação sem comprometer a resposta efetora necessária ao controle parasitário [40].

Por fim, o tratamento com GLUC induziu uma rede complexa de interações entre citocinas pró-inflamatórias e regulatórias (IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IFN- γ), consistente com seu efeito imunológico amplo (Figura 4). Além disso, foram identificadas correlações significativas envolvendo a densidade óptica do BrdU e variáveis de proliferação celular, reforçando a ideia de que o GLUC é capaz de modular tanto vias inflamatórias quanto mecanismos relacionados a multiplicação celular. Esses resultados estão alinhados com estudos que descrevem os antimoniais pentavalentes como indutores de uma resposta imune intensa e pouco seletiva [37].

Sumarizando, esses resultados indicam que a associação GA+PAR apresenta potencial promissor como estratégia alternativa para a leishmaniose cutânea, combinando a atividade antileishmania eficaz em amastigotas com perfil imunomodulador mais equilibrado e menor impacto citotóxico em comparação aos fármacos de referência. Esses achados reforçam a relevância de estudos futuros explorando ensaios com PBMCs de pacientes diagnosticados com CL, os quais permitirão avaliar a modulação da resposta imune em um contexto clínico considerando o estado inflamatório, a carga parasitária e a heterogeneidade imunológica característica da doença, contribuindo para a consolidação dessa associação como potencial estratégia terapêutica adjuvante ou alternativa.

4. CONCLUSION

Os resultados demonstram que o ácido gálico e a combinação GA+PAR, apresentaram atividade antileishmania relevante (IC₅₀ de 11,4 e 20,5 µM respectivamente), particularmente sobre amastigotas intracelulares de *Leishmania guyanensis* nas duas maiores concentrações testadas após 48 horas de exposição. Embora a combinação terapêutica tenha exibido uma discreta redução na viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7, mostrou-se capaz de ampliar a eficácia antiparasitária sem induzir respostas proliferativas ou inflamatórias exacerbadas em PBMCs dos voluntários, correlacionando citocinas pró-inflamatórias e regulatórias (IL-6/IL-10, TNF/IL-6, TNF/IL-10, IL-17/IL-10), porém sem estímulo proliferativo direto. Esses achados sustentam o potencial da associação GA+PAR como estratégia terapêutica alternativa para a leishmaniose cutânea. No entanto, a validação translacional desses resultados requer a ampliação dos estudos imunológicos, especialmente por meio de ensaios com PBMCs de pacientes diagnosticados com CL, a fim de elucidar o impacto da terapia combinada em contextos imunológicos reais da doença.

5. REFERENCES

1. Magalhães AR, Codeço CT, Svenning JC, Escobar LE, *et al.* Neglected tropical diseases risk correlates with poverty and early ecosystem destruction. **Infect Dis Poverty**. 2023;12(1):32.
2. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. **Lancet**. 2018;392:951–70.
3. Horta MF, Andrade LO, Martins-Duarte ES, Castro-Gomes T. Cell invasion by intracellular parasites – the many roads to infection. **J Cell Sci**. 2020;133(4):jcs232488.
4. Rafique A, Sani SS, Sultana S, Sultana T, *et al.* Cutaneous leishmaniasis. In: **Leishmania Parasites – Epidemiology, Immunopathology and Hosts**. IntechOpen; 2023.
5. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**. 2016;16(9):581–92.
6. Yasmin H, *et al.* Host–pathogen interaction in leishmaniasis: immune response and vaccination strategies. **Immuno**. 2022;2(1):218–54.
7. Singh, V. K. *et al.* Advancing treatment for leishmaniasis: from overcoming challenges to embracing therapeutic innovations. **ACS Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 47-68, 2024.
8. Morales-Primo A.U, *et al.* Th17 cell and inflammatory infiltrate interactions in cutaneous leishmaniasis. **Immune Netw**. 2024;24(2):e14.

9. Akbari M, Oryan A, Hatam G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: a review. **Acta Trop.** 2017;172:86–90.
10. Tiwari N, *et al.* Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. **Mini Rev Med Chem.** 2018;18(1):26–41.
11. Roatt BM, *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2020;104(21):8965–77.
12. Bai J, *et al.* Gallic acid: pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomed Pharmacother.** 2021;133:110985.
13. Keshav P, Goyal DK, Kaur S. Antileishmanial potential of immunomodulator gallic acid against experimental murine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 2021;43:e12875.
14. Pratyusha S. Phenolic compounds in plant development and defense. In: **Plant Stress Physiology: Perspectives in Agriculture.** 2022. p.125.
15. Stroppa PH, Antinarelli LM, Carmo AM, Gameiro J, *et al.* Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorg Med Chem.** 2017;25(12):3034–45.
16. Antinarelli LM, Pinto NC, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. **An Acad Bras Cienc.** 2015;87(2):733–42.
17. Comandolli-Wyrepkowski CD, *et al.* Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. **Acta Amazonica.** 2017;47:331–40.
18. Silva EO, *et al.* Evaluation of the lymphoproliferation of mononuclear cells in cutaneous leishmaniasis patients treated with *Libidibia ferrea*. **Acta Brasiliensis.** 2021;5(3):97–102.
19. Sasidharan S, Saudagar P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitol Res.** 2021;120(5):1541–54.
20. Mann S, *et al.* A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Curr Trop Med Rep.** 2021;8(2):121–32.
21. Mathison BA, Bradley BT. Review of the clinical presentation, pathology, diagnosis, and treatment of leishmaniasis. **Lab Med.** 2023;54(4):363–71.
22. Carter NS, *et al.* Natural products that target the arginase in *Leishmania* parasites hold therapeutic promise. **Microorganisms.** 2021;9(2):267.
23. Bacha TJ, *et al.* Microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Acta Amazonica.** 2023;53(3):246–53.
24. Hanada RSB, *et al.* An in vitro evaluation of the antileishmanial and cytotoxic activity of methyl gallate associated with conventional treatment for cutaneous leishmaniasis. **Afr J Pharm Pharmacol.** 2024;18:48.

25. Jensen BB, *et al.* Topical microemulsion with phenolic compounds from *Libidibia ferrea* (Fabaceae): an alternative treatment for cutaneous leishmaniasis. **Eur J Microbiol Immunol.** 2025;15(4):222–31.
26. Kim DH, *et al.* Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? **PLoS Negl Trop Dis.** 2009;3(2):e381.
27. Ben Salah A, *et al.* Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **N Engl J Med.** 2013;368(6):524–32.
28. Sosa N, *et al.* Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** 2019;13(5):e0007253.
29. Carter NS, *et al.* Polyamine metabolism in *Leishmania* parasites: a promising therapeutic target. **Med Sci.** 2022;10(2):24.
30. Melcón-Fernández E, *et al.* In vitro and ex vivo synergistic effect of pyrvinium pamoate combined with miltefosine and paromomycin against *Leishmania*. **Trop Med Infect Dis.** 2024;9(2):30.
31. Alves MMM, *et al.* Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 2017;390(9):893–903.
32. Coser EM, *et al.* Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of *Leishmania* species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop.** 2021;215:105806.
33. Pessenda G, Silva JS. Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. **Parasite Immunol.** 2020;42(7):e12722.
34. Badirzadeh A, *et al.* Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017;11(7):e0005774.
35. Branco PVC, *et al.* The antileishmanial drug miltefosine causes oxidation of DNA bases, apoptosis, and necrosis in mammalian cells. **Mutat Res.** 2016;806:34–39.
36. Wakeman L, *et al.* Robust, routine haematology reference ranges for healthy adults. **Int J Lab Hematol.** 2007;29(4):279–83.
37. Abbas AB, *et al.* Determine complete blood count reference values among healthy adult populations. **J Blood Med.** 2024:513–22.
38. Gonzalez-Fajardo, *et al.* 2015.
39. Li K, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidative effects of gallic acid on experimental dry eye. **Eye Vis.** 2023;10(1):17.
40. Stijlemans B, *et al.* The role of MIF and IL-10 as molecular Yin–Yang in the modulation of the host immune microenvironment during infections. **Front Immunol.** 2022;13:865395.

41. Ramos TD, *et al.* Combined therapy with adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells and meglumine antimoniate controls lesion development and parasite load in murine cutaneous leishmaniasis. **Stem Cell Res Ther.** 2020;11(1):374.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados do projeto mostraram que combinação AG + PAR possui potencial como possível novo fármaco para o tratamento da Leishmaniose cutânea, sugerindo o prosseguimento do estudo com as seguintes etapas:

- Ampliar os estudos utilizando PBMCs de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea, a fim de confirmar os efeitos imunomoduladores da associação AG + PAR em um contexto imunológico real da doença;
- Investigar as vias celulares e moleculares envolvidas na ação combinada AG + PAR, incluindo a ativação e polarização de macrófagos, bem como a modulação de mediadores inflamatórios;
- Conduzir estudos experimentais em células 3D para análise da eficácia terapêutica, toxicidade sistêmica e perfil de segurança da associação GA + PAR;
- Explorar diferentes esquemas de dosagem, formulações e vias de administração, visando maximizar a eficácia antiparasitária e minimizar potenciais efeitos citotóxicos.

REFERÊNCIAS

- AÏT-LOUDHIA, Khatima *et al.* Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. **Parasitology research**, v. 109, p. 1225-1232, 2011.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: a review. **Acta tropica**, v. 172, p. 86-90, 2017.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- AKINOSOGLOU, Karolina *et al.* Amphotericin B in the Era of New Antifungals: Where Will It Stand?. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 4, p. 278, 2024.
- AL-MA'AMOURI, M. Y. Cutaneous leishmaniasis: Review Article. **Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 44–49, 2023
- ALTUNTAS, S.; KORUKLUOGLU, M. The role of phenolic compounds as potential antimicrobial agents.
- ALVES, M. M. M. *et al.* Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by Leishmania major. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, p. 893-903, 2017.
- AMORIM, V. E. M. *et al.* Cutaneous leishmaniasis and the brazilian population in the last decades. **International Journal of Health Science**, v. 3, n. 8, p. 2–9, 2023.
- ASSAN, R. *et al.* Pentamidine-induced derangements of glucose homeostasis: determinant roles of renal failure and drug accumulation: a study of 128 patients. **Diabetes Care**, v. 18, n. 1, p. 47-55, 1995.
- ASTMAN, N. *et al.* Tolerability and safety of miltefosine for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 9, p. 218, 2024.
- AZEVEDO CARDOSO, E. *et al.* Leishmaniasis: history, evolution of treatment and the need for new drugs. **Current Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 279-288, 2014.
- BAI, J. *et al.* Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 133, p. 110985, 2021.
- BARRATT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 3, p. 247-255, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Medicamentos. **Resolução -RE nº 11, de 2 de janeiro de 2025- Publicar o cancelamento de**

registro a pedido dos medicamentos similares, genéricos e novos, sob o nº de expedientes constantes do anexo desta Resolução, nos termos do art. 51 da Lei nº 9.784 de 1999. Ministério da Saúde, Brasília, 02 de janeiro de 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. **Nota Informativa nº 13/2020- Orientações sobre o uso da miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar no âmbito do Sistema Único de Saúde.** Ministério da Saúde, Brasília, 01 de julho de 2020.

BRÜGGEMANN, R. J.; JENSEN, G. M.; LASS-FLÖRL, C. Liposomal amphotericin B—the past. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. Supplement_2, p. ii3-ii10, 2022.

BRUSTOLIN, A. Á. *et al.* Successful combined therapy with Glucantime™ and pentoxifylline for the nasal mucosal lesion recently developed in a leishmaniasis patient having untreated cutaneous lesion for seven decades. **Parasitology International**, v. 85, p. 102422, 2021.

BURROWS, J. N. *et al.* Medicinal Chemistry for Neglected Diseases—Malaria, Tuberculosis, Sleeping Sickness, Leishmaniasis and River Blindness. 2023.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis Lancet 392: 951–970. 2018.

CALZETTA, L. *et al.* Drug-drug interactions and synergy: from pharmacological models to clinical application. **Pharmacological Reviews**, v. 76, n. 6, p. 1159-1220, 2024.

CARTER, N. S. *et al.* Natural products that target the arginase in Leishmania parasites hold therapeutic promise. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 267, 2021.

CHAUHAN, Y. *et al.* An Insight into Immunopathology of Leishmaniasis. In: **Pathobiology of Parasitic Protozoa: Dynamics and Dimensions**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 217-229.

CORONA-ESPAÑA, A. M. *et al.* Phytochemicals from Secondary Metabolism and Their Role as Antioxidant and Anti-Inflammatory Molecules. 2024.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune responses in leishmaniasis: an overview. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 2022.

D’ALESSANDRO, S. *et al.* Leishmania promastigotes enhance neutrophil recruitment through the production of CXCL8 by endothelial cells. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1380, 2021.

DAS CHAGAS, B. D. *et al.* Interspecies and intrastrain interplay among Leishmania spp. parasites. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1883, 2022.

DASH, S. K.; BENIVAL, D.; JINDAL, A. B. Formulation strategies to overcome amphotericin B induced toxicity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 21, n. 11, p. 5392-5412, 2024.

DEMARTA-GATSI, C.; MÉCHERI, S. Vector saliva controlled inflammatory response of the host may represent the Achilles heel during pathogen transmission. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, p. e20200155, 2021.

DHAR, R.; KUMAR, A.; KARMAKAR, S. Neglected tropical disease: Why we need to prioritize them more. **Asian Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 10, p. 1-2, 2022.

DIVENUTO, F. *et al.* Role of Treg, Breg and other cytokine sets in host protection and immunopathology during human leishmaniasis: Are they potential valuable markers in clinical settings and vaccine evaluation?. **Acta Tropica**, v. 240, p. 106849, 2023.

DWIVEDI, M. *et al.* A Review on the Epidemiology and Clinical Management of Neglected Tropical Diseases. **Infectious disorders drug targets**. 2024.

FRÉZARD, F. *et al.* Liposomal amphotericin B for treatment of leishmaniasis: from the identification of critical physicochemical attributes to the design of effective topical and oral formulations. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 99, 2022.

GABRIEL, A. *et al.* Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. **Journal of immunology research**, v. 2019, n. 1, p. 2603730, 2019.

GUPTA, N. *et al.* The future of antiparasitic therapy. In: **Advances in Antiparasitic Therapies and Drug Delivery**. Academic Press, 2024. p. 391-405.

HENDRICKX, S. *et al.* The challenges of effective leishmaniasis treatment. **Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments**, p. 193-206, 2018.

HORTA, M. F. *et al.* Cell invasion by intracellular parasites—the many roads to infection. **Journal of cell science**, v. 133, n. 4, p. jcs232488, 2020.

JAYASHANKAR, C. A. *et al.* Neglected Tropical Diseases: A Comprehensive Review. **Cureus**, v. 16, n. 2, 2024.

JUNIOR, D. G. J. Gaspar Vianna e a globalização da terapêutica das leishmanioses pelo tártaro emético (1912-1920). **Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical**, v. 23, p. 102-107, 2024.

KATO, K. C. *et al.* Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb (III) and protective effect of ascorbic acid. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481-488, 2014.

KESHAV, P.; GOYAL, D. K.; KAUR, S. Antileishmanial potential of immunomodulator gallic acid against experimental murine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 10-11, p. e12875, 2021.

KIP, A. E. *et al.* Clinical pharmacokinetics of systemically administered antileishmanial drugs. **Clinical pharmacokinetics**, v. 57, n. 2, p. 151-176, 2018.

LAINSON, R.. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, 2010.

LIMA, M. I. S. *et al.* Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. **Archives of toxicology**, v. 84, p. 227-232, 2010.

LONE, R. *et al.* Role of Phenolics in Plant–Microbe Interaction: A Review. **Plant Phenolics in Biotic Stress Management**, p. 1-33, 2024.

MANDERSON, L. *et al.* Social research on neglected diseases of poverty: continuing and emerging themes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. e332, 2009.

MARTINS, M. M. Leishmaniose Visceral. In: **Atlas de Hematologia: das células normais às modificações morfológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2016

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MATOS, A. P. S. *et al.* A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101664, 2020.

MELCÓN-FERNÁNDEZ, E. *et al.* In Vitro and Ex Vivo Synergistic Effect of Pyrvinium Pamoate Combined with Miltefosine and Paromomycin against Leishmania. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 2, p. 30, 2024.

MEURER, I. R.; COIMBRA, E. S. Doenças tropicais negligenciadas e o seu contexto no Brasil. **HU revista**, v. 48, p. 1-2, 2022.

MOHAMMAD, N. *et al.* comparison of efficacy of miltefosine versus meglumine antimonate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 849–853, 2022.

MOHAMMADZADEH, M.; BEHNAZ, F.; GOLSHAN, Z. Efficacy of glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in Central Iran. **Journal of infection and public health**, v. 6, n. 2, p. 120-124, 2013.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398-1404, 2015.

MORALES-PRIMO, A. U. *et al.* Th17 Cell and Inflammatory Infiltrate Interactions in Cutaneous Leishmaniasis: Unraveling Immunopathogenic Mechanisms. **Immune Network**, v. 24, n. 2, 2024.

MOREIRA, V. R. *et al.* Meglumine antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 10.1128/aac. 02360-16, 2017.

MUTOH, Y. *et al.* Safety and efficacy of reduced-dose pentamidine as second-line treatment for HIV-related pneumocystis pneumonia. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 11, p. 1192-1197, 2020.

NANDAN, D.; BRAR, H. K.; REINER, N. Manipulation of Macrophages: Emerging Mechanisms of Leishmaniasis. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 29, n. 8, p. 292, 2024.

NIEVA, C. A. B. *et al.* An appraisal of the scientific current situation and new perspectives in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 221, p. 105988, 2021.

OYEYEMI, O. T. *et al.* Neglected tropical disease (NTD) diagnostics: current development and operations to advance control. **Pathogens and Global Health**, v. 118, n. 1, p. 1-24, 2024.

PAL, R. *et al.* The role of natural anti-parasitic guided development of synthetic drugs for leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115609, 2023.

PASSELLI, K.; BILLION, O.; TACCHINI-COTTIER, F. The impact of neutrophil recruitment to the skin on the pathology induced by *Leishmania* infection. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 649348, 2021.

PEREA, J. R. A. Anfotericina B liposomal: farmacología clínica, farmacocinética y farmacodinamia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 38, n. 2, p. 52-55, 2021.

PICCICA, M. *et al.* Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review. **Journal of Travel Medicine**, v. 28, n. 6, p. taab065, 2021.

PRATYUSHA, S. Phenolic compounds in the plant development and defense: an overview. **Plant stress physiology-perspectives in agriculture**, p. 125-140, 2022.

RAFIQUE, Azhar *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. In: **Leishmania Parasites-Epidemiology, Immunopathology and Hosts**. IntechOpen, 2023.

ROATT, B. M. *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8965-8977, 2020.

SAHA, B.; SILVESTRE, R. Cytokines in the immunity and immunopathogenesis in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 145, p. 155320, 2021.

SANTARÉM, N.; CARDOSO, L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Advances in *Leishmania* Research: From Basic Parasite Biology to Disease Control. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 696, 2023.

SANTIAGO, A. S.; DA ROCHA PITA, S. S.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual ea necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021.

SCHRÖDER, N. T. *et al.* Neglected Diseases in Brazil: Space-Temporal Trends and Public Policies. 2023.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SERRANO-COLL, H. *et al.* Innate immune response: ally or enemy in cutaneous leishmaniasis?. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 5, p. ftab028, 2021.

STROPPIA, Pedro HF *et al.* Effect of 1, 2, 3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034-3045, 2017.

SUN, W.; SANDERSON, P. E.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug discovery today**, v. 21, n. 7, p. 1189-1195, 2016.

SUNDAR, S. *et al.* Investigational new drugs for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 33, n. 10, p. 1029-1046, 2024.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

TIWARI, N. *et al.* Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 26-41, 2018.

VAGHELA, S. H. *et al.* Amphotericin B: Insight into the advances in preclinical and clinical development. **Emergent Life Sciences Research**, v. 10, p. 55-71, 2024.

VAN DER MEIDE, W. F. *et al.* Evaluation of treatment with pentamidine for cutaneous leishmaniasis in Suriname. **International journal of dermatology**, v. 48, n. 1, p. 52-58, 2009.

WIJNANT, Gert-Jan *et al.* Tackling drug resistance and other causes of treatment failure in leishmaniasis. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, p. 837460, 2022.

YANG, P.; ZHOU, X. Ending the “Neglect” to End Neglected Tropical Diseases. **China CDC Weekly**, v. 4, n. 8, p. 153, 2022.

YASMIN, H. *et al.* Host–pathogen interaction in leishmaniasis: immune response and vaccination strategies. **Immuno**, v. 2, n. 1, p. 218-254, 2022.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo submetido na revista *Scientia Pharmaceutica*

Article

In vitro activity of gallic acid-paromomycin combination against *Leishmania guyanensis* and human cell lymphoproliferative primary immune response

Rebecca Sayuri Barbosa Hanada^{1,2}, Antonia Maria Ramos Franco Pereira^{1,2}, Juliana Cavalcante de Araújo¹, Laís Gomes da Silva¹, Mayara Arguello da Silva^{1,2}, Rafaela Benício Santana^{1,2}, Sandra Tuye Velaca², Claudio Lucas Santos Catão¹, Estela Yasmin Coelho Oliveira³, Yury Oliveira Chaves², Allyson Guimarães da Costa¹, Adriana Malheiro Alle Marie¹, José Fernando Marques Barcellos¹, Bruno Bezerra Jensen²

- ¹ Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil
² Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brazil
³ Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil
 * Correspondence: e-mail bruno.jensen@inpa.gov.br; Tel +55-92-98404-3590

Abstract

Cutaneous leishmaniasis remains a therapeutic challenge due to toxicity, parasitic resistance, and limitations of conventional drugs, making combination therapy with natural immunomodulatory compounds a promising strategy. This study evaluated the antileishmanial, cytotoxic, and immunomodulatory profile of the primary human immune response *in vitro* of the combination of gallic acid (GA) and paromomycin sulfate (PAR). The IC₅₀ values were determined in promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Viannia) guyanensis* and CC₅₀ in RAW 264.7 macrophages. In parallel, PBMCs from healthy volunteers (n=13) were stimulated for 72 h with GA, PAR, and GA+PAR or controls, evaluating lymphoproliferation (BrdU) and cytokine production (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A), followed by Spearman's correlation analysis. GA showed moderate activity against promastigotes and high efficacy against intracellular amastigotes (IC₅₀=11.4 μ M), as did GA+PAR (IC₅₀=20.5 μ M), while PAR alone showed limited activity. Glucantime® induced greater lymphoproliferation (61.5%) and a broad activation profile. GA preferentially modulated the TNF/IL-6 axis, PAR was associated with IL-10, and GA+PAR exhibited a balanced immune profile between proinflammatory and regulatory cytokines, without direct proliferative stimulation. Together, GA+PAR demonstrated antiparasitic efficacy and a complementary immunomodulatory pattern, reinforcing its potential as an

ANEXO B - Parecer do comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DE COMPOSTOS SINTÉTICOS FRENTE A CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA: ESTUDO IN VITRO.

Pesquisador: Mayara Arguello da Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 81512524.3.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 7.069.426

Apresentação do Projeto:

Informações retiradas dos documentos
PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2342315.pdf 19/08/2024 17:14:40:

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é vista pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das principais DTNs por seu grande impacto socioeconômico e por contribuir significativamente com a discriminação das pessoas infectadas (ALVAR et al., 2012; LUNA e CAMPOS, 2020). Assim como outras doenças da pele, onde as lesões surgem frequentemente em áreas expostas do corpo, a LTA é extremamente prejudicial à qualidade de vida dos pacientes, visto que aproximadamente 50% das lesões da infecção estão localizadas na face, podendo acarretar consequências psicológicas, tais como baixa autoestima e depressão (KARIMKHANI, 2016; PACHECO et al., 2017). Com relação ao tratamento contra a LTA preconizado pelo Ministério da saúde, é baseado na utilização de cinco medicamentos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e sua formulação lipossômica, a mitelfosina, a paramomicina e a pentamidina (SANTIGAGO et al., 2021). Por se tratar de medicamentos por via parenteral, de longa duração e com alta toxicidade, esta realidade pode favorecer o abandono do tratamento, bem como, o surgimento de cepas resistentes (TIWARI et al., 2018). Devido afetarem, principalmente, as pessoas de baixa renda, a indústria farmacêutica se opõe

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

a desenvolver medicamentos novos e potentes para o tratamento de doenças como a LTA (MITRA e MASON, 2017). Para mudar esse cenário, os produtos naturais e fitoterápicos vêm apresentando resultados satisfatórios em experimentos e estão sendo novos alvos para a busca de alternativas terapêuticas para o tratamento da Leishmaniose cutânea (LC). Esta é uma prática já realizada em regiões rurais onde existe escassez de antimoniais nas unidades, obrigando os pacientes a optarem por utilizar de recursos naturais ou práticas culturais na tentativa da cicatrização das lesões. Além do mais, os produtos naturais constituem materiais sustentáveis e baratos (CARRILLO-BONILLA et al., 2014). A lausona (2-hidroxi-1,4- naftoquinona), por exemplo, é uma quinona isolada da planta Henna (*Lawsonia inermis*) e é comumente utilizada para fins cosméticos. Contudo, em estudo in vitro com amastigotas e promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a Lausona apresentou baixa toxicidade para macrófagos e maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Ademais, regulou positivamente a produção de citocinas, como interleucina- 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF α) (MEIRA et al., 2023). A *Libidibia ferrea*, comumente conhecida como Jucá, também se mostrou promissora como tratamento alternativo para LC. Jensen (2020), observou que bioativos derivados da *L. ferrea* apresentaram resultados antileishmania. Da mesma forma, Silva et al. (2021), observaram que a Fração Diclorometano obtida da *L. ferrea* desempenhou importante ação indutora da linfoproliferação. Dentre os compostos identificados da Fração Diclorometano, foi isolado o metil galato, composto já descrito na literatura por sua ação imunomoduladora, a qual mostrou atividade frente ao parasito *Leishmania (L.) amazonensis*. Em outro estudo, a Fração Diclorometano apresentou alta viabilidade celular, aspecto bastante positivo diante da elevada toxicidade apresentada por outros produtos vegetais (NOLETO et al.; JENSEN, 2020). Considerando o tratamento da LTA e os problemas relacionados à sua eficácia, eventos adversos e sua disponibilidade em áreas remotas, há a necessidade da busca por novos medicamentos (WEIGEL e ARMIJOS, 2001).

Hipótese: Este estudo pode potencialmente servir como base para aprimorar o diagnóstico, atendimento, acompanhamento e, sobretudo, o tratamento dos indivíduos afetados pela LC nos serviços públicos de saúde. As substâncias provenientes de recursos naturais, como a quinona Lausona e metilgalato, são grandes candidatas para tratamentos alternativos de algumas doenças, assim como a LTA, visto que se mostram como uma opção de baixo custo, eficazes e com baixa toxicidade. Nesse sentido, acredita-se que estas substâncias podem apresentar atividade imunomoduladora e contribuir positivamente com o tratamento de pacientes com

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

LTA.

Metodologia Proposta: No presente estudo, os participantes serão divididos em dois grupos distintos. O Grupo 1 (Primoinfectados), que consiste em indivíduos recém diagnosticados com Leishmaniose Cutânea (LC), sem tratamento prévio, provenientes da região de Rio Preto da Eva - AM. Para este grupo, serão realizadas coletas de material biológico, incluindo amostras de sangue e escarificação da lesão, a fim de obter informações relevantes sobre a infecção. As amostras biológicas (sangue e escarificação da lesão) serão oriundas de pacientes atendidos nas Unidades Básicas de Saúde (UBS): Ednaide Lopes da Costa, Maria de Lourdes da Costa Azevedo e Manoel Rumão, do município de Rio Preto da EVA-AM. Por outro lado, o Grupo 2 (Voluntários sem LC) composto por voluntários sem infecção por LC, residentes na área de Manaus, que irão ao laboratório parceiro de análises clínicas LabMaster Medical Center para exames de rotina ou seguimento de saúde. Neste grupo, irão ser coletadas amostras de sangue para análises comparativas, servindo de grupo controle para o estudo. Serão incluídos na pesquisa voluntários de dois grupos: Primoinfectados com LTA sem tratamento prévio (n=38), e Voluntários sem LC (n=38). Abaixo, detalharemos os procedimentos realizados com ambos os grupos. O projeto se dará com a execução de atividades em campo que envolve o deslocamento da equipe de pesquisadores até o município de Rio Preto da Eva (AM) para prestar atendimento nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de referência à população infectada por leishmaniose Cutânea (LC) no município. Durante essa etapa, a equipe realizará atividades de educação em saúde a respeito da doença, nas recepções e salas de espera das respectivas unidades com anuência da Secretária Municipal de Rio Preto da Eva (Anexo A). Após cada atividade de educação em saúde, será feito um convite cordial à população presente para participar voluntariamente de nossa pesquisa. Os interessados em participar e que apresentarem lesão cutânea suspeita da infecção por *Leishmania* spp., receberão informações detalhadas sobre a pesquisa, destacando sua relevância e os procedimentos envolvidos. Será explicado o objetivo do estudo, os métodos que serão utilizados e os potenciais benefícios para a comunidade. Além disso, os participantes terão a oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas que possam surgir. Caso decidam participar da pesquisa será solicitado que leiam e compreendam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). Este documento fornecerá informações adicionais sobre os direitos do participante, os procedimentos da pesquisa e os potenciais riscos envolvidos. Somente após o entendimento completo e a concordância voluntária, o participante será convidado a assinar o TCLE,

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

indicando seu consentimento para participar da pesquisa. Após a assinatura do TCLE, os participantes serão submetidos a uma entrevista epidemiológica (Anexo C). Este questionário coleta informações sobre uma variedade de fatores relevantes para o estudo. Isso inclui informações demográficas, histórico de infecção, conhecimento prévio sobre a Leishmaniose, histórico médico pessoal e outros fatores. Ao longo da entrevista, os participantes terão a oportunidade de compartilhar seus conhecimentos, experiências e percepções, contribuindo para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença nesta comunidade. A próxima etapa consiste na realização do exame de diagnóstico da LC. O exame envolve a pesquisa direta do parasito através da escarificação da lesão.

Critério de Inclusão: Critérios de inclusão dos indivíduos nos grupos de pacientes com LC- Grupo 1): Indivíduos de dezoito a 59 anos de idade, independente de sexo e orientação sexual, independente de cor/raça, independente de etnia, que aceite participar do projeto e assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e ser portador de Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania* spp., conforme os critérios clínicos e parasitológicos especificados a seguir: $\checkmark$ Indivíduos com casos confirmados de Leishmaniose Cutânea (LC); $\checkmark$ Indivíduos sem tratamento anterior para a infecção por *Leishmania* spp.; $\checkmark$ Apresentação clínica compatível com LC em atividade. Aspectos parasitológicos, raspado cutâneo será coletado apenas uma vez (e distribuído em duas lâminas, uma para diagnóstico (UBS) e outra para caracterização das espécies no laboratório de leishmaniose e doença de chagas- INPA. $\checkmark$ Visualização de amastigotas de *Leishmania* sp. no exame direto, e/ou; $\checkmark$ Visualização de promastigotas de *Leishmania* sp. na cultura.

Crítérios de inclusão dos indivíduos do Grupo 2 $\checkmark$ Indivíduo independente de sexo e/ou orientação sexual, de dezoito a 59 anos de idade, que não apresentem manifestações clínicas de desenvolvimento de lesões causadas por *Leishmania*; não ter frequentado áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar nos últimos quinze dias anteriores; indivíduo que aceite participar do projeto e assine Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critério de Exclusão: Critérios de exclusão dos indivíduos nos grupos de pacientes com LC- Grupo 1) $\checkmark$ Gestantes. $\checkmark$ Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossuppressores; $\checkmark$ Comorbidades como Diabetes; $\checkmark$ Diagnóstico conhecido de doenças autoimunes.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

Critérios de exclusão dos indivíduos do Grupo 2: Exclusão: Gestantes. Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores; Comorbidades como Diabetes; Diagnóstico conhecido de doenças autoimunes;

Tamanho da Amostra: 76 participantes

De acordo com o Cronograma de Execução, a coleta de dados através do atendimento presencial na UBS em Rio Preto da Eva ocorrerá no período de 01/10/2024 a 30/01/2025. Orçamento Financeiro prevê um custo de R\$ R\$ 24.482,28, e será financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador principal no documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2342315.pdf19/08/2024 17:14:40, os objetivos do estudo são:

Objetivo Primário: Este trabalho tem como objetivo elucidar a atividade imunomodulatória in vitro em resposta a quinona Lausona e metil-galato com PBMCs de pacientes com LC e espécies de Leishmania spp. prevalentes no Amazonas, a fim de entender o potencial terapêutico destes bioativos em relação a sua atividade antileishmania

Objetivo Secundário:

- Avaliar o potencial linfoproliferativo e produção de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-1b, IL-10 e IL-4) induzidas pelo metil-galato e 2-Hidroxi-1,4 Naftoquinona em PBMCs de paciente com leishmaniose cutânea;
- Investigar a resposta imune celular in vitro a partir de antígenos solúveis de Leishmania (V.) guyanensis de pacientes com leishmaniose;
- Caracterizar a nível de espécie as cepas isoladas de pacientes com LC residentes em Rio Preto da Eva, AM.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos Grupo 1 (Primoinfectados): Durante a coleta de sangue, o voluntário poderá sentir dor

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

ou desconforto no momento da punção com a agulha. Além disso, é possível que sinta uma leve pressão na área onde o sangue está sendo coletado. Após o procedimento, poderá notar um leve formigamento ou sensação de peso no braço, o que é comum e tende a desaparecer rapidamente. Em alguns casos, pode ocorrer uma pequena mancha roxa no local onde a agulha foi inserida, mas isso geralmente desaparece em poucos dias. Em vista da segurança dos voluntários e também da coleta, verificaremos os sinais vitais de cada um deles como: pressão arterial, temperatura, frequência cardíaca e respiratória, verificando se o mesmo encontra-se em condições, antes de começarmos a coleta. Será realizado também um procedimento chamado “escarificação” da lesão. As lesões cutâneas serão escarificadas usando uma técnica estéril, com bisturi para fazer uma raspagem nas bordas da lesão, permitindo a coleta de amostras de tecido para análise posterior. Após a escarificação, amostras do tecido da lesão são coletadas. Isso pode ser feito raspando suavemente a área escarificada com uma espátula estéril ou coletando fluido ou exsudato da lesão. O procedimento é rápido e seguro, mas pode desencadear um pequeno sangramento na lesão, que rapidamente se estanca.

Riscos Grupo 2 (Voluntários sem LC): Durante a coleta de sangue, o voluntário poderá sentir dor ou desconforto no momento da punção com a agulha. Além disso, é possível que sinta uma leve pressão na área onde o sangue está sendo coletado. Após o procedimento, poderá notar um leve formigamento ou sensação de peso no braço, o que é comum e tende a desaparecer rapidamente. Em alguns casos, pode ocorrer uma pequena mancha roxa no local onde a agulha foi inserida, mas isso geralmente desaparece em poucos dias.

Risco para a equipe: Quanto aos riscos para equipe de pesquisadores, são quanto ao manuseio de materiais perfurocortantes, porém o desempenho da técnica na sala de procedimentos da UBS favorece um espaço adequado, e os membros da equipe responsáveis pela coleta estarão devidamente paramentados com equipamentos proteção individual- EPIs (luvas, touca, jaleco descartável, máscara e óculos).

Benefícios: Em vista da segurança dos voluntários e também da coleta, verificaremos os sinais vitais de cada um deles como: pressão arterial, temperatura, frequência cardíaca e respiratória, verificando se o mesmo encontra-se em condições, antes de começarmos a coleta. Para minimizar esses riscos, serão tomadas todas as precauções e cuidados necessários para garantir a segurança do paciente e da equipe durante os procedimentos, tanto da coleta

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

sanguínea quanto da escarificação da lesão de Leishmaniose Cutânea (LC). Os procedimentos serão realizados de forma a minimizar riscos de infecção por microrganismos e desconfortos ao paciente, em conformidade com as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Para minimizar os riscos psicossociais, os membros da equipe que executará esta etapa serão previamente treinados pela pesquisadora responsável, a qual é enfermeira com vasta experiência nestes tipos de procedimentos. Os voluntários serão orientados a evitar o carregamento de peso imediatamente após a coleta. A escarificação da lesão, realizada por profissional habilitado, será conduzida de maneira menos traumática, respeitando o tempo e o conforto do paciente. Benefícios para os dois grupos será a educação em saúde, informações sobre a LC que por ser uma DTN impacta o indivíduo de forma biopsicossocial. Além disso, essa pesquisa contribuirá para a compreensão de aspectos clínicos e imunológicos relacionados ao tratamento e cicatrização das lesões da LC. Essa contribuição favorece futuras abordagens terapêuticas com menos efeitos colaterais e adversos, de fácil aplicação e menor tempo de tratamento, visando a redução do abandono ao tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa, cuja a instituição proponente é a Universidade Federal do Amazonas, e tem como responsável principal Mayara Arguello da Silva, e os pesquisadores assistentes Antonia Maria Ramos Franco, José Fernando Marques Barcellos, Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, Rafaela Benício Santana e Erika Oliveira da Silva, todas do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas. O projeto de pesquisa trata-se da dissertação de mestrado da responsável principal, que tem como orientador o Prof. Dr. José Fernando Marques Barcellos. A folha de rosto foi assinada pela pesquisadora responsável, Mayara Arguello da Silva e pelo coordenador do PPGIBA/UFAM, o Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

FOLHA DE ROSTO: ADEQUADA. Apresentado no documento Folhaderostocp.pdf26/06/2024 11:42:41

TCLE: ADEQUADO. Apresentado nos documentos TCLECONTROLENEGATIVO.pdf19/08/2024 16:57:55 e TCLEPRIMOINFECTADO.pdf19/08/2024 16:57:32

TERMO DE ANUÊNCIA: ADEQUADO. Apresentado nos documentos anuenciasemdariopreto.pdf 20/06/2024 12:36:38, declaracaooufamlabhistologia.pdf17/05/202417:09:27, SEIufamlabimuno.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 7.069.426

pdf20/06/2024 12:34:11, cosas.pdf17/05/2024 17:12:25, anuencialabmaster.pdf 20/06/2024 12:37:39 e
nuencialableish.pdf20/06/2024 12:38:14

TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ADEQUADO. Apresentado no
documento declaracaooespesquisadores.pdf17/05/2024 17:04:08 e
Declaracaopesquisadorprincipalassinado.pdf26/06/2024 12:32:52

Recomendações:

Este CEP analisa os aspectos éticos da pesquisa com base nas Resoluções 466/2012-CNS, 510/2016-CNS
e outras complementares. A aprovação do protocolo neste Comitê NÃO SOBREPÕE eventuais restrições ao
início da pesquisa estabelecidas pelas autoridades competentes, devido à pandemia de COVID-19. O
pesquisador (a) deve analisar a pertinência do início, segundo regras de sua instituição ou
instituições/autoridades sanitárias locais, municipais, estaduais ou federais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O comitê de ética da UFAM analisou o presente a emenda e entendeu que a mesma está dentro das
normas do comitê e das normas vigentes do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde estando o
mesmo APROVADO, lembrando ao pesquisador principal da obrigatoriedade de cumprir o cronograma e o
envio do relatório final na data prevista. Caso a pesquisa não seja concluída no prazo estipulado, o
pesquisador deve enviar o relatório parcial.

O(A) pesquisador(a) deve enviar por Notificação os relatórios parciais e final. (item XI.d. da Res 466/2012-
CNS), por meio da Plataforma Brasil e manter seu cronograma atualizado, solicitando por Emenda eventuais
alterações antes da finalização do prazo inicialmente previsto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP analisa os aspectos éticos da pesquisa com base nas Resoluções 466/2012-CNS, 510/2016-CNS
e outras complementares. A aprovação do protocolo neste Comitê NÃO SOBREPÕE eventuais restrições ao
início da pesquisa estabelecidas pelas autoridades competentes, devido à pandemia de COVID-19. O
pesquisador (a) deve analisar a pertinência do início, segundo regras de sua instituição ou
instituições/autoridades sanitárias locais, municipais, estaduais ou federais.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM**



Continuação do Parecer: 7.069.426

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2342315.pdf	19/08/2024 17:14:40		Aceito
Outros	RECURSOFAPEAM.pdf	19/08/2024 17:13:10	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	CartaRespostaCEP.pdf	19/08/2024 17:10:29	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Brochura Pesquisa	BrochuraATUALIZADA.pdf	19/08/2024 16:59:50	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODETALHADO.pdf	19/08/2024 16:59:06	Mayara Arguello da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECONTROLENEGATIVO.pdf	19/08/2024 16:57:55	Mayara Arguello da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPRIMOINFECTADO.pdf	19/08/2024 16:57:32	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	Declaracaopesquisadorprincipalassinado.pdf	05/08/2024 18:34:59	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	declaracaoressarcimento.pdf	26/06/2024 12:01:32	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	declaracaofapeam.pdf	26/06/2024 11:56:58	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostocep.pdf	26/06/2024 11:42:41	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	DeclaracaovinculoMay.pdf	20/06/2024 13:28:03	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	declaracaocoordenadorprojetofinaceiro.pdf	20/06/2024 13:26:58	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	anuencialableish.pdf	20/06/2024 12:38:14	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	anuencialabmaster.pdf	20/06/2024 12:37:39	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	anunciasemdariopreto.pdf	20/06/2024 12:36:38	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SElufamlabimuno.pdf	20/06/2024 12:34:11	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	CorenMay.pdf	20/06/2024 12:32:33	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Outros	retornosbeneficiosaosparticipantes.pdf	20/06/2024 12:29:24	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Cronograma	cronogramaCEP.pdf	20/06/2024 12:26:18	Mayara Arguello da Silva	Aceito

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 7.069.426

Orçamento	orcamento.pdf	20/06/2024 12:23:15	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cosas.pdf	17/05/2024 17:12:25	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaooufamlabhistologia.pdf	17/05/2024 17:09:27	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobancolableish.pdf	17/05/2024 17:07:36	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaoopesquisadores.pdf	17/05/2024 17:04:08	Mayara Arguello da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologico.pdf	17/05/2024 16:55:46	Mayara Arguello da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 12 de Setembro de 2024

Assinado por:

Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

ANEXO C – Certificado de Apresentação de Resumo em Congresso



22 a 25
setembro 2024

Certificamos que o trabalho intitulado

Avaliação in vitro da atividade antileishmania e citotóxica do metil galato associado aos tratamentos convencionais da Leishmaniose tegumentar

de autoria de **Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, Bruno Bezerra Jensen, Richaelly Pinheiro dos Santos, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Juliana Maria de Moraes, Antonia Maria Ramos Franco** foi apresentado por Rebecca Sayuri Barbosa Hanada no **59º MEDTROP - Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, realizado no Centro de Convenções Rebouças, de 22 a 25 de setembro de 2024, na forma de apresentação **E-pôster**.

São Paulo, 25 de setembro de 2024.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse: validacertificados.iweventos.com.br e use o código: 66720f47c5


Prof. Dr. Marcus Vinicius Lacerda
Coordenador da Comissão Científica


Profa. Dra. Hiro Goto
Presidente do MEDTROP 2024


Rosália Moraes Torres
Presidente SBMT

Reuniões Satélites



Realização

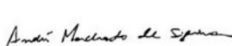


Certificamos que o trabalho intitulado **"Efeitos imunomoduladores da combinação entre ácido gálico e sulfato de paromomicina em PBMCs na Leishmaniose Tegumentar"**, cujos autores são: Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, Juliana Cavalcante de Araújo, Laís Gomes da Silva, José Fernando Marques Barcellos, Bruno Bezerra Jensen, Mayara Arguello da Silva, Rafaela Benício Santana, Juliana Maria de Moraes, Afrânio de Lima Carvalho, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Francineire Gomes Pinheiro, Estefanny Souza de Sá, Marcella Jales Cavalcante, Sandra Tuye Velaca, Fabiane de Souza Tapajo Viana, Antonia Maria Ramos Franco Pereira, foi **APRESENTADO** na modalidade **E-pôster**, no **60º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP 2025**, realizado no período de 02 a 05 de novembro de 2025, no Centro de Convenções de João Pessoa, Paraíba, Brasil.

João Pessoa/PB, 05 de novembro de 2025.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse <https://validacertificados.iweventos.com.br> e use o código: 4571b5e66e


Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Presidente do MEDTROP 2025


Dr. Andre Machado de Siqueira
Coordenador da Comissão Científica
do MEDTROP 2025


Dra. Rosália Moraes Torres
Presidente da SBMT

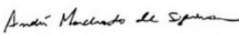


Certificamos que o trabalho intitulado "**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTILEISHMANIA DO ÁCIDO GÁLICO E SEUS EFEITOS COMBINADOS COM SULFATO DE PAROMOMICINA EM *Leishmania guyanensis***", cujos autores são: Juliana Cavalcante de Araújo, Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, Antonia Maria Ramos Franco Pereira, Laís Gomes da Silva, Marcella Jales Cavalcante, Fabiane de Souza Tapajós Viana, Sandra Tuye Velaca, Estefanny Souza de Sá, Paulo Ricardo Silva do Nascimento, Mayara Arguello da Silva, Rafaela Benício Santana, Paula Figliuolo da Cruz Borges, Francimeire Gomes Pinheiro, Bruno Bezerra Jensen, foi **APRESENTADO** na modalidade **E-pôster**, no **60º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP 2025**, realizado no período de 02 a 05 de novembro de 2025, no Centro de Convenções de João Pessoa, Paraíba, Brasil.

João Pessoa/PB, 05 de novembro de 2025.

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse <https://validacertificados.iweventos.com.br> e use o código: cde1910d1c


Dr. Sinval Pinto Brandão Filho
Presidente do MEDTROP 2025


Dr. Andre Machado de Siqueira
Coordenador da Comissão Científica
do MEDTROP 2025


Dra. Rosália Moraes Torres
Presidente da SBMT