



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

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
COORDENAÇÃO DE SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE – COSAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LINFOPROLIFERATIVA DO METIL
GALATO FRENTE A CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO
(PBMCs) DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

MAYARA ARGUELLO DA SILVA

MANAUS, AMAZONAS

SETEMBRO / 2025



UFAM



MAYARA ARGUELLO DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LINFOPROLIFERATIVA DO METIL
GALATO FRENTE A CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO
(PBMCs) DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Antônia Maria Ramos Franco Pereira, PhD

Coorientadores: Erika Oliveira da Silva, PhD
Bruno Bezerra Jensen, PhD

MANAUS, AMAZONAS

SETEMBRO / 2025



UFAM

Ficha Catalográfica

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

-
- S586a Silva, Mayara Arguello da
Avaliação in vitro da atividade linfoproliferativa do metil galato frente a células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com leishmaniose cutânea / Mayara Arguello da Silva. - 2025.
102 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Antonia Maria Ramos Franco Pereira.
Coorientador(a): Erika Oliveira da Silva.
Coorientador(a): Bruno Bezerra Jensen.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2025.
1. Doenças tropicais negligenciadas. 2. compostos fenólicos. 3. linfoproliferação. 4. leishmaniose. I. Pereira, Antonia Maria Ramos Franco. II. Silva, Erika Oliveira da. III. Jensen, Bruno Bezerra. IV. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. V. Título
-

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida e sabedoria, pela graça de chegar até aqui e pela força nos momentos de maior desafio. À minha orientadora, Antônia Maria Ramos Franco Pereira, e aos meus coorientadores Erika Oliveira da Silva e Bruno Bezerra Jensen, pela paciência, dedicação e pelo exemplo de profissionalismo e humanidade. Aos professores e membros da banca, pelas valiosas sugestões e pela contribuição para o enriquecimento deste trabalho;

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela oportunidade de crescimento acadêmico. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que tornou possível o desenvolvimento desta pesquisa;

À equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, pela partilha de conhecimentos, pela colaboração nos experimentos e pela amizade que tornou o percurso mais leve;

A minha família, em especial a meus pais e irmãos pelo amor incondicional, incentivo constante e compreensão diante das minhas ausências. Vocês são minha base e meu maior motivo de perseverança;

Aos amigos que estiveram presentes com palavras de encorajamento e gestos de carinho, e à Congregação das Irmãs Catequistas Franciscanas - CICAF, por todo apoio, carinho e incentivo;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação se concretizasse, registro aqui minha eterna gratidão.

“Se você não tivesse capacidade, Deus não te daria a oportunidade. Seus medos você já conhece, experimente suas coragens.”

(Santa Teresinha do Menino Jesus)



UFAM

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Diante das limitações dos tratamentos atuais para a LTA, que incluem efeitos adversos significativos e baixa disponibilidade em áreas remotas, torna-se indispensável a busca por novas alternativas terapêuticas. Os recursos naturais têm demonstrado resultados promissores em estudos experimentais e vêm sendo explorados como potenciais estratégias no tratamento das leishmanioses. Neste estudo, foram coletadas amostras biológicas de 20 voluntários, sendo 10 pacientes com diagnóstico confirmado de Leishmaniose Cutânea (LC), sem tratamento prévio, residentes no município de Rio Preto da Eva (AM), e 10 indivíduos sem histórico de infecção por leishmaniose, moradores de Manaus (AM). As amostras sanguíneas foram utilizadas para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), submetidas a experimentos *in vitro* com metil galato (MG). As análises incluíram a avaliação da resposta linfoproliferativa e a caracterização molecular dos isolados de *Leishmania* das lesões por qPCR. Nos pacientes primo-infectados (Gr1), a concentração de 54 µg/mL do MG induziu uma linfoproliferação média de 30%, valor semelhante ao observado com Glucantime® (34%). O controle positivo com fito-hemaglutinina (PHA) promoveu 92% de resposta, confirmando a viabilidade celular. No grupo controle/Gr2 (voluntários saudáveis), o MG induziu em média 51% de linfoproliferação, Glucantime® 63% e PHA 87%, com diferenças estatisticamente significativas entre os estímulos ($p < 0,0001$ para pacientes; $p = 0,0102$ para controles). A caracterização molecular das amostras biológicas isoladas dos 10 pacientes diagnosticados com LC, revelou 100% dos casos ocasionados por *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. Os resultados obtidos demonstram que o MG na concentração utilizada, apresenta atividade linfoproliferativa relevante *in vitro* frente as PBMCs de pacientes com LC e em voluntários saudáveis demonstrando a potencial capacidade de atuar nos mecanismos da resposta imune, estimulando uma resposta natural nos voluntários sadios e até mesmo específica (resposta imune adaptativa) em pacientes com LC, indicando o MG como alternativa terapêutica contra a LTA. Este estudo evidencia a importância da continuidade das investigações com a substância MG, destacando a necessidade de caracterizar sua atividade imunomodulatória em células do sistema imune humano, por meio de imunofenotipagem e da análise dos níveis de expressão de citocinas, como IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF β e IL-17.

Palavras-chave: Doenças tropicais negligenciadas; compostos fenólicos; linfoproliferação; leishmaniose.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is considered by the World Health Organization (WHO) as one of the most important Neglected Tropical Diseases (NTDs). Due to the limitations of current treatments for ATL, which include significant adverse effects and low availability in remote areas, the search for new therapeutic alternatives is essential. Natural products have shown promising results in experimental studies and are being explored as potential strategies for the treatment of leishmaniasis. In this study, biological samples were collected from 20 volunteers, including 10 patients with confirmed diagnosis of cutaneous leishmaniasis (CL), without prior treatment, living in the municipality of Rio Preto da Eva (AM), and 10 healthy individuals with no history of leishmaniasis, residents of Manaus (AM). Blood samples were used to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which were subjected to in vitro experiments with methyl gallate (MG). Analyses included the evaluation of lymphoproliferative responses and molecular characterization of *Leishmania* isolates from lesions by qPCR. In newly infected patients (Gr1), MG at 54 µg/mL induced an average lymphoproliferation of 30%, a value similar to that observed with Glucantime® (34%). The positive control with phytohemagglutinin (PHA) induced 92% response, confirming cell viability. In the control group/Gr2 (healthy volunteers), MG induced on average 51% of lymphoproliferation, Glucantime® 63%, and PHA 87%, with statistically significant differences among stimuli ($p < 0.0001$ for patients; $p = 0.0102$ for controls). Molecular characterization of biological isolates from the 10 CL patients revealed 100% of cases caused by *Leishmania* (Viannia) guyanensis. The results demonstrate that MG, at the tested concentration, presents moderate and relevant in vitro lymphoproliferative activity against PBMCs from CL patients and healthy volunteers, suggesting its potential ability to modulate immune mechanisms by stimulating a natural response in healthy individuals and even a specific (adaptive immune response) in CL patients. These findings support the potential of MG as a therapeutic alternative against ATL. This study highlights the importance of continuing research with the substance MG, emphasizing the need to characterize its immunomodulatory activity in human immune system cells through immunophenotyping and the analysis of cytokine expression levels, such as IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF β , and IL-17.

Keywords: neglected tropical diseases; phenolic compounds; lymphoproliferation; leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imunopatogenia da Leishmaniose Cutânea (LC).

Figura 2- Linha do tempo do tratamento disponível para a Leishmaniose Tegumentar, preconizado pelo Ministério da Saúde.

Figura 3- Contribuições do Laboratório de Leishmaniose na Pesquisa Farmacológica da *Leishmania ferrea*.

Figura 4- Fluxograma das etapas do projeto, desde a coleta do material biológico até os experimentos *in vitro*.

Figura 5- Atividades de trabalho de pacientes infectados com *Leishmania (Viannia) guyanensis* no município de Rio Preto da Eva, AM, BR.

Figura 6- Mapa de localização das Unidades Básicas de Saúde (UBS) de interesse e a distribuição dos pontos de infecção no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas, Brasil.

Figura 7- Diversidade de lesões cutâneas em pacientes infectados com *Leishmania (Viannia) guyanensis* no município de Rio Preto da Eva - AM, BR.

Figura 8- Atividade linfoproliferativa de pacientes primariamente infectados, em resposta à estimulação com Metil Galato (M.G), Glucantime® (GLU) e células não estimuladas (CNe).

Figura 9- Atividade linfoproliferativa de linfócitos T de voluntários sem histórico de infecção por *Leishmania-VsHI*, em resposta à estimulação por Metil Galato - M.G, Glucantime® - GLU e células não estimuladas – CNe.

Figura 10- Comparação da atividade linfoproliferativa de linfócitos T de voluntários sem histórico de infecção por *Leishmania-VsHI* em contraste com pacientes primariamente infectados em resposta à estimulação por Methyl Gallate- M.G, Glucantime® - GLU e células não estimuladas-CNe.



UFAM

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados clínico-epidemiológicos de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* no Amazonas, Brasil. 32.



UFAM

ABREVIATURAS E SIGLAS

AM - Amazonas

CD4+ - Marcador de Linfócito T CD4

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

CEP - Comitê de ética em pesquisa

DC - Células Dendríticas

DNDi - Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC - Concentração inibitória

IFN- γ - Interferon-gama

iNOS - óxido nítrico-sintase induzida

INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

LC - Leishmaniose cutânea

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

MMII - Membros inferiores

MMSS - Membros superiores

MS - Ministério da Saúde

MG - Metil Galato

NNN - Neal, Novy e Nicolle

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

PHA - Fitohemaglutinina

RPMI 1640 - Rosewell Park Memorial Institute medium 1640

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

Th1 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 1

Th17 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 17

Th2 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UBS - Unidade Básica de Saúde

WHO - World Health Organization

qPCR - Polymerase Chain Reaction, em tempo real



UFAM

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Características da Leishmaniose Cutânea.....	11
2.1.1 Epidemiologia.....	12
2.1.2 Mecanismos de transmissão e infecção	12
2.1.3 Resposta Imune.....	13
2.1.4 Mecanismos na infecção por <i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	15
2.1.5 Diagnóstico.....	16
2.1.6 Histórico do tratamento da leishmaniose tegumentar.....	16
2.1.7 Compostos fenólicos como alternativas terapêuticas - Metil galato	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Instituições envolvidas no projeto	21
4.2 Coorte do estudo e coleta de dados	22
4.3 Recrutamento e procedimentos realizados com o grupo dos primoinfectados com Leishmaniose Cutânea – Grupo 1.....	23
4.4 Exames de diagnóstico parasitológico para leishmaniose cutânea e coleta de sangue	24
4.5 Identificação molecular dos isolados de eishmania por PCR em tempo real	25
4.6 Recrutamento de Voluntários saudáveis sem histórico de leishmaniose cutânea – Grupo 2	26
4.7 Critérios de Inclusão e exclusão dos Indivíduos no Grupo 1	27
4.7.1 Critérios de Inclusão.....	27
4.7.2 Critérios de Exclusão.....	27
4.8 Critérios De Inclusão e Exclusão dos Indivíduos do Grupo 2.....	27
4.8.1 Critérios de Inclusão	27
4.8.2 Critérios de Exclusão.....	28
4.9 Experimentos in vitro de linfoproliferação.....	28
4.9.1 Obtenção de Células PBMCs	28
4.9.2 Preparo de Placas para Proliferação Celular.....	28
4.9.3 Ensaio de Proliferação Celular	29
4.10 Análise Estatística.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Caracterização clínica epidemiológica	30
5.2 Resposta linfoproliferativa em PBMCs	35
6 CONCLUSÃO.....	38
7 PERSPECTIVAS.....	39
8 REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	53



UFAM

APÊNDICE A – FOLDER EDUCATIVO.....	53
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO.....	54
APÊNDICE C – ARTIGO PRODUZIDO PELA AUTORA, EM FASE DE SUBMISSÃO	57
ANEXOS	82
ANEXO A – PARECER DO CEP/UFAM.....	82
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE): GRUPO 1.....	92
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE): GRUPO 2.....	97



UFAM

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antroponozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, configurando um importante problema de saúde pública. Classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), recebem historicamente baixos investimentos em prevenção, controle e tratamento, afetando de forma desproporcional populações em maior vulnerabilidade social, com limitado acesso aos serviços de saúde^{1,2}. Fatores como desmatamento, urbanização desordenada e mudanças climáticas têm contribuído para a expansão das áreas endêmicas.³

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é endêmica em mais de 70 países. Em 2010, a OMS estimou a ocorrência de 600 mil a 1 milhão de novos casos anuais.² De acordo com dados do Ministério da Saúde, o Brasil notificou aproximadamente 13.000 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em 2023. A Região Norte concentrou 5.927 registros, destacando-se o estado do Pará, responsável por 2.374 casos, seguido pelo Amazonas, que contabilizou 1.295 notificações.⁴

O curso clínico da doença depende de múltiplos fatores relacionados ao parasito e/ou hospedeiro, destacando-se a resposta imunológica frente à espécie de *Leishmania* envolvida. As manifestações clínicas variam desde infecções assintomáticas até formas severas, como lesões cutâneas localizadas (LC), úlceras mucocutâneas (LMC) de caráter mutilante e formas difusas ou disseminadas.⁵

A resposta imunológica compreende a atuação conjunta da imunidade inata e a adaptativa. A primeira é responsável pelo reconhecimento inicial e contenção da infecção, envolvendo células como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Embora os macrófagos fagocitem o parasito, a *Leishmania* possui a capacidade de sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos. Para isso, o parasito utiliza mecanismos que subvertem as vias microbicidas dessas células, como a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico (NO).^{6,7}

Na imunidade adaptativa, o perfil de citocinas e a predominância de subpopulações específicas de linfócitos T, como Th1, Th2 e Th17, exercem papel decisivo. Essa regulação influencia não apenas a eliminação do parasito, mas a gravidade das manifestações clínicas, que podem variar de formas cutâneas localizadas até formas mais graves, como as mucosas.^{8,9}



UFAM

O tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde para a LTA, baseia-se em fármacos como antimoniato de meglumina, anfotericina B e isetionato de pentamidina. Entretanto, esses tratamentos apresentam desafios, como a necessidade de administração parenteral, duração prolongada e alta toxicidade, fatores que frequentemente levam ao abandono do tratamento e ao surgimento de cepas resistentes. Além desses fármacos, a miltefosina, originalmente desenvolvida como agente antitumoral, também tem sido utilizada no tratamento da leishmaniose; contudo, seu uso está associado a efeitos colaterais significativos, incluindo toxicidade gastrointestinal e teratogenicidade.^{10,11}

Nesse cenário, cresce o interesse por alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes, incluindo produtos naturais com potencial imunomodulador. Jensen (2020)¹², demonstrou que compostos bioativos extraídos de *Libidibia ferrea* apresentaram atividade antileishmania significativa. De forma semelhante, Silva *et al.* (2021)¹³ relataram que a fração diclorometano dessa espécie induziu uma resposta linfoproliferativa relevante. Esses achados apontam para a necessidade de estudos aprofundados sobre compostos bioativos dessa planta.

Entre os constituintes identificados destaca-se o metil galato reconhecido por sua ação imunomoduladora^{12,13}. Estudos demonstraram sua atividade contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis*¹⁴ e elevada viabilidade celular em ensaios *in vitro*⁸, aspecto relevante diante da toxicidade associada às terapias convencionais. Assim, o metil galato desponta como candidato promissor para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais seguras e efetivas.¹⁵

Entre as espécies circulantes na região, destaca-se a *Leishmania (V.) guyanensis*, responsável por grande parte dos casos de LC e frequentemente associada a falhas terapêuticas.^{44, 45} O Glucantime® (antimoniato de meglumina) foi, durante décadas, o medicamento de maior circulação, entretanto, sua eficácia frente à *L. (V.) guyanensis* é limitada, e seu uso está associado a efeitos adversos significativos e toxicidade tecidual em modelos experimentais.^{46, 52,53} Atualmente, a miltefosina surge como alternativa terapêutica promissora, embora sejam necessárias mais evidências sobre sua efetividade e segurança contra esta espécie, bem como monitoramento da resistência a medicamentos.^{48, 49, 50,51}

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* na proliferação de linfócitos do metil galato em PBMCs de pacientes com LC. Os resultados obtidos permitiram ampliar a compreensão quanto aos possíveis mecanismos que fazem parte da imunomodulação do metil galato na LC, evidenciando seu potencial como candidato terapêutico alternativo frente às limitações dos fármacos atualmente disponíveis. Tal



UFAM

conhecimento contribui para a construção de estratégias mais eficazes, menos invasivas, seguras e acessíveis, especialmente relevantes em um contexto em que populações vulneráveis são as mais acometidas e enfrentam maiores dificuldades de adesão ao tratamento. Ademais, o caráter inovador da investigação com essa substância, agrega valor científico e translacional, fornecendo evidências que podem orientar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e subsidiar políticas públicas voltadas para o enfrentamento da leishmaniose. Contudo, este estudo não apenas avança na compreensão dos processos imunológicos associados à doença, mas também de perspectivas concretas para a melhoria da qualidade de vida das populações afetadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características da Leishmaniose Cutânea

A LC, é forma mais prevalente da LTA, é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada da fêmea do flebotomíneo infectado, principalmente espécies do gênero *Lutzomyia* na América. No Brasil, foram identificadas sete espécies de *Leishmania* com tropismo dérmico, das quais seis pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. As espécies descritas são: *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shaw*.¹

Clinicamente, a LC caracteriza-se por amplo espectro de manifestações. O período de incubação varia entre duas semanas e três meses, manifestando-se inicialmente como uma pápula eritematosa que pode evoluir para nódulo ou placa infiltrada e, posteriormente, para úlcera de bordas elevadas e endurecidas, geralmente indolor.^{1,3} As lesões predominam em áreas expostas do corpo, como face e membros, podendo apresentar-se como lesão única ou múltiplas. Em situações específicas, podem ocorrer formas disseminadas, com lesões não ulceradas em diferentes segmentos corporais, ou a forma difusa, que se associa à ausência de resposta imune celular efetiva, alta carga parasitária e dificuldade terapêutica.⁵

2.1.1 Epidemiologia

No contexto epidemiológico, a LC é considerada uma Doença Tropical Negligenciada e permanece como um relevante problema de saúde pública em países da América Latina, Ásia e África.²¹ No Brasil, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo endêmica em praticamente



UFAM

todos os estados, com maior concentração de casos na Amazônia, onde fatores ambientais e socioeconômicos favorecem a transmissão.^{1,5}

Frente a isso, medidas de controle da leishmaniose se fazem necessárias, desde a vigilância epidemiológica, manejo de vetores e reservatórios, educação em saúde a intervenções ambientais. O controle do vetor, é realizado por meio de inseticidas residuais e barreiras físicas.^{1,71} Além disso, fatores ambientais e climáticos, como desmatamento, urbanização e alterações no regime de chuvas, influenciam a dinâmica da doença, tornando necessária a adaptação contínua das ações de controle em função das mudanças climáticas observadas na região amazônica.²⁰

Além disso, segundo dados do Ministério da Saúde, em 2023 o Brasil registrou aproximadamente 13.000 casos de LTA, dos quais 5.927 foram na Região Norte, com destaque para o Pará, responsável por 2.374 casos, seguido pelo Amazonas, com 1.295 casos registrados em 2023, representando um crescimento de 58,7% em comparação ao ano anterior.² A Fundação Alfredo da Matta relatou um aumento de 341% nos novos casos em apenas um ano¹⁶, destacando a expansão da doença na região.⁴

2.1.2 Mecanismos de transmissão e infecção

Os mecanismos de transmissão e infecção envolvem a interação entre o parasito, o vetor e o hospedeiro. A transmissão ocorre pela picada da fêmea do flebotomíneo, que inocula formas promastigotas metacíclicas juntamente com saliva, rica em moléculas bioativas que modulam a resposta imune inicial.^{7, 18, 19} Essas moléculas favorecem a apoptose de neutrófilos e a subsequente internalização dos parasitos por macrófagos, processo que aumenta a sobrevivência intracelular da *Leishmania*.⁹ Estudos mostram que o parasito é capaz de evadir mecanismos inatos de defesa, modulando a produção de citocinas e comprometendo a ativação efetiva de células apresentadoras de antígenos.²⁴

A resposta imune do hospedeiro desempenha papel crucial no curso da infecção: respostas do tipo Th1, com produção de IFN- γ e TNF- α , associam-se ao controle parasitário e à cicatrização, enquanto respostas Th2 e regulatórias, com produção de IL-10 e TGF- β , favorecem a persistência do parasito e a cronificação da doença.^{22, 6, 23} O perfil imunológico Th17, caracterizado pela produção de citocinas como IL-17A, IL-17F e IL-22, pode desempenhar um papel importante na modulação da resposta inflamatória como o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, e na patogênese da doença em contextos clínicos



UFAM

específicos, como em casos da forma clínica mucosa que culmina em dano tecidual exacerbado.
40, 41, 42

2.1.3 Resposta Imune

Desde os primeiros momentos da infecção, no hospedeiro vertebrado ocorre ativação dos mecanismos de defesa contra o parasito. Essa resposta de defesa envolve citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras e ativação de linfócitos T.²⁸ Há um consenso de que a distinção entre resistência e suscetibilidade à infecção está associada à expansão de células T auxiliares dos tipos 1 e 2 (Th1 e Th2).^{7, 22}

O primeiro mecanismo de evasão utilizado pelo parasito é a inativação do sistema complemento. As formas infectantes da *Leishmania* sp. sofrem modificações morfofisiológicas que aumentam significativamente sua virulência, este processo é conhecido como metaciclogênese.²⁸ Este fenômeno modifica açúcares e glicoproteínas presentes na membrana do parasito, tornando-os mais resistentes à ação do sistema complemento e, conseqüentemente, evadindo as defesas do hospedeiro vertebrado.²⁴

Após escapar da lise direta realizada pelo sistema complemento, os parasitos serão fagocitados por macrófagos e neutrófilos que são rapidamente recrutados. Os neutrófilos infectados pelas promastigotas irão sofrer apoptose e serão fagocitados por macrófagos, que após receberem um sinal inibitório (reconhecimento de fosfatidil serina na superfície), permitem a entrada silenciosa do parasito, visto que esse tipo de fagocitose não induz explosão respiratória.^{9, 27}

As citocinas e quimiocinas liberadas pelos macrófagos e neutrófilos possuem a capacidade de influenciar o desenvolvimento da resposta imune à infecção. Este é um momento vital, pois a modulação de citocinas pode desencadear uma resposta imune eficiente contra a *Leishmania* ou inibir/desativar macrófagos.²⁸

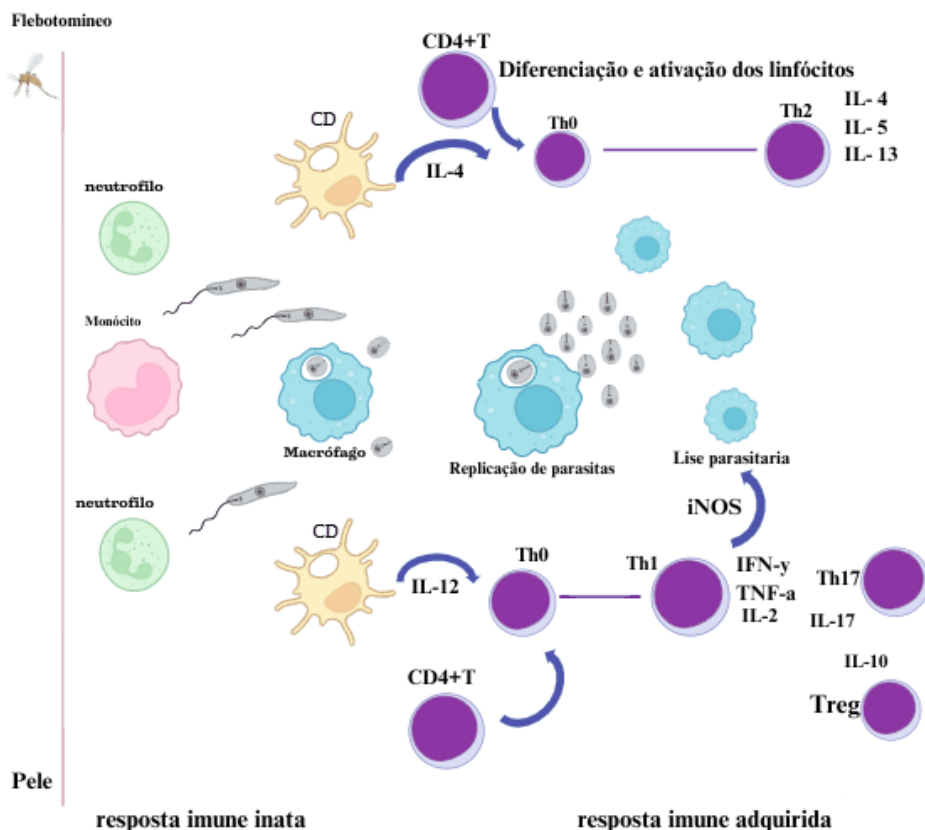


Figura 1 - Imunopatogenia da Leishmaniose Cutânea (LC).

Fonte: Adaptado de Gabriel A.B. (2019) ²³

A imunopatogenia da leishmaniose é influenciada por uma complexa rede de citocinas que modulam a resposta imune do hospedeiro, determinando o resultado clínico da infecção. A produção local de IL-1 β , IL-2, TNF- α , IL-12, IFN- γ , é fundamental para a ativação da resposta imune do tipo Th1, que é eficaz na eliminação dos parasitos intracelulares. Essa resposta Th1 é caracterizada pela produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio, essenciais para a atividade leishmanicida dos macrófagos frente à parasitos intracelulares. ²⁵

Por outro lado, se a resposta imune for predominantemente do tipo Th2, caracterizada pela secreção de IL-4, IL-5, e IL-10 e IL-13 que pode de facilitar a disseminação do parasito e a progressão clínica da infecção. A resposta Th2 está frequentemente associada a formas mais graves da doença, especialmente em infecções por certas espécies de *Leishmania*. ²⁷ A Leishmaniose Tegumentar apresenta uma variedade abrangente de manifestações clínicas, podendo apresentar uma ou múltiplas lesões. Sua forma clínica é influenciada pela interação entre o parasito (espécie de *Leishmania* envolvida), o hospedeiro (resposta imunológica e características genéticas) e o seu vetor. ^{28, 29}



UFAM

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da LC é estabelecido por meio da integração de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O exame clínico avalia a presença de lesões ulceradas em áreas expostas, frequentemente associadas ao histórico de exposição em áreas endêmicas¹. Laboratorialmente, a detecção direta do parasito em esfregaços, biópsias ou cultura continua sendo o método de referência, embora apresente limitações em sensibilidade.³

Já a intradermoreação de Montenegro, embora historicamente utilizada como marcador da resposta imune celular frente ao parasito, encontra-se em desuso por não diferenciar infecções passadas das ativas e por apresentar baixa especificidade, o que limita sua aplicabilidade clínica. Enquanto os testes sorológicos, como ELISA e imunofluorescência indireta, podem contribuir em situações específicas, mas apresentam limitações devido à reatividade cruzada e à baixa sensibilidade em casos cutâneos.³² Outras formas diagnósticas incluem técnicas moleculares, como PCR e qPCR, que apresentam elevada sensibilidade e especificidade, sendo úteis na confirmação diagnóstica e na caracterização das espécies circulantes.^{8, 63}

2.1.6 Histórico do Tratamento da Leishmaniose Tegumentar

O tratamento da Leishmaniose Tegumentar é um dos maiores desafios enfrentados na medicina tropical. As dificuldades incluem a variabilidade das formas clínicas da doença, a resistência a tratamentos, a toxicidade dos fármacos utilizados, a resposta imunológica do hospedeiro⁴³, a necessidade de administração por via parenteral para a maior parte das medicações, quando a maioria das pessoas acometidas pelas leishmanioses são de baixa renda, e vivem em regiões rurais distantes, caracterizadas por acesso limitado aos serviços de saúde, o que dificulta a adesão ao tratamento e manejo adequado.⁴

Contudo, mesmo diante desse panorama desafiador que o tratamento da leishmaniose tegumentar apresenta, não foram observados ao longo da história avanços significativos, no que diz respeito ao desenvolvimento de novas propostas terapêuticas.

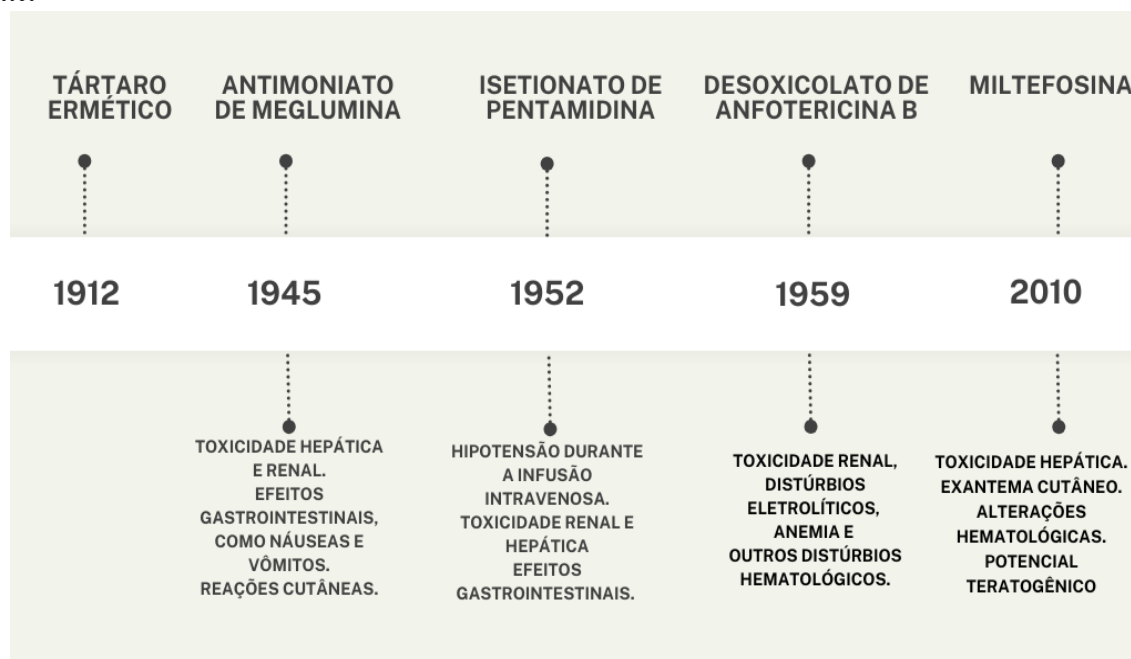


Figura 2 - Linha do tempo do tratamento disponível para a Leishmaniose Tegumentar, preconizado pelo Ministério da Saúde.

Fonte: Adaptado de Santiago AS *et al.* (2021) ⁴³

Berman *et al.* (1985) demonstraram que os antimoniais pentavalentes na quimioterapia das leishmanioses apresentam vários inconvenientes, como sua alta cardiotoxicidade e os regimes de tratamento adotados. Outras drogas atualmente empregadas neste tratamento são a pentamidina e a anfotericina B, que além de serem muito tóxicas, são de difícil administração (Berman, 1988). Entretanto, ainda não se tem uma droga que apresenta um bom índice terapêutico e uma baixa toxicidade.

Os antimoniais pentavalentes, têm sido a primeira linha de tratamento para a leishmaniose tegumentar há mais de 50 anos. Embora seu mecanismo de ação exato não seja completamente elucidado, acredita-se que esses fármacos interfiram na bioenergética do parasito, inibindo processos essenciais como a glicólise e a β -oxidação de ácidos graxos, o que leva à apoptose dos parasitos dentro dos macrófagos.⁴⁴

Devido a essas limitações, a anfotericina B emergiu como uma alternativa importante, especialmente para pacientes que apresentam resistência ou contraindicação ao antimonial.⁴³ A anfotericina B atua diretamente na membrana celular do parasito ao se ligar ao ergosterol e promover a formação de poros, resultando na morte celular.⁴⁵ A forma convencional (desoxicolato) é eficaz, mas é associada a uma significativa toxicidade renal e outros efeitos adversos como febre e anemia. Em contrapartida, a anfotericina B lipossomal foi desenvolvida



UFAM

para reduzir os efeitos colaterais, apresentando um perfil de segurança melhor e com uma toxicidade renal e maior eficácia em doses menores; no entanto, seu alto custo limita sua acessibilidade em países endêmicos.⁴⁶

Com relação a miltefosina, originalmente um antineoplásico, é atualmente o único fármaco oral disponível para o tratamento da leishmaniose. Seu mecanismo de ação envolve a inibição de vias metabólicas do parasito e indução da morte celular por apoptose.⁴⁷ A mesma foi inicialmente aprovada para incorporação pelo SUS em 2010, por deliberação da antiga CITEC, embora sem implementação prática à época. Posteriormente, a medida foi consolidada pela Portaria nº 56/2018, que formalizou sua incorporação no tratamento da leishmaniose tegumentar. O uso foi regulamentado pela Nota Informativa nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS. Além disso, a RDC nº 337/2020 incluiu a miltefosina na Lista C1 de substâncias sob controle especial, devido ao risco teratogênico, estabelecendo critérios específicos de prescrição e dispensação.

A resistência aos fármacos é um problema crescente no tratamento da Leishmaniose Tegumentar. O uso inadequado dos medicamentos e a falta de supervisão terapêutica têm contribuído para o surgimento de cepas resistentes. Fatores que influenciam essa resistência incluem: polimorfismos genéticos, exposição prolongada, falhas no sistema de saúde, como acesso a medicamentos de qualidade aumenta o risco de resistência, além da baixa adesão terapêutica, que culmina no abandono do tratamento.^{48, 49}

Diante das limitações das terapias atuais, há uma crescente busca por novos medicamentos e abordagens terapêuticas. As emergentes opções como miltefosina e anfotericina B lipossomal não são alternativas menos tóxicas, no entanto, o desenvolvimento contínuo de novas drogas, terapias imunomoduladoras e vacinas é crucial para combater a resistência e melhorar os desfechos clínicos na leishmaniose tegumentar, assim como adesão ao tratamento.^{47, 50, 51}

2.1.7 Compostos Fenólicos como alternativas terapêuticas - Metil galato

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), como a leishmaniose, afetam majoritariamente populações pobres e marginalizadas, sendo historicamente preteridas nos investimentos da indústria farmacêutica. Grandes corporações demonstram baixo interesse comercial no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para essas enfermidades, dado o retorno financeiro limitado que tais produtos oferecem. De acordo com a Organização Mundial



UFAM

da Saúde, apenas 1,4% dos novos medicamentos desenvolvidos entre 1975 e 2019 foram destinados ao tratamento de DTNs.³

Esse cenário contribui para a escassez de compostos e formulações que apresentem baixa toxicidade e eficácia comprovada no tratamento da doença. De acordo com a Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas⁵³, é fundamental priorizar a busca por novas opções terapêuticas, especialmente aquelas de uso tópico ou administração oral, que ofereçam tratamento eficaz, de ação rápida e baixa toxicidade, promovendo maior adesão dos pacientes acometidos pela LTA.⁵³

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos secundários presentes em diversas plantas, amplamente distribuídos na natureza.⁵⁴ Quimicamente, os fenólicos são caracterizados por um ou mais grupos hidroxila (-OH) ligados diretamente a anéis aromáticos. Os principais tipos de compostos fenólicos incluem flavonóides, taninos, ácidos fenólicos, lignanas e cumarinas.⁵⁵

Entre as plantas que possuem compostos fenólicos com relevância medicinal, destaca-se o jucá (*Libidibia jucá*), uma espécie nativa da região amazônica. Considerando que a atualização taxonômica proposta por Oliveira *et al.*, (2024) é recente, cabe destacar que a maior parte dos estudos disponíveis na literatura faz referência à espécie sob a denominação *Libidibia ferrea*, vigente antes da reclassificação. Neste trabalho, será adotada a nomenclatura atualizada (*Libidibia jucá*), reconhecendo-se, contudo, que os dados discutidos em estudos anteriores estão vinculados à denominação anterior (*Libidibia ferrea*).⁶¹

Sendo a mesma, amplamente utilizada na medicina tradicional por comunidades indígenas e populações locais.⁵⁸ Essa diversidade de propriedades bioativas tem motivado estudos na área de pesquisa e inovação, que buscam avaliar a eficácia da jucá quando combinada com outros compostos, sejam naturais ou sintéticos.⁵⁹ Além disso, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novas tecnologias de extração e purificação de seus compostos ativos, visando maximizar seu potencial terapêutico e ampliar suas aplicações.⁶⁰

Diante das reconhecidas propriedades farmacológicas do Jucá (*Libidibia jucá*), o grupo de pesquisa do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, tem desenvolvido uma trajetória significativa de pesquisa voltadas à aplicação dessa planta no contexto do combate à leishmaniose, contribuindo para a exploração de alternativas terapêuticas baseadas em produtos naturais.⁶²

Contribuições do Laboratório de Leishmaniose na Pesquisa Farmacológica da *Libidibia ferrea*

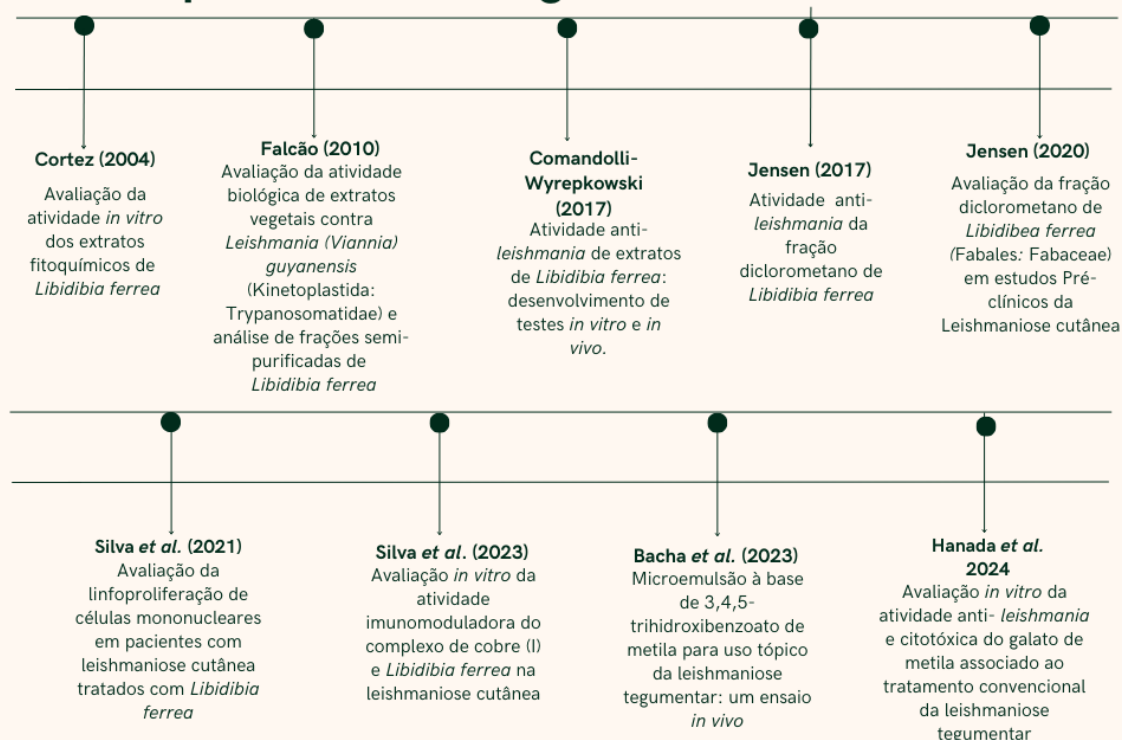


Figura 3 - Contribuições do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, COSAS/INPA/MCTI na Pesquisa Farmacológica da espécie vegetal *Libidibia ferrea*.

Frente aos compostos bioativos da *Libidibia ferrea*, temos o metil galato, um éster do ácido gálico, inicialmente obtido da Fração Diclorometano, a partir de estudo pré-clínico por Jensen 2020, que observou que o metil galato desempenhou um resultado melhor frente a formas amastigotas de *L. Amazonensis*, do que os controles positivos, Pentacarinat[®] e Glucantime[®].¹² Com o avanço das pesquisas e visando maior pureza, biodisponibilidade e reprodutibilidade, estudos subsequentes conduzidos por Bacha *et al.*, (2023) e Hannada (2024) passaram a utilizar o metil galato sintético, adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).^{14, 26}

Essa substância tem sido amplamente estudada devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias, entre outras.⁵⁷ O efeito anti-inflamatório do metil galato foi observado por Chagas Neto (2022), através de modelo *in vivo* e *in vitro* e não



UFAM

mostrou alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue associados às funções renal, hepática e no metabolismo de carboidratos.⁵⁵

Nesse contexto, o metil galato desponta como um candidato promissor devido às suas propriedades imunomodulatórias e antileishmania, além de apresentar características físico-químicas como ponto de fusão entre 201-204°C, solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Suas propriedades antioxidantes são atribuídas à capacidade de neutralizar radicais livres e inibir a oxidação lipídica.⁶³

Estudos *in vivo* em modelos animais têm mostrado a capacidade do metil galato de promover a redução da lesão cutânea e a melhora dos parâmetros clínicos associados à leishmaniose. Essa capacidade do composto em modular a resposta imune e inibir o crescimento do parasito,^{13,14} abrem perspectivas promissoras para aplicações tanto na área de pesquisa científica, no desenvolvimento de novas terapias, quanto na aplicação clínica para o tratamento da leishmaniose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imunológica e caracterizar os parasitos associados à LC, por meio do diagnóstico parasitológico e da caracterização molecular dos isolados, bem como da análise da atividade linfoproliferativa *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes e voluntários sadios, frente ao metil galato e ao Glucantime®.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar diagnóstico parasitológico em pacientes com suspeita de Leishmaniose cutânea;
- Caracterizar molecularmente, por PCR em tempo real, os parasitos do gênero *Leishmania* isolados em cultivo de pacientes oriundos do município de Rio Preto da Eva, AM;
- Avaliar a atividade linfoproliferativa *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com Leishmaniose cutânea e de voluntários sadios, frente ao metil galato (Sigma-Aldrich®) e ao Glucantime®.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instituições Envolvidas no Projeto

O presente estudo trata de uma pesquisa experimental, *in vitro*, com delineamento comparativo entre grupos. Foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, sob o CAAE/UFAM: 81512524.3.0000.5020 (anexo A), e foi desenvolvido nas seguintes instituições:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM– INPA/MCTI;
- Unidades Básicas de Saúde da Secretária Municipal de Saúde do Município de Rio Preto da Eva, Amazonas, BR;
- Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta, Manaus, AM, BR;
- Ambulatório de Leishmaniose da Fundação de Medicina Tropical do Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, BR.

4.2 Coorte do estudo e coleta de dados

Para fornecer uma visão geral elaborou-se o fluxograma das etapas do projeto, desde a coleta do material biológico até os experimentos *in vitro*.

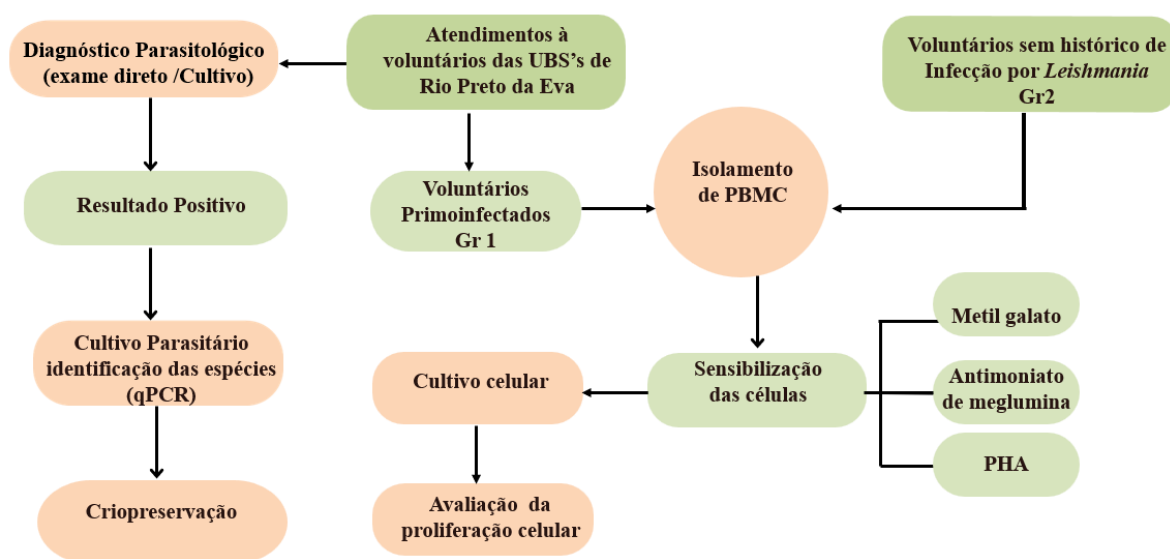


Figura 4 - Fluxograma das etapas do projeto, desde a coleta do material biológico até os experimentos *in vitro*.

Este estudo foi dividido em duas coortes (Fig 4): uma para pacientes infectados por *Leishmania* spp. (Gr1 / n=10), diagnosticados e confirmados após exames parasitológicos, que ainda não haviam iniciado o regime terapêutico, e outra para um grupo controle negativo (Gr 2), sem histórico de infecção para LC, residentes na cidade de Manaus, AM, considerados (n=10). Ambos os grupos foram recrutados durante o mesmo período de avaliação de sete meses. Foi necessário o consentimento informado por escrito de todos os participantes do estudo antes da inclusão. Para ambos os grupos, a resposta linfoproliferativa *in vitro* à exposição ao Metil Galato (MG) foi investigada utilizando parâmetros imunológicos.

Os pacientes com lesões cutâneas (Gr1) eram provenientes do município de Rio Preto da Eva - AM. Para este grupo, foram 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) foram oriundas de pacientes atendidos nas Unidades Básicas de Saúde (UBS): Ednaide Lopes da Costa, Maria de Lourdes da Costa Azevedo, Hamilton Cidade, Nossa Senhora Aparecida e Manoel Rumão, do município de Rio Preto da EVA - AM.

O Grupo 2 (Voluntários sem histórico de infecção por LC) foi composto por voluntários sem infecção por LC, residentes na área de Manaus, que foram ao laboratório parceiro de análises clínicas LabMaster Medical Center para exames de rotina ou seguimento de saúde. Neste grupo, foram coletadas amostras de sangue para análises comparativas, servindo de grupo controle para o estudo.

4.3 Recrutamento e procedimentos realizados com o grupo dos primoinfectados com leishmaniose cutânea – Grupo 1

O projeto foi desenvolvido através de atividades em campo que envolveram 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 com LC no município. Durante essa etapa, a equipe realizou atividades de educação em saúde a respeito da doença (Apêndice A), nas recepções e salas de espera das respectivas unidades com anuência da Secretária Municipal de Rio Preto da Eva, AM.

Após cada atividade de educação em saúde, foi realizado um convite cordial à população presente para participar voluntariamente dessa pesquisa. Os interessados em participar e que



UFAM

apresentavam lesão cutânea suspeita da infecção por *Leishmania* sp., receberam informações detalhadas sobre a pesquisa, destacando sua relevância e os procedimentos envolvidos. Foi explicado o objetivo do estudo, os métodos que seriam utilizados e os potenciais benefícios para a comunidade. Além disso, os participantes tiveram a oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas relacionadas a leishmaniose. Cada um dos voluntários, leu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). Este documento forneceu 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 foi convidado a assinar o TCLE, indicando seu consentimento para participar da pesquisa.

Após a assinatura do TCLE, os participantes foram submetidos a uma entrevista epidemiológica (Apêndice C). Este questionário consiste em 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 tiveram a oportunidade de compartilhar seus conhecimentos, experiências e percepções, contribuindo para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença em sua comunidade.

4.4 Exames de diagnóstico parasitológico para Leishmaniose cutânea e coleta de sangue

Diagnóstico parasitológico: O exame envolveu a pesquisa direta do parasito através da escarificação da borda de lesão e a confecção de lâminas de impressão coradas pelo Kit panóptico (Laborclin[®]) para busca das formas amastigotas intracelulares. Esta técnica oferece uma abordagem minimamente invasiva e relativamente simples para a coleta de amostras, o exame foi realizado nas UBS Ednaide Lopes da Costa, Maria de Lourdes da Costa Azevedo, Hamilton Cidade, Nossa Senhora Aparecida e Manoel Rumão, empregada para o diagnóstico de Leishmaniose devido à sua rapidez, menor custo e execução simplificada. Esta etapa é fundamental, pois a detecção do parasito confirma o diagnóstico da doença, permitindo um tratamento adequado e oportuno, seguindo as recomendações do Ministério da Saúde.

As amostras obtidas através da escarificação da lesão, foram também cuidadosamente semeadas em meio de cultivo bifásico ágar sangue NNN (Novy e McNeal 1904; Nicolle 1908) e posteriormente, expandidas em meio de cultura completo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®]), enriquecido com Hepes e L-glutamina, além de acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) da Gibco[®]) e criopreservadas, procedimento é descrito detalhadamente em



UFAM

Espir (2013). Esse processo de cultivo permite o crescimento do parasito em condições laboratoriais controladas, facilitando o preparo de massa parasitária, para posterior identificação da espécie de *Leishmania* sp, por meio de PCR em tempo real.

Coleta do sangue periférico: A etapa seguinte consistiu na coleta do sangue periférico dos pacientes, para obtenção de células para a realização dos ensaios imunológicos. Para realizar essa coleta, utilizou-se um sistema de coleta a vácuo, empregando um tubo BD Vacutainer[®] heparinizado (10 mL). Antes de realizar os procedimentos de escarificação e coleta de sangue, um enfermeiro especializado conduziu uma sessão informativa para orientar os pacientes sobre todas as etapas das coletas de materiais biológicos. Esta orientação detalhada incluiu uma descrição da técnica de escarificação, explicando cuidadosamente como o material será coletado e manipulado. Além disso, foram fornecidas instruções sobre a coleta de amostras de sangue, garantindo que os participantes compreendam completamente o processo.

Após o diagnóstico laboratorial da LC, os pacientes confirmados tiveram a prescrição do tratamento feita pelos profissionais das Unidades Básicas de Saúde (UBS), em colaboração com os membros da equipe habilitados para essa atividade. O tratamento foi conduzido conforme as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde, conforme descrito no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar ¹.

4.5 Identificação molecular dos isolados de *Leishmania* por PCR em tempo real

Extração de DNA Genômico: A extração do DNA, a partir da massa parasitária de pacientes com LC foi realizada utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas adaptações para protozoários. A massa parasitária, previamente obtida de fragmentos lesionais e homogeneizada em tampão PBS estéril, foi submetida à digestão com proteinase K (20 µL) em tampão ATL (*Animal Tissue Lysis buffer*) (180 µL), seguida de incubação a 56°C por 1 hora.

Reação: Após a lise, procedeu-se à adição de 200µL de tampão AL (*Lysis buffer*) e o mesmo volume de etanol absoluto (Sigma-Aldrich[®]), com subsequente transferência para as colunas de purificação (*spin columns*) fornecidas pelo kit. As etapas de lavagem foram realizadas com os tampões AW1 (*Wash buffer 1*) e AW2 (*Wash buffer 2*), conforme protocolo padrão, e o DNA foi eluído em 100 µL de tampão AE (*Elution buffer*). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento do uso (QIAGEN, 2022). Após a extração do DNA genômico da massa parasitária, procedeu-se à caracterização molecular das amostras para



UFAM

identificação da espécie de *Leishmania*. A metodologia foi baseada no protocolo empregado pelo Laboratório de Biologia Molecular da Fundação de Medicina Tropical Alfredo da Matta (FUHAM), que utiliza ensaios de PCR em tempo real do tipo TaqMan[®], direcionados a regiões-alvo dos genes HSP70 e ITS-1, permitindo a distinção entre subgêneros e a identificação da espécie, a metodologia aplicada segue protocolo padronizado e registrado sob sigilo, motivo pelo qual não é descrita em sua totalidade neste trabalho (FUHAM, 2024).

As reações foram preparadas, apresentando:

- Master Mix Probe 2× (Qiagen[®]), que inclui DNA polimerase hot-start, dNTPs e tampão com MgCl₂;
- Primers específicos (*forward* e *reverse*) e sonda TaqMan[®] marcada com fluoróforo (FAM) e quencher (BHQ-1), em concentrações previamente validadas;
- Água ultrapura livre de nucleases (DNase/RNase-free) para ajuste de volume;
- DNA genômico extraído.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços, seladas com filme óptico, centrifugadas (spin) para eliminação de bolhas e homogeneização, e então processadas no 7500 Fast Real-Time PCR System[®] (Applied Biosystems, EUA). O programa térmico utilizado consistiu em: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de amplificação compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto, com aquisição de fluorescência ao final de cada ciclo. Os dados foram analisados no 7500 Software v2.3[®] (Applied Biosystems).

4.6 Recrutamento de Voluntários saudáveis sem histórico de Leishmaniose Cutânea – Grupo 2

O Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA estabeleceu uma parceria estratégica com o Laboratório LabMaster Medical Center de Análises Clínicas. Como parte dessa colaboração, a equipe de pesquisadores realizou atividades de educação em saúde sobre a LTA nas recepções e salas de espera da clínica com o objetivo de fornecer informações abrangentes à população sobre prevenção, tratamento e a importância da pesquisa em andamento.

Após as atividades de educação em saúde, os clientes foram convidados para



UFAM

participarem da pesquisa a fim de comporem o grupo controle, denominado: Voluntários sem LC (Grupo 2). As pessoas que optaram por se voluntariar, também receberam todas as informações necessárias acerca dos objetivos da pesquisa, a importância de realizar essa comparação entre os grupos e potenciais benefícios para o tratamento da Leishmaniose. Além disso, este grupo também recebeu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para leitura atenta, com a oportunidade de tirar dúvidas com a equipe de pesquisa antes de fornecerem seu consentimento (Anexo C). Os que optaram por se voluntariar, sua doação de sangue foi coletada durante os exames laboratoriais já agendados na clínica, não havendo necessidade de realizarem punção extra para coleta.

Os procedimentos de coleta, transporte e armazenamento das amostras, obedeceram às normativas da RDC 50 e da RDC 302 da ANVISA para garantir a qualidade e a segurança em amostras biológicas, desde a coleta ao transporte dos materiais, garantindo assim a proteção dos participantes bem como também da equipe.

4.7 Critérios de Inclusão e exclusão dos Indivíduos no Grupo 1

4.7.1 Critérios de Inclusão

Indivíduos de 18 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 ter sido diagnosticado com LC, conforme os critérios clínicos e parasitológicos especificados a seguir:

- Indivíduos com casos confirmados de LC;
- Indivíduos sem tratamento anterior para infecção por *Leishmania* sp.;
- Apresentação clínica compatível com LC em atividade;
- Visualização de amastigotas de *Leishmania* sp. no exame direto, e/ou;
- Visualização de promastigotas de *Leishmania* sp. na cultura.

4.7.2 Critérios de Exclusão

- Gestantes;
- Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores;



UFAM

- Histórico clínico de leishmaniose;
- Comorbidades como Diabetes e Hipertensão Arterial Sistêmica;
- Diagnóstico pronunciado de doenças autoimunes.

4.8 Critérios De Inclusão e Exclusão dos Indivíduos do Grupo 2

4.8.1 Critérios de Inclusão

Indivíduo independente de sexo e/ou orientação sexual, de 18 a 59 anos de idade, que não apresentem manifestações clínicas de desenvolvimento de lesões causadas por *Leishmania*; não ter frequentado áreas de risco aumentado para transmissão de leishmaniose tegumentar (zonas rurais e/ou periforestais do município de Manaus e adjacências) nos quinze dias anteriores à coleta; indivíduo que aceite participar do projeto e assine Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.8.2 Critérios de Exclusão

- Gestantes;
- Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores;
- Histórico clínico de leishmaniose;
- Comorbidades como Diabetes e Hipertensão Arterial Sistêmica;
- Diagnóstico conhecido de doenças autoimunes.

4.9 Experimentos *in vitro* de linfoproliferação

4.9.1 Obtenção de Células PBMCs

O sangue coletado em tubos BD Vacutainer[®] de 10 mL (com Heparina), dos voluntários foi diluído em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®]), enriquecido com Hepes e L-glutamina, além de acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi / Gibco[®]) na proporção de 1:1, transferido sobre 4 mL de Histopaque[®] - 1077 (Sigma-Aldrich[®]) e levado à centrífuga a 2.400 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares foi removida e transferida para um tubo Falcon com PBS (Solução salina tamponada/Gibco[®]), na proporção 1:1, para a realização de 3 lavagens e centrifugações a 4.400 rpm por 15 minutos, procedimento



UFAM

descrito detalhadamente em Silva (2021). Por fim, o sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo.

A contagem das células foi através da câmara de Neubauer com azul de Trypan (Sigma Aldrich®), e a concentração foi ajustada para 2×10^5 células/mL em meio RPMI completo.

4.9.2 Preparo de Placas para Proliferação Celular

As placas para os experimentos *in vitro* de proliferação celular foram de 96 poços de fundo chato, cuja amostra de cada voluntário foi preparada em uma placa de forma individualizada, e as amostras organizadas em triplicatas. Foram adicionadas 100 µL/poço de células PBMCs (2×10^5), e a organização da placa foi da seguinte forma: poços com células estimuladas com metil galato (éster metílico do ácido gálico, 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila) [54 µg/mL]; células tratadas com Glucantime® [100 µg/mL]; células sem estímulo de substância (apenas meio RPMI, controle negativo); e fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin* – PHA/Sigma-Aldrich®) [10 µg/mL], sendo considerado controle positivo para a linfoproliferação. O metil galato (éster metílico do ácido gálico, 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila) foi adquirido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) e a concentração utilizada foi previamente definida em [54 µg/mL] descrito detalhadamente em Jensen (2020) e corroborada pela análise do IC₅₀ frente a espécies de *Leishmania*, conforme demonstrado por Hannada (2023).²⁶

As substâncias foram previamente diluídas em meio RPMI completo, e após a adição de todas as substâncias e das células PBMCs, as placas foram incubadas durante 72 horas em estufa (*ThermoScientific Forma® Series II WaterJacketed CO2 Incubators*) a 37 °C com níveis de CO₂ a 5% e 95% de umidade, este protocolo está detalhadamente descrito em Silva (2021).

4.9.3 Ensaio de Proliferação Celular

Após as 72 horas de incubação das PBMCs, foi adicionado 25 µL/poço de solução BrdU (5- bromo-2'-deoxyuridine), como marcador da proliferação celular, seguindo de nova incubação a 37 °C por 18 horas, após o período de 18 horas, a placa foi centrifugada a 2.200 rpm por 15 minutos e o sobrenadante coletado (100 µL) e estocado em microtubos a -80°C, para posterior dosagem de citocinas. O procedimento de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi realizado com a placa seca, seguindo o *protocolo Cell Proliferation ELISA, BrdU* (Roche/Sigma-Aldrich®).



UFAM

Posterior às lavagens, adicionou-se 100 µL/poço de solução de substrato, onde, gradativamente, o volume de solução torna-se azul e a placa então foi incubada por 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 25 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄), resultando em uma imediata mudança na cor da solução para amarelo. Após 5 minutos, a placa foi levada para leitura no espectrofotômetro, sendo feita a leitura da absorbância de 450nm. O ensaio não utiliza curva padrão absoluta; a interpretação é feita comparando os controles: células sem estímulo (controle negativo) e células estimuladas com mitógeno (controle positivo), além de poços de reagente em branco para correção do *background*. O ensaio é considerado funcional quando os controles apresentam comportamento esperado, permitindo calcular a proliferação relativa das células testadas em relação aos controles.

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism[®] 9.4 *Softwares* e analisadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) e teste de Tukey, com limite de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização clínica epidemiológica

Foram avaliados dez indivíduos, sendo nove do sexo masculino e um do sexo feminino (Gr1) com diagnóstico confirmado de LC, com idades entre 18 e 50 anos (média: 26,8 anos). Os indivíduos desenvolviam atividades laborais distintas como: agricultores (maioria, 40%), trabalhadores de avicultura, operador de maquinário pesado e estudantes (Fig.5).

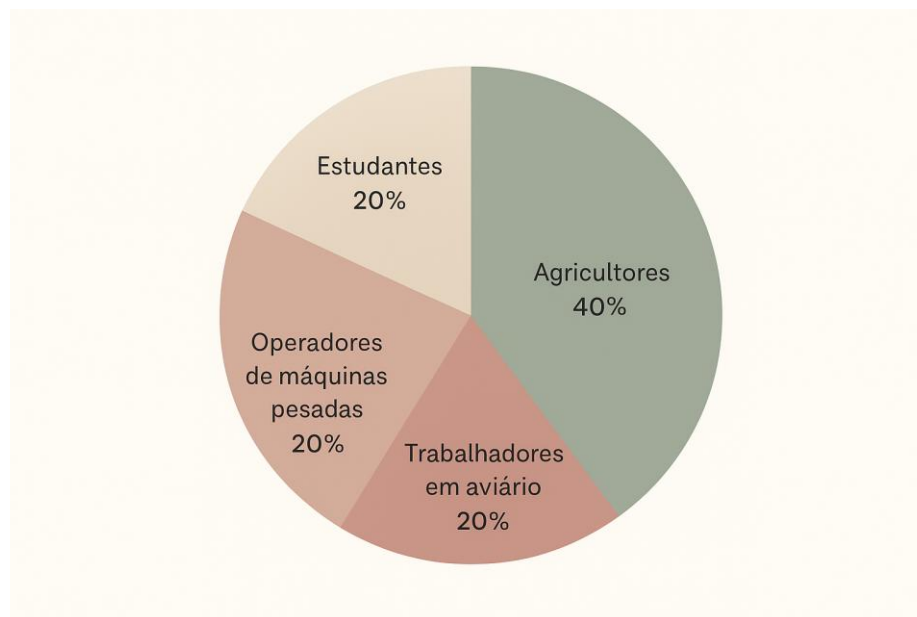


Figura 5 - Atividades de trabalho de pacientes infectados com *Leishmania* (V.) *guyanensis* no município de Rio Preto da Eva, AM, BR.

Este perfil demográfico está de acordo com o padrão epidemiológico descrito para LC no Brasil, caracterizado pela predominância masculina (masculino 9/10, feminino 1/10), faixa etária de jovens adultos (20–50 anos) e maior exposição ocupacional em ambientes rurais ou periurbanos ^{7, 69}, o que confirma a representatividade da amostra em questão (Tabela 1). Em relação à escolaridade, a maioria dos pacientes não completou o ensino fundamental, equivalente a 90%, o que representa um dos obstáculos que pode influenciar, desde a adesão às medidas preventivas, impactando diretamente na busca precoce por cuidados à saúde, para diagnóstico precoce, assim como a adesão ao tratamento preconizado. Esses dados estão em consonância com outros estudos que associam baixos níveis de escolaridade à vulnerabilidade para doenças infecciosas, como a LC, o que reflete o padrão encontrado em populações rurais da Amazônia. ^{80, 81}

Quanto às variáveis clínicas, diversas morfologias foram observadas, incluindo as lesões de formas impetigoídes, placas, úlceras francas, ectematóide e papulares (formas descritas detalhadamente em NAIFF *et al.*, 2009), com o tempo de infecção, variando de 7 a 60 dias (obtido por questionário epidemiológico), o que indicou que muitas lesões estavam em estágios iniciais, uma condição que pode explicar a presença de formas papulares e nodulares menos ulceradas. ^{33, 82} A predominância de lesões nos membros inferiores e superiores sugere uma exposição típica, o que corrobora com diversos achados na literatura ^{73, 74}, enquanto a ocorrência de lesões nas costas pode estar associada a fatores ambientais e ao tipo de vestuário utilizado



UFAM

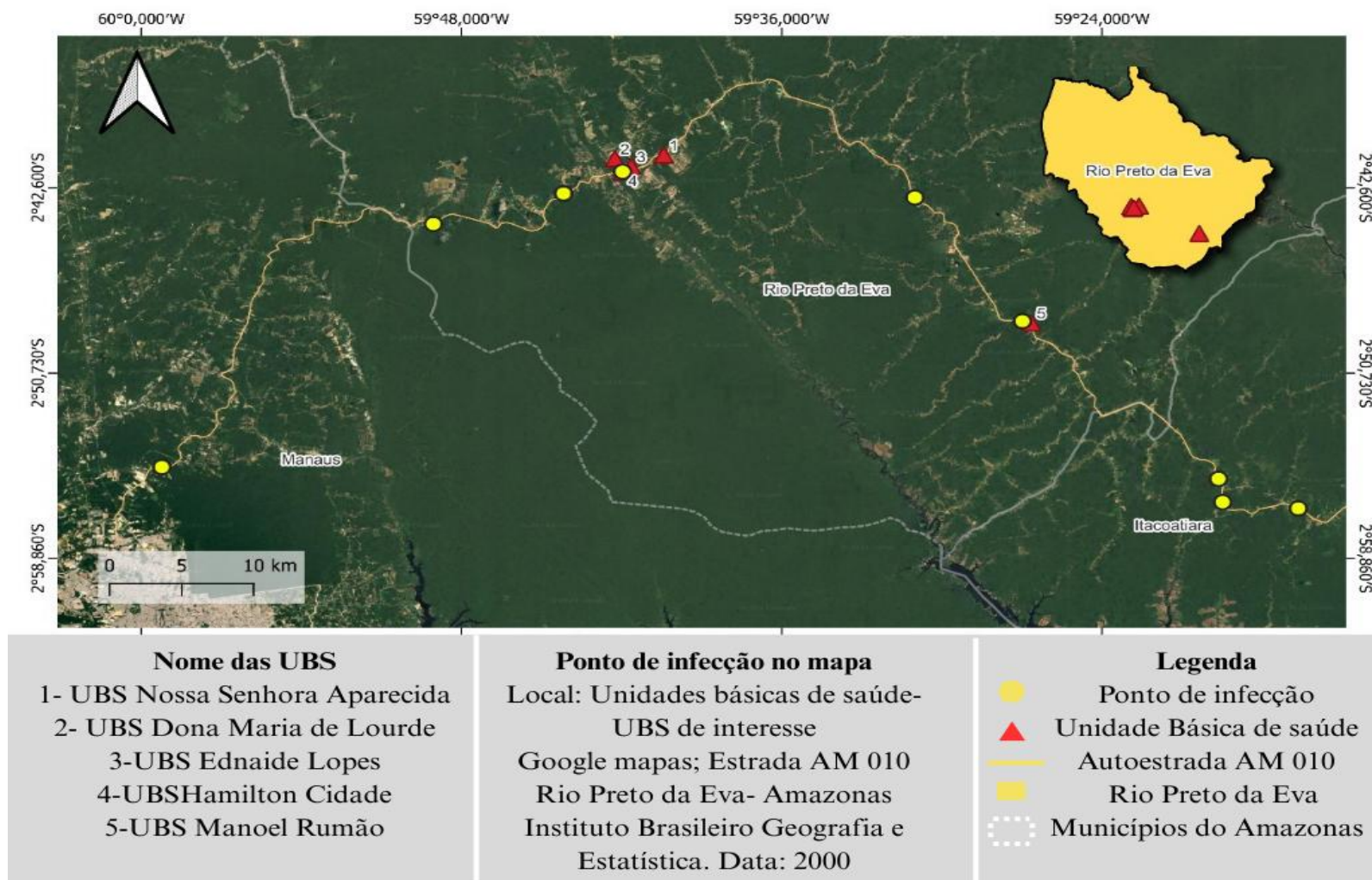
durante as atividades rurais.⁸³ Evidencia-se uma diversidade de tipos de lesões cutâneas na infecção por *L. (V.) guyanensis*.

Tabela 1. Dados clínico-epidemiológicos de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (V.) guyanensis*¹ no Amazonas, Brasil.

Código Amostral ²	Idade /sexo	Escolaridade	Local de infecção	Tempo de infecção	Lesões cutâneas			
					Nº de lesões	Tamanho das lesões	Características das lesões	Localização
MHOM/BR/24/IM6250	22 M	E.F. I	Km 91 AM010	14 dias	2	1,5 x 2,0	Em placa	MMSS E
MHOM/BR/24/IM6254	37 M	E. F	Km 127 AM010	45 dias	2	1,0 x 2,5	Impetigoide	MMII D
MHOM/BR/24/IM6255	18 M	E.F. I	Km 105 AM010	30 dias	6	2,2 x 2,4	Úlcera Franca	MMII E
MHOM/BR/24/IM6258	28 M	E.F. I	Km 08 AM010	45 dias	2	4,1 x 2,7	Ectimatóide	MMII D
MHOM/BR/24/IM6260	27 M	E.F. I	Km 135 AM010	60 dias	1+satélites	1,2 x 0,7	Em placa	Costas M.Rombóide
MHOM/BR/24/IM6261	50 F	E.P.	Km 45 AM010	45 dias	2+ satélites	2,0 x 4,0	Impetigóide	MMII E
MHOM/BR/25/IM6262	19 M	E.F. I	Sede do município	25 dias	2	2,8 x 1,5	Úlcera Franca	MMSS E
MHOM/BR/25/IM6263	37 M	E.F. I	Km 57 AM 010	20 dias	4	2,5 x 1,5	Ectimatóide	Costas M. redondo maior
MHOM/BR/25/IM6264	32 M	E.F. I	Km 91 AM010	7 dias	1	1,0 x 1,1	Papular	MMSS E
MHOM/BR/25/IM6266	24 M	Fundamental	Km 129 AM 010	60 dias	3	2,6 x 2,2	Impetigóide	MMSS D

Nomes da Unidade Básica de Saúde – UBS, Dona Maria de Lourdes de Azevedo dos Santos, UBS Hamilton Cidade, UBS Ednaide Lopes, UBS Nossa Senhora Aparecida, UBS Manoel Rumão, município de Rio Preto da Eva/AM; 1: identificação estabelecida por qPCR; M=masculino; F=feminino; EFI = ensino fundamental incompleto; EP= ensino primário; EF=ensino fundamental; MMIID=membros inferiores lado direito; MMIIE=membros inferiores lado esquerdo; MMSSD= membros superiores lado direito; MMSSE= membros superiores lado esquerdo. 2: Código amostral: [M= Mamíferos; HOM= Homo sapiens /país de origem/ano de isolamento/código original do INPA.

Figura 6 - Mapa de localização das Unidades Básicas de Saúde (UBS) de interesse e a distribuição dos pontos de infecção no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas, Brasil.





UFAM

Do ponto de vista epidemiológico e ambiental, foi constatado que a maioria dos pacientes residem em áreas ao longo da rodovia AM-010, entre o km 08 e o km 135, demonstrando a relação entre a proximidade de áreas florestais ou recentemente desmatadas e o risco de transmissão.⁷³ Observou-se que o km 91 apresentou a maior frequência de casos, destacando um possível ponto de maior exposição ao vetor. Esse padrão reforça que a exposição ambiental, combinada com o perfil sociodemográfico e o nível de escolaridade, influencia diretamente a ocorrência da LC.⁸³

Os indivíduos que compuseram o estudo, vivem em sua maioria nos ramais (Fig. 6) do município de Rio Preto da Eva, AM, possuem como populações rurais amazônicas, fortes vínculos com a agricultura de subsistência e a criação de pequenos animais. No entanto, ao contrário dos grupos reconhecidos como Povos e Comunidades Tradicionais pelo Decreto nº 6.040/2007, essas comunidades não possuem, em geral, uma identidade cultural específica que as coloque formalmente em uma das 28 categorias de PCT (Povos e Comunidades Tradicionais no Brasil). Portanto, são classificadas no âmbito da agricultura familiar, definida pela Lei nº 11.326/2006, e não como um Povo ou Comunidade Tradicional.⁸⁹

Confirmando o âmbito epidemiológico, a identificação molecular das amostras revelou que 100% (10/10) dos isolados pertenciam à espécie *L. (V.) guyanensis*. Essa constatação, apesar do tamanho amostral, reafirma a predominância dessa espécie como agente etiológico da LC na região amazônica^{16,83}, e está associada à ampla distribuição de vetores do gênero *Lutzomyia* e à adaptação do parasito a reservatórios silvestres locais, o que garante sua manutenção no ciclo zoonótico.^{16,71} Concordando com isso, Silva *et al.* (2023) destacaram a predominância dessa espécie na região metropolitana de Manaus, particularmente no município de Rio Preto da Eva, AM, onde através de seu estudo, identificou que 88% dos isolados de pacientes demonstraram infecção por *L. (V.) guyanensis*⁷⁰, corroborando os dados investigados por Figueira *et al.* (2014), que analisaram os aspectos clínicos e epidemiológicos de 90 pacientes com LC no município mencionado entre 2005 e 2012, dos quais 80 das 90 cepas isoladas foram caracterizadas por *L. (V.) guyanensis*.⁷⁸

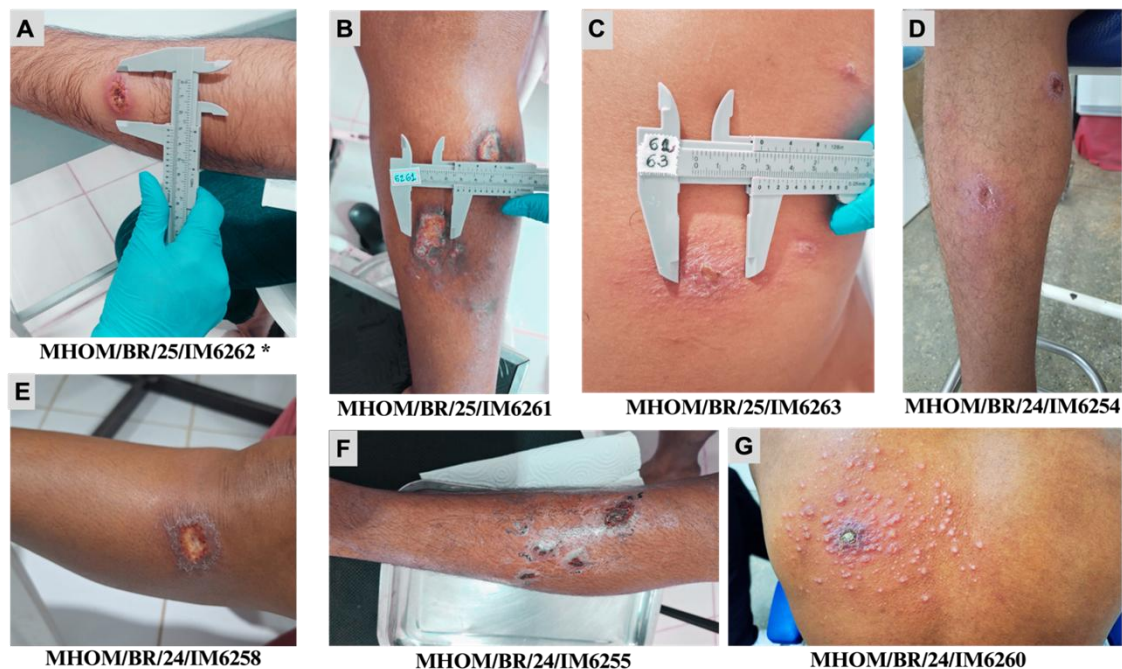


Figura 7 - Diversidade de lesões cutâneas em pacientes infectados com *Leishmania (Viannia) guyanensis* no município de Rio Preto da Eva - AM, BR. (A) Forma cutânea localizada, lesão ulcerada única; úlcera com bordas emolduradas; (B) lesão dupla com aparência impetigoide; (C): lesões múltiplas, ectematóides; (D) lesão dupla, impetigoide; (E) ectematóide com ulceração profunda e crostas espessas; (F) lesões múltiplas, evoluindo para uma úlcera franca, com crostas no centro; (G) lesões em placa formadas por várias pápulas eritematosas e infiltradas.

As lesões cutâneas causadas pela infecção por *L. (V.) guyanensis* são geralmente úlceras únicas ou múltiplas, com bordas elevadas e uma área central ulcerada com uma base granular, infiltrada, de cor eritematosa-violácea e indolor.⁶⁹ Elas começam como uma pápula, aumentando rapidamente de tamanho e formando uma úlcera (Fig.7). No entanto, as lesões podem ter aparências e tipos diferentes, e sua progressão é influenciada pelo estado imunológico do paciente. Como as lesões são na maior parte indolores e os pacientes fazem uso de vários medicamentos, a doença progride, e os pacientes frequentemente atrasam a busca por diagnóstico e tratamento apropriado.⁷⁹

Espir *et al.* (2014) também demonstraram uma predominância de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*, no município de Rio Preto da Eva, AM, onde, dos 33 voluntários investigados, 19 foram afetados por esta espécie. Eles ainda observaram um perfil imunológico caracterizado por níveis elevados das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-17, em amostras do soro de pacientes, quando comparado a outras espécies, sugerindo o envolvimento simultâneo das respostas imunológicas Th1, Th2 e Th17. Essa resposta imunológica complexa influencia tanto o controle do parasito quanto a patogênese da doença, contribuindo para a diversidade clínica observada nos pacientes.⁷²



UFAM

Considerando as manifestações clínicas, os pacientes apresentaram de uma a seis lesões cutâneas (Tabela 1). A maior proporção foi observada no grupo com duas lesões, correspondendo a 50% (5/10) da amostra. Pacientes com uma única lesão representaram 20% (2/10) dos casos, enquanto 10% (1/10) apresentaram quatro lesões e 10% (1/10) seis lesões. Um paciente (10%) apresentou uma lesão cutânea principal associada a múltiplas lesões satélites distribuídas ao redor da lesão primária. O tempo de apresentação e evolução foi de 14 a 60 dias aproximadamente. Esses achados diferem dos observados por Espir *et al.* (2014) em relação ao período de evolução, como: de 07 a 180 dias⁷³, também pela espécie *L. (V.) guyanensis*.

5.2 Resposta linfoproliferativa em PBMCs

Para os ensaios *in vitro*, as PBMCs foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços, fundo chato, organizadas em triplicata. O volume final de 200 μL por poço foi obtido pela adição de 100 μL de suspensão de PBMCs [2×10^5] e 100 μL de cada tratamento (MG ou GLU), testados separadamente. Como controles, utilizaram-se culturas não estimuladas (controle negativo) e culturas estimuladas com fito-hemaglutinina (PHA) [$10 \mu\text{g mL}^{-1}$] (controle positivo). As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida (95%) com 5% de CO_2 , por 72 h; após 18 h de incubação, adicionou-se BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) [25 μL].

O ensaio colorimétrico do tipo ELISA foi conduzido utilizando o kit de proliferação celular BrdU (Roche/Sigma-Aldrich®), seguindo as instruções do fabricante. A incorporação de BrdU foi mensurada por espectrofotometria (absorbância a 450 nm), considerando o aumento médio da densidade óptica. A resposta linfoproliferativa induzida por cada substância foi determinada com base na razão entre a média aritmética da triplicata dos controles positivo e negativo em relação aos poços com células estimuladas, descrito detalhadamente em Silva *et al.*, 2021.

Em relação à resposta linfoproliferativa dos linfócitos T, utilizada para avaliar a responsividade do sistema imunológico, pacientes primariamente infectados com *L. (V.) guyanensis*. Apresentaram uma média de proliferação celular de 30% quando estimulados com MG e 34% na presença de Glucantime®. O controle positivo com o mitógeno para células T/fito-hemaglutinina (PHA), mostrou uma resposta de 92%, confirmando a viabilidade e funcionalidade das células e descartando disfunções celulares intrínsecas, com diferença estatística de $P < 0,0001$ em relação aos grupos MG, GLU e CNe. (Fig 8).

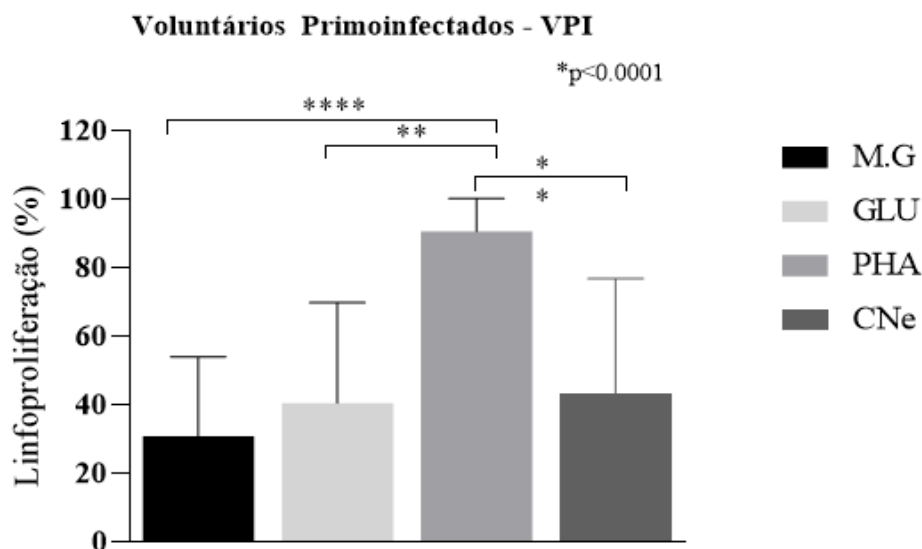


Figura 8 - Atividade linfoproliferativa de pacientes primariamente infectados, em resposta à estimulação com Metil Galato (M.G), Glucantime (GLU), Fitohemaglutinina (PHA) e Células não estimuladas (CNe). As linhas verticais representam o desvio padrão; as linhas horizontais representam significância estatística entre os tratamentos de ($p < 0.05$), **** = <0.0001 ; ** 0.0020; **0.0044.

No grupo de controle (Gr2) (Fig. 9), observou-se que o metil galato (MG) induziu uma proliferação média de 51%, enquanto o Glucantime® promoveu 63% e a fitohemaglutinina (PHA) atingiu 87%. A análise global por ANOVA indicou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos avaliados ($p = 0,0102$), evidenciando que pelo menos um grupo diferiu dos demais. Nas comparações múltiplas, verificou-se diferença significativa entre a resposta proliferativa induzida pela PHA em relação às culturas de células não estimuladas ($p = 0,0136$).

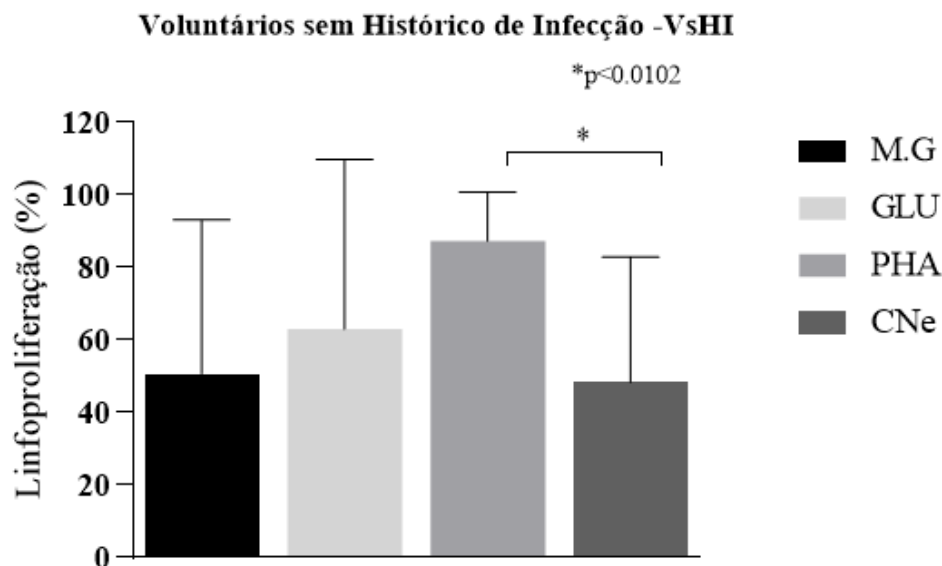


Figura 9 - Atividade linfoproliferativa de linfócitos T de voluntários sem histórico de infecção por *Leishmania*-VSHI, em resposta à estimulação por Metil Galato - M.G, Glucantime® - GLU, Fito hemaglutinina (PHA) e Células não estimuladas (CNe). As linhas verticais representam o desvio padrão; as linhas horizontais representam significância estatística entre os tratamentos de $p < 0.05$, $* = 0,0136$.

Os dados obtidos mostram que o MG foi capaz de induzir uma resposta linfoproliferativa tanto em células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados com LC, quanto em indivíduos controle, embora com magnitudes diferentes.

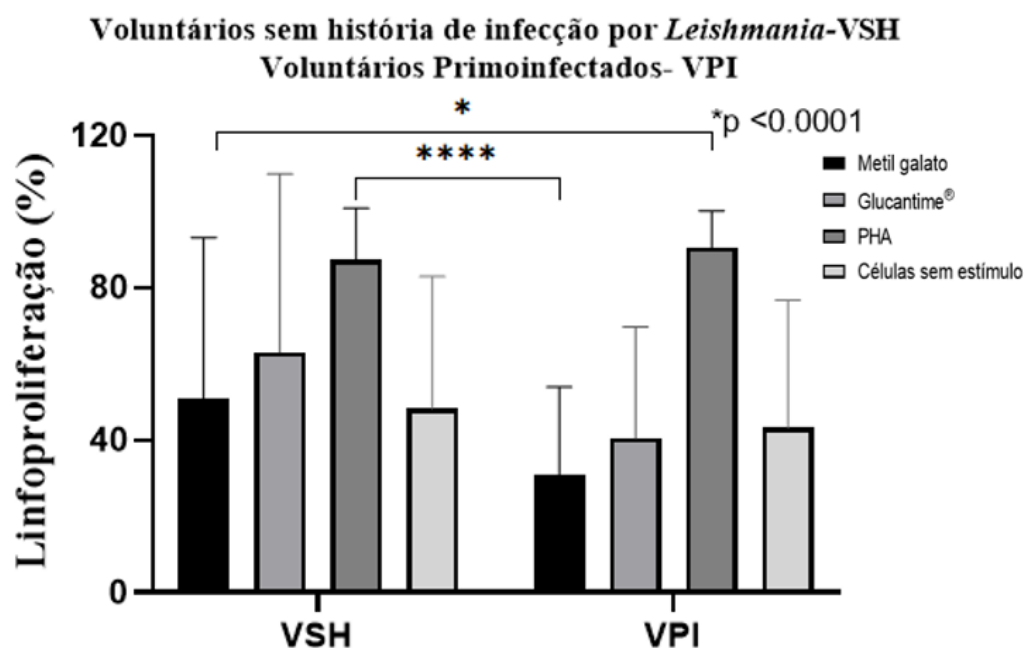


Figura 10 - Comparação da atividade linfoproliferativa de linfócitos T em voluntários sem histórico de infecção por *Leishmania*-VSHI em contraste com pacientes primariamente infectados em resposta à estimulação por Metil Galato- M.G, Glucantime®- GLU, Fito hemaglutinina (PHA) e células não estimuladas-CNe. As linhas verticais representam o desvio padrão; as linhas horizontais representam significância estatística entre os tratamentos de $p < 0.05$, $**** = <0,0001$; $* 0,01015$.

Na figura 10, observa-se a comparação entre os grupos de voluntários sem história de infecção por *Leishmania* (VSH) e os voluntários primoinfectados (VPI) (Fig. 10), verificou-se que o grupo VSH apresentou maior magnitude de linfoproliferação frente aos diferentes estímulos. Em contrapartida, o grupo VPI exibiu respostas proliferativas mais baixas em todos os estímulos avaliados. A análise estatística global revelou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,0001$), e as comparações múltiplas confirmaram diferenças entre estímulos



UFAM

específicos MG/VSH- PHA/VPI ($p < 0,0001^{****}$) e PHA/VSH e MG/VPI ($p < 0,01015$). Esses achados indicam que a infecção ativa por *Leishmania (V.) guyanensis* está associada a um estado de imunossupressão, refletido pela redução da capacidade proliferativa das células mononucleares do sangue periférico, característica descrita em pacientes com leishmaniose cutânea, causada por essa espécie.⁹⁰

Estudos anteriores demonstram que MG possui propriedades linfoproliferativas relevantes, capazes de interferir na ativação e proliferação de linfócitos T. Lee *et al.* (2010) mostraram que MG exerce uma potente atividade antitumoral ao inibir a infiltração de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺, modulando o microambiente inflamatório e favorecendo respostas efectoras. Esse mecanismo pode explicar a capacidade do MG de promover a proliferação de linfócitos no presente estudo, uma vez que a redução da influência supressora das Tregs pode potencializar a expansão de células T responsivas.⁸⁴

Rahman *et al.* (2021) e Liang *et al.* (2023) reforçam que os compostos fenólicos, como o MG, têm uma ampla gama de efeitos farmacológicos, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, que podem variar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro. Isso pode explicar a diferença na magnitude proliferativa entre pacientes e controles no contexto da leishmaniose. Por outro lado, Anderson & Teuber (2010) observaram que os polifenóis, como o ácido elágico, podem inibir a proliferação de PBMC e modular a secreção de citocinas, demonstrando que o efeito dessas moléculas pode ser estimulatório ou inibitório, dependendo da concentração, do tempo de exposição e do contexto imunológico.⁷⁶ Correa *et al.* (2016) complementam essa compreensão ao demonstrar que o MG reduz o recrutamento de neutrófilos, a produção de mediadores inflamatórios e a ativação de macrófagos em um modelo experimental de artrite.^{77, 86}

A resposta proliferativa induzida pelo Glucantime[®] está associada à sua ação antiparasitária direta e à carga antigênica reduzida⁴⁸, que influencia a resposta celular. No entanto, as limitações ao uso do Glucantime[®] incluem o aumento da resistência dos parasitos, com mecanismos como a superexpressão de genes de transporte e alteração das bombas de efluxo, além da toxicidade e das vias de administração invasivas, que dificultam sua aplicação^{87, 88}. Apesar das descobertas relevantes, a ausência de dados como a dosagem de citocinas: IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-13 é necessária para correlacionar a proliferação com a ativação funcional das células T e a identificação do paradoxo dos perfis Th1/Th2 (a ser realizada nos próximos meses). Além disso, a análise de pacientes em diferentes estágios



UFAM

clínicos pode fornecer informações adicionais sobre a dinâmica da resposta imunológica durante a infecção e o tratamento.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho, contribuem com estudos imunológicos relacionados a bioprospecção de medicamentos alternativos ou complementares para a leishmaniose cutânea, permitindo as seguintes conclusões:

- A partir do diagnóstico parasitológico de pacientes suspeitos com Leishmaniose cutânea no município de Rio Preto da Eva – AM, foram realizados isolamentos parasitários e esses foram identificados por PCR em tempo Real, com os iniciadores HSP70 e ITS-1, como *Leishmania (V.) guyanensis*;
- A substância comercial Metil Galato (éster metílico do ácido gálico, 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila/Sigma-Aldrich®), anteriormente isolada e caracterizada da fração Diclorometano do extrato metanólico de epicarpo da *Libidibia ferrea* (Jensen, 2020), apresenta atividade linfoproliferativa *in vitro* para células mononucleares de indivíduos humanos;
- O Metil Galato (Sigma-Aldrich®), na concentração de 54 µg/mL, estimulou *in vitro* a proliferação de linfócitos com magnitudes distintas frente as PBMCs de pacientes com LC e em voluntários saudáveis demonstrando a potencial capacidade de atuar nos mecanismos da resposta imune, estimulando uma resposta natural nos voluntários sadios e até mesmo específica (resposta imune adaptativa) em pacientes com LC;
- Sugere-se a continuidade dos estudos com o Metil Galato (Sigma-Aldrich®), como uma alternativa terapêutica contra a Leishmaniose cutânea.

7 PERSPECTIVAS

Foi constatado que o MG é capaz de induzir uma resposta linfoproliferativa significativa em PBMCs de indivíduos saudáveis e pacientes infectados principalmente com *L. (V.) guyanensis*, embora com menos intensidade neste último grupo. Este estudo contribui para uma



UFAM

análise mais cuidadosa da importância do efeito imunomodulador do MG. Embora a análise da proliferação celular forneça evidências iniciais consideradas relevantes para uma melhor elucidação da regulação da inflamação induzida pelo MG, investigações futuras devem complementar essas descobertas com abordagens funcionais mais robustas, como citometria de fluxo para caracterização fenotípica das subpopulações celulares envolvidas, bem como a medição de citocinas inflamatórias e regulatórias, a exemplo de (IFN- γ , IL-10, IL-4 e TNF- α) utilizando *Cytometric Bead Array* (CBA), para entender melhor esses mecanismos imunológicos relacionados. Portanto, essas descobertas sugerem que o MG tem um potencial relevante para uso terapêutico⁴⁵, com um efeito proliferativo significativo em células de indivíduos não infectados e com ação moderada, mas significativa, em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*.

A resposta linfoproliferativa induzida por MG favorece a compreensão de como essa substância orgânica pode afetar a resposta imunológica, levando ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes e direcionadas. Avaliar essa resposta pode fornecer informações valiosas sobre a eficácia do tratamento, a resposta imunológica adaptativa do paciente e ajudar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a doença em questão. O perfil dependente da dose do fármaco e o contexto imunológico do hospedeiro devem ser considerados em investigações futuras para elucidar os mecanismos envolvidos e explorar seu potencial terapêutico.

Os achados desse estudo reforçam a relevância de aprofundar a investigação sobre o papel do MG na regulação da resposta imune frente à leishmaniose cutânea. Para estudos futuros, a integração de análises funcionais adicionais que permitam caracterizar de forma mais ampla os mecanismos envolvidos, como: citometria de fluxo, para a definição fenotípica das subpopulações celulares envolvidas, dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (como IFN- γ , IL-10, IL-4 e TNF- α), visando elucidar o equilíbrio entre mecanismos efetores e regulatórios.

Essa compreensão aprofundada de sua ação sobre o sistema imune poderá ampliar as alternativas terapêuticas.



UFAM

8. REFERÊNCIAS

1. BRASIL - Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis; 2017. p. 189. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar. Acesso em: 2 jul. 2023.
2. ABRAÃO, L. S. O.; JOSÉ, B. M. P. A.; GOMES, C. B. S.; NUNES, P. C.; SANTOS, D. R.; VARELA, A. P. P. S.; et al. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil, entre 2008 e 2017. *Rev Pan-Amaz Saude*, v. 11, e2020006122020. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232020000100022&lng=pt. Acesso em: 16 out. 2024. doi:10.5123/s2176-6223202000612. Acesso em: 5 mai. 2023.
3. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. 2. ed. Washington, DC: OPAS, 2022. Acesso em: jun. 2023.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação do Contrato de Notificação (Brasil). Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Notificação de Acidentes. DATASUS. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS, 2022. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 2 jul. 2023.
5. SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239–251, May 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>. Acesso em: 2 jul. 2023.
6. IKEOGU, N. M.; AKALUKA, G. N.; EDECHI, C. A.; et al. Leishmania immunity: advancing immunotherapy and vaccine development. *Microorganisms*, v. 8, n. 8, p. 1201, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081201>. Acesso em: 5 jul. 2023.
7. PRATES, D.; et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol*, v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011.
8. NOVAIS, F. O.; CARVALHO, L. P.; PASSOS, S.; ROOS, D. S.; CARVALHO, E. M.; SCOTT, P.; BEITING, D. P. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol*, v. 135, n. 1, p. 94–101, Jan. 2015. doi:10.1038/jid.2014.305. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25036052; PMCID: PMC4268311.

9. AFONSO, L.; et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol*, v. 84, n. 2, p. 389–396, 2008.
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*, v. 18, n. 1, p. 26–41, 2018.
11. LIMA, E. B. de Porto C.; MOTTA, J. O. C. da; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An Bras Dermatol* [Internet], v. 82, n. 2, p. 111–124, Mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962007000200002>. Acesso em 4 abr. 2024
12. JENSEN, B. B. Avaliação da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos pré-clínicos da leishmaniose cutânea [tese]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2020. 148 f. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7969>.
13. SILVA, E. O.; et al. Evaluation of the lymphoproliferation of mononuclear cells in cutaneous leishmaniasis patients treated with *Libidibia ferrea*. *Acta Brasiliensis*, v. 5, n. 3, p. 97–102, 2021.
14. BACHA, T. J.; JENSEN, B. B.; RODRIGUES, D. C.; SILVA, M.; ARAÚJO, A.; GERALDI, K. S.; et al. Microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: an in vivo assay. *Acta Amaz* [Internet], v. 53, n. 3, p. 246–253, Jul. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4392202300681>. Acesso em 4 abr. 2024
15. NOLETO, D. C.; et al. Methyl gallate: selective antileishmanial activity correlates with host-cell directed effects. *Chem Biol Interact*, v. 320, 109026, 2020.
16. LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; DE SOUZA, A. A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 435–443, 1994.
17. CARVALHO, G. V. S.; SANTOS, G. M. O.; ANCHIETA, B. O.; PEREIRA, L. R.; RIBEIRO, J. S.; SOUZA, J. C. R.; DO VALLE FILHO, M. F.; SILVA, G. M. O.; DE OLIVEIRA, J. A. G.; BARBOSA, M. G. V. G. Evolução da leishmaniose tegumentar no Amazonas entre 2010 e 2019. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2019.
18. BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.



UFAM



19. GALATI, E. A. B.; GALVIS-OVALLOS, F.; LAWYER, P.; LÉGER, N.; DEPAQUIT, J. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite* [Internet], v. 24, art. 26, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017027>. Acesso em: 30 nov. 2024.
20. SANTOS, R. J. A influência das alterações climáticas na ocorrência da leishmaniose visceral no Brasil [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/48809>. Acesso em 30 nov. 2024
21. ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Rev Assoc Med Bras* [Internet], v. 64, n. 3, p. 281–289, Mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>.
22. REIS, L. C. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Rev Patol Trop / J Trop Pathol*, v. 35, n. 2, p. 103–116, 2006.
23. GABRIEL, Á.; BOLAS, A.; PALMA-MARQUES, J.; MOURATA-GONÇALVES, P.; RUAS, P.; DIAS-GUERREIRO, T.; SANTOS-GOMES, G. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *J Immunol Res*, v. 2019, 2603730, 2019.
24. SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002.
25. SALAIZO-SUAZO, N. et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Tropical Medicine & International Health*, v. 4, p. 801-811, 1999.
26. HANADA, R. S. B. et al. An in vitro evaluation of the antileishmanial and cytotoxic activity of methyl gallate associated with conventional treatment for cutaneous leishmaniasis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 18, n. 4, p. 48-54, 2024. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJPP>. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJPP2024.5396>. Acesso em 4 abr. 2024
27. OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*, v. 14, n. 15, p. 1377-1389, 2012.
28. CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 72, n. 2, p. 132-141, abr. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>. Acesso em 4 abr. 2024



UFAM



29. MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 6, p. 647-662, nov. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>. Acesso em 4 jun. 2024
30. SARAIVA, N. G. L. et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 159, p. 725-735, 1989.
31. VIEIRA, M. G. S. et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 979-983, 2002.
32. CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. *Diagnostic methods of american cutaneous leishmaniasis: a literature review*. *Revista de Patologia do Tocantins*. 2017, v. 4, n. 4, p. 55-59. DOI: 10.20873/uft.2446-6492.2017v4n4p55. Disponível em: <https://doi.org/10.20873/uft.24466492.2017v4n4p55>. Acesso em 23 ago. 2024
33. GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
34. BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: história, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 328-337, 2004.
35. BOURREAU, E. et al. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 4, p. 1465-1474, 2009.
36. KAYE, P. M.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2630>. Acesso em 10 abr. 2025
37. MURRAY, H. W. et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 192, n. 4, p. 673-681, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/432090>. Acesso em 25 nov. 2024
38. SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to leishmaniasis. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri960>. Acesso em 10 abr. 2025

39. RIBEIRO, G. B. L. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: a review of its biology and epidemiology in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 5, p. 307-319, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760160342>. Acesso em 10 abr. 2025
40. BITTENCOURT, A.; SILVA, A. L. Immune response in leishmaniasis: the role of T regulatory cells and memory T cells. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1234, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01234>. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01234>. Acesso em 10 ago. 2025
41. KARIMKHANI, C. et al. Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, v. 16, n. 5, p. 1-15, 2016.
42. QUIRINO, G. F. S. et al. Interleucina-27 (IL-27) medeia a suscetibilidade à leishmaniose visceral suprimindo a resposta IL-17-neutrófilo. *Infection and Immunity*, v. 84, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00283-16>. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.00283-16>. Acesso em 10 ago. 2025
43. CARVALHO, A. M. et al. Resposta imune in situ versus sistêmica na patogênese da leishmaniose cutânea. *Pathogens*, v. 13, n. 3, p. 199, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens13030199>. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens13030199>. Acesso em 10 ago. 2025
44. SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: a narrative review. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, e29510716543, 2021.
45. ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 3, p. 497-506, maio 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300012>. Acesso em 1 set. 2024
46. ESFANDIARPOUR, I. et al. Adverse effects of intralesional meglumine antimoniate and influence on clinical laboratory parameters in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, v. 51, p. 1221-1225, 2012. Acesso em 1 set. 2024
47. MEIRA, R. M. V. et al. Low doses of 3-phenyl-lawsone or meglumine antimoniate delivery by tattooing route are successful in reducing parasite load in cutaneous lesions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*-infected hamsters. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, p. 1025359, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1025359>. Acesso em 1 set. 2024
48. SOTO, J. et al. Miltefosina para leishmaniose cutânea do novo mundo. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, p. 1266-1272, 2004.

49. LIMA, E. B. de; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C. da; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 82, n. 2, p. 111-124, mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962007000200002>. Acesso em 1 set. 2024
50. MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 18, p. 187-198, 1985.
51. OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 257-266, 2004.
52. OLIVEIRA, L. F. G. et al. Evidência de toxicidade tecidual em BALB/c exposto a longo prazo com oxiranos em comparação com antimoniato de meglumina. *BioMed Research International*, v. 2017, p. 1-9, 2017.
53. BARCELOS VIANA, M. T.; MARINHO DOS SANTOS, V. Desafios da terapêutica da leishmaniose: limitações atuais e perspectivas futuras. *Braz J Implantol Health Sci*, v. 6, n. 9, p.3501-3518,21set.2024.Disponívelem:<https://bjih.s.emnuvens.com.br/bjih/article/view/3618>. Acesso em 1 nov. 2024.
54. DUQUE, M. C. O. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumine antimoniate at a primary care unit in Brazil. *Revista de Medicina e Saúde Brasil*, v. 6, n. 2, p. 240-248, 2017.
55. BRITO, A. Q.; SILVA, R. S.; MEDEIROS, M. D. et al. Evaluation of cytotoxicity and antileishmanial activity of plant-derived compounds against *Leishmania* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 247, p. 112-119, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112119> . Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112119>. Acesso 3 nov. 2024.
56. CHAGAS NETO, F. C. Caracterização, toxidade e aspectos funcionais do extrato de Jucá (*Libidibia ferrea*): atividades anti-inflamatória e antioxidante. 2022. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/68905>. Acesso 3 nov. 2024.
57. COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. et al. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. *Acta Amazonica*, v. 47, p. 331-340, 2017.
58. MOTA, B. A. S.; RESQUE, R. L. V.; FANI, D. M. Estudo in silico das atividades biológicas dos metabólitos isolados de *Libidibia ferrea* Martius. *Arigó - Revista do Grupo PET Acadêmico de Geografia da UFAC*, v. 3, n. 2, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/arigoufac/article/view/5567>. Acesso em: 29 out. 2024

59. SILVA, Bruna Karine Almeida da. Utilização do Jucá (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) em Barro Duro, área rural de Tutóia, Maranhão. 2021. Disponível em: <http://repositorio.uespi.br:8080/handle/123456789/209>. Acesso em: 29 out. 2024.
60. SILVA, A. C. A etnofarmacologia na Amazônia: um estudo de caso nas comunidades São Francisco e São José sobre o uso de plantas medicinais no município de Careiro da Várzea. 2024. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br>. Acesso em: 29 out. 2024.
61. OLIVEIRA, F. G. dos A.; SANTOS, F. da S.; OLIVEIRA, R. P. de; QUEIROZ, L. P. Reassessing the taxonomy of the *Libidibia ferrea* complex, the iconic Brazilian tree “pau-ferro” using morphometrics and ecological niche modeling. *Brazilian Journal of Botany*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40415-024-01011-0>. Acesso em: 1 jul. 2025.
62. MIKI, S. A. Desenvolvimento de formulações semissólidas contendo extrato seco padronizado de *Libidibia ferrea*. 2021. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br>. Acesso em: 1 jul. 2025.
63. FRANCO, A. M. R., organizadora. Formação do conhecimento científico em leishmaniose tegumentar no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia: a iniciação acadêmica em estudos parasitológicos, bioquímicos e moleculares. Vol. 1. Belo Horizonte: Poisson, 2023. Acesso em: 1 jul. 2025.
64. SILVA, R. T. C. Síntese, caracterização e estudos biológicos de complexos de Pt(II) e Pd(II) contendo ácido gálico e derivados. 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br>. Acesso em: 1 jul. 2025.
65. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>. Acesso em: 1 mai. 2025.
66. QIAGEN. QuantiTect Probe PCR Handbook. 2022. Disponível em: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=2e58e8ef-94e7-41c2-b134-0d812c5b0e4f>. Acesso em: 1 jul. 2025.
67. FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO/ FUHAM. Protocolo interno para detecção e identificação de espécies de *Leishmania* por PCR em tempo real. Manaus, 2024. Disponível em: <https://medtrop2024.com.br/evento/medtrop2024/trabalhosa-provados/naintegra/1893>. Acesso em: 1 mai. 2025.
68. NAIFF, R. D. et al. Características clínicas e epidemiológicas da leishmaniose tegumentar em áreas rurais da Amazônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 1, p. 45-50, 2009.

69. GUERRA, J. A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Amazônia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 451-459, 2006.
70. SILVA, L. A.; PINHEIRO, F. F.; FIGUEIRA, L. P. Predominância de *Leishmania* (V.) *guyanensis* na região metropolitana de Manaus. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 14, n. 3, p. 55-62, 2023.
71. PINHEIRO, F. F.; JUNIOR, R. N.; GUERRA, J. A. Ciclo zoonótico e distribuição de *Lutzomyia* na Amazônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 78-84, 2012.
72. ESPIR, M. C. et al. Perfil imunológico em pacientes com *L. guyanensis* em Rio Preto da Eva. *Revista Brasileira de Parasitologia*, v. 21, n. 4, p. 215-222, 2014.
73. NOGUEIRA, F. M.; SAMPAIO, R. L. Distribuição anatômica das lesões cutâneas em LTA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 3, p. 221-227, 2001.
74. ALBERIO, L. et al. Fatores ambientais e formas clínicas de LTA na Amazônia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 14, n. 2, p. 34-40, 2023.
75. SANTOS, N. T. et al. Epidemiologia clínica da leishmaniose cutânea em Rio Preto da Eva. *Brazilian Journal of Development*, v. 9, n. 7, p. 1110-1119, 2023.
76. ANDERSON, J.; TEUBER, S. Effects of ellagic acid on lymphocyte proliferation: dose- and time-dependent responses. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 21, n. 2, p. 124-131, 2010.
77. ALVES, C. et al. Efeitos de compostos fenólicos em macrófagos infectados por *Leishmania major*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 802, 2017.
78. FIGUEIRA, L. P. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Rio Preto da Eva. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 4, p. 501-508, 2014.
79. AZEREDO-COUTINHO, R. B.; MENDONÇA, S. C. F. Formas clínicas das leishmanioses tegumentares nas Américas. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R., comps. *Leishmanioses do continente americano* [Internet]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014. p. 310-326. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0019>. Acesso em: 1 mai. 2025.
80. LOPES, L. L. et al. Caracterização epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana no estado do Amapá entre 2018 a 2022. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, Suppl



UFAM



1, p. 103128, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103128>. Acesso em: 1 mai. 2025.

81. ALENCAR, D. G. S.; COSTA, F. S. Resiliência pedagógica: escolas ribeirinhas frente às variações de seca e cheia do Rio Amazonas. *Educação e Pesquisa*, v. 47, e230347, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1678-4634202147230347>.

82. CASTRO, A. T. Polimorfismo das lesões causadas por leishmaniose tegumentar americana no Amazonas: atlas clínico diagnóstico. 104 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Dermatologia) – Universidade do Estado do Amazonas, 2023.

83. CRUZ, B. R.; LIMA, A. D. A.; BARRETO, F. B.; CARVALHO, E. R. Leishmaniose tegumentar americana (LTA): formas de contaminação e coinfeção. *Brazilian Journal of Development*, v. 9, n. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv9n7-038>.

84. RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

85. LEE, H. et al. Methyl gallate exhibits potent antitumor activity by inhibiting CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell infiltration in tumors. *Journal of Immunology*, v. 185, n. 11, p. 6698-6705, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001373>.

86. RAHMAN, M. M. et al. Role of phenolic compounds in human diseases: current knowledge and future prospects. *Molecules*, v. 27, n. 1, p. 233, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>. Acesso em: 1 mai. 2025.

87. CORREA, C. R. et al. Anti-inflammatory effect of methyl gallate on experimental arthritis: inhibition of neutrophil recruitment, production of inflammatory mediators, and activation of macrophage. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 580-588, 2016.

88. POURMOHAMMADI, B.; MOTAZEDIAN, M. H.; HANDJANI, F.; HATAM, G. H.; HABIBI, S.; SARKARI, B. Glucantime efficacy in the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 42, n. 3, p. 502-508, 2011.

89. KARAMIAN, M.; FAROGHI BOJD, M. S.; SALEHABADI, A.; HEMMATI, M.; BARATI, D. A. Efficacy of meglumine antimoniate against *Leishmania tropica* in a newly emerged focus of cutaneous leishmaniasis in Birjand, Eastern Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*, v. 21, n. 4, p. 280-286, 2015. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/255104>. Acesso em: 1 mai. 2025.



UFAM



90. MATTA, N. E.; NOGUEIRA, R. S.; FRANCO, A. M.; SOUZA E SOUZA, I.; MATTOS, M. S.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G.; LEON, L. L.; DA-CRUZ, A. M. *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 3, p. 339-344, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FOLDER EDUCATIVO

Onde buscar ajuda?

Se você apresentar sintomas ou suspeitar de leishmaniose tegumentar (ferida braba), procure a unidade de saúde mais próxima. Quanto mais cedo o diagnóstico e o tratamento forem realizados, melhores são as chances de cura e recuperação completa. Proteja sua família, informe-se e cuide de sua saúde!

Atenção!

Se você notar uma ferida que não cicatriza, não aplique pomadas, remédios caseiros ou qualquer outro produto sem orientação médica. Pois isso pode piorar a lesão além de dificultar o diagnóstico.

Prevenção

Usar: repelentes de insetos na pele exposta.

Roupas Adequadas: Usar roupas que cubram braços e pernas, especialmente ao amanhecer e entardecer, que são os horários de maior atividade do mosquito-palha.

Limpeza ambiental:

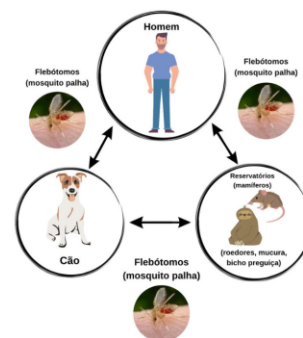
Manter quintais e assoalhos limpos e evitar acúmulo de lixo orgânico, como folhas e restos de alimentos, que atraem os mosquito-palha.

Cuidado com os animais:

Manter os animais domésticos longe de áreas florestais e protegidos do mosquito-palha.

Leishmaniose “ferida braba”

Ciclo da Leishmaniose



O que é a (ferida braba)?

A Leishmaniose Tegumentar (ferida braba), é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Ela acomete a pele e, em alguns casos, as mucosas. Esta doença é transmitida pela picada de pequenos insetos conhecidos como "mosquito-palha".

Como é transmitida?

Vetores: O mosquito-palha pica animais, como cachorros, bicho preguiça, mucas, que podem estar infectados, e depois transmite o parasita ao picar humanos.

• **Áreas de Risco:** Regiões rurais e/ou florestais são mais propensas à presença desses insetos, de modo geral nas áreas com uma grande quantidade de matéria orgânica, como folhas e restos de animais, que são ambientes ideais para os mosquito-palha se desenvolverem.

Sintomas

Feridas na pele

Geralmente aparecem como feridas, com bordas elevadas e indolores. Elas podem surgir em qualquer parte do corpo exposta à picada do mosquito-palha.



Nódulos, inchaço e/ou vermelhidão:

Nas áreas onde ocorrem as lesões.



Feridas nas mucosas

Em casos mais graves, o parasita pode atingir mucosas da boca, nariz e garganta, causando destruição dos tecidos.



Os sintomas variam conforme a fase da infecção, a espécie de *Leishmania* envolvida e o estado imunológico da pessoa acometida.

Diagnóstico

Histórico Clínico:

Informações sobre viagens/ passeios à áreas endêmicas nos últimos 3 meses. Exemplo: **assentamentos ao longo da AM 010.**

Exames laboratoriais:

Coleta de amostras da lesão para serem analisadas por microscopia.

Tratamento

O tratamento da leishmaniose tegumentar (ferida braba) é feito com medicamentos que eliminam o parasita. É disponibilizado pelo SUS. É importante tratar a doença cedo para evitar complicações, como a disseminação para mucosas.



APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

ID E N T I F I C A Ç Ã O	NOME DO PACIENTE:			
	ENDEREÇO COMPLETO			
	TELEFONE ()	OCUPAÇÃO	DATA DE NASCIMENTO	CEP
	SEXO	RAÇA/ COR	Observações:	
	FEMININO ☐	BRANCA ☐		
MASCULINO ☐	PRETA ☐			
HISTÓRI A D O V I A J A N T E	VOCÊ VIAJOU PARA ÁREAS DE MATA, IGARAPÉS OU SÍTIOS NOS ÚLTIMOS 2 MESES ?		SE SIM AO ITEM X, POR FAVOR, NOS INFORME A DATA E LOCAL	
	SIM ☐	NÃO ☐		
	CASO SEJA DO SEXO FEMININO, RESPONDA OS ITENS DE		5- DATA DA ÚLTIMA MENSTRUACÃO	
	1 A 5		OBSERVAÇÕES IMPORTANTES:	
	1- ESTOU GRÁVIDA	☐		
	2-NÃO ESTOU GRÁVIDA	☐		
	3- FAÇO USO DE MÉTODOS CONTRACEPTIVOS	☐		
	4- NÃO FAÇO USO DE MÉTODOS CONTRACEPTIVOS	☐		
VOCÊ POSSUI ALGUMA DAS COMORBIDADES ABAIXO:		VOCÊ ESTEVE DOENTE NOS	VOCÊ APRESENTO	



UFAM



		ÚLTIMOS 2 MESES ?	U FEBRE (> 37,8°C) NOS ÚLTIMOS 2 MESES ?
HIPERTENSÃO ARTERIAL (PRESSÃO ALTA) ☐		SIM ☐	SIM ☐
DIABETES ☐		NÃO ☐	NÃO ☐
DOENÇAS AUTOIMUNE ☐	VOCÊ FAZ USO DE ALGUMA DESSAS MEDICAÇÕES ?*		
IMUNOSSUPRESSÃO/IMUNODEPRESSÃO ☐	PREDINISONA ☐	NIMESULIDA ☐	
NÃO POSSUO ☐	IBUPROFENO ☐	INDOMETACIN ☐	
	NAPROXENO ☐	CETOPROFENO ☐	
VOCÊ JÁ TEVE LEISHMANIOSE ?		O diagnóstico foi feito em ambiente hospitalar ou Unidade básica de Saúde?	
TEGUMENTAR ☐	SIM ☐	NÃO (autod diagnóstico) ☐	
VISCERAL ☐			
NÃO ☐			
VOCÊ FEZ USO DE ALGUMA DAS MEDICAÇÕES / REMÉDIOS CASEIROS ABAIXO PARA TRATAR A LTA?			
Nistatina®POMADA	BANHA DE COBRA ☐	OUTROS:	
Terramicina®POMADA	JUCÁ ☐		
Neomicina®POMADA			
SUA RESIDÊNCIA É LOCALIZADA EM ÁREA DE MATA OU DE DESMATAMENTO? (EX: RAMAIS)		HÁ ANIMAIS EM SEU DOMICÍLIO OU EM REGIÃO PERIDOMICILIAR	



UFAM



MATA	DESMATADA ☐	SIM ☐	NÃO ☐
NÃO		HÁ ANIMAIS SILVESTRES EM SEU DOMICÍLIO OU EM REGIÃO PERIDOMICILIAR	
VOCÊ POSSUI O HÁBITO DE UTILIZAR REPELENTES EM CASA?		SIM ☐	NÃO ☐
SIM	NÃO ☐	VOCÊ POSSUI TELAS DE PROTEÇÃO CONTRA INSETOS EM SUA RESIDÊNCIA ?	
VOCÊ POSSUI O HÁBITO DE UTILIZAR REPELENTES CORPORAIS?		SIM ☐	NÃO ☒
SIM ☐	NÃO ☐		
VOCÊ POSSUI O HÁBITO DE UTILIZAR ROUPAS DE MANGAS LONGAS E CALÇAS COMPRIDAS AO AMANHECER, ANOITECER OU AMBOS OS HORÁRIOS?			
AMANHECER ☐	ANOITECER ☐	AMBOS OS HORÁRIOS ☐	

APÊNDICE C – Artigo elaborado durante o mestrado (versão em fase de submissão na European Journal of Microbiology and Immunology).

Lymphoproliferative activity of methyl gallate in mononuclear cells of patients with cutaneous leishmaniasis in Amazon, Brazil

Mayara Arguello da Silva^{1,2}, Rafaela Benício Santana^{1,2}, Afranio de Lima Carvalho¹, Rebecca Sayuri Hannada¹, Bruno Bezerra Jensen², Fabiane de Souza Tapajos Viana³, Felipe Jules Araujo⁴, Guilherme Caldas de Souza⁴, André Luiz Leturiondo⁴, Paula Figliuolo da Cruz Borges², Francimeire Gomes Pinheiro² and Antonia Maria Ramos Franco Pereira²

¹ Postgraduate degree in Basic and Applied Immunology, Federal University of Amazonas, AM, BR.

² Leishmaniasis and Chagas Disease Laboratory, National Institute for Amazonian Research, Manaus, AM, BR

³ Metropolitan Faculty of Manaus, Manaus, AM, BR.

⁴ Molecular Biology Laboratory of the Alfredo da Matta Tropical Medicine Foundation (FUHAM), Manaus, AM, BR.

ABSTRACT

Introduction: American cutaneous leishmaniasis (ACL) remains a serious public health problem in the Amazon region, with increasing incidence and challenges related to access to diagnosis and treatment. Due to the toxicity of conventional drugs, natural compounds such as methyl gallate (MG), present in the dichloromethane fraction of *Libidibia ferrea*, have been investigated for their immunomodulatory potential. In order to evaluate the ability of MG to stimulate T lymphocytes *in vitro*, the lymphoproliferative response was measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients primarily infected with *Leishmania* and in cells from healthy individuals. **Methods:** PBMCs were stimulated in the presence of MG, Glucantime[®], and phytohaemagglutinin (PHA), incubated for 72 hours, and read using the Elisa kit. Cell proliferation was assessed by BrdU incorporation. In the infected patient group, MG induced approximately 30% proliferation, while Glucantime[®] resulted in 34%, both lower than the response observed in the positive control group with PHA (51% and 63%, respectively). In both groups, the differences in cell stimulation were statistically significant ($p < 0.0001$; $p = 0.0102$). The parasites isolated from patients were identified by qPCR with probes (TaqMan) for the ITS1 and HSP70 genes. **Results:** The parasites isolated from patients were identified as *Leishmania (Viannia) guyanensis*. The results indicate that MG has immunomodulatory potential, with lower toxicity, promising viability as a therapeutic alternative for ACL, especially in uninfected individuals. These findings reinforce the importance of further studies on phenolic compounds in the context of the disease.

KEYWORDS

Immune Response, Cell Proliferation, Immunomodulation, leishmaniasis, methyl gallate, qPCR.

INTRODUCTION

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) remains a serious public health problem in the Amazon, with high endemicity and epidemiological patterns that reinforce its complexity [1]. In 2023, Brazil recorded approximately 13,000 cases of ACL. Geographically, the North region had the highest number of notifications, totalling 5,927 cases. Among the northern states, Pará stood out with 2,374 cases, followed by Amazonas [2].

In the state of Amazonas, 1,295 cases were recorded in 2023, representing an increase of 58.7% over the previous year. The Alfredo da Matta Foundation reported a 341% increase in new cases in just one year [3], highlighting the spread of the disease in the region [4]. Araújo *et al.* (2024), using molecular biology techniques with probes (TaqMan) for the ITS1 and HSP70 genes, discovered, in an observational, cross-sectional, and prospective analytical study at the Alfredo da Matta Foundation (FUAM) in Manaus, Amazonas, that of 253 patients suspected of having the disease, parasite species were confirmed in 226 samples. Of this total, 96% (218) were of the subgenus *Viannia* and 4% (8) were *Leishmania*. Of these cases, 86.28% (195) were caused by the species *L. (V.) guyanensis*, 8.85% (20) by *L. (V.) braziliensis*, and 4.87% by rare species such as *L. (L.) amazonensis* (8), *L. (V.) lainsoni* (2), and *L. (V.) naiffi* (1). All samples were sequenced using a 234 bp fragment of the highly polymorphic HSP70 gene, ideal for species discrimination [5].

The distribution of ATL in the Amazon is strongly influenced by environmental and occupational factors [6], since the expansion of agricultural frontiers and deforestation have been identified as critical factors for maintaining and increasing transmission [7]. Furthermore, limitations in access to diagnosis and treatment persist in most Amazonian municipalities, where approximately 76.4% have limited laboratory capacity [8].

In response to these challenges, research into therapeutic alternatives has investigated new targets in natural products, which have shown promising potential for the development of new medicines.

According to the Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi, 2023), it is essential to prioritize the search for new therapeutic options [9], especially those for topical use or oral administration, which offer effective, fast-acting treatment with low toxicity, promoting greater adherence among patients affected by ATL [10]. Phenolic compounds are a class of secondary metabolites present in various plants, widely distributed in nature [11]. Chemically, phenolics are characterized by one or more hydroxyl (-OH) groups directly attached to aromatic rings. The main types of phenolic compounds include flavonoids, tannins, phenolic acids, lignans, and coumarins [12]. Among the plants that contain phenolic compounds with medicinal relevance, jucá (*Libidibia ferrea*), a species native to the Amazon region, also known as pau-ferro, stands out. It is widely used in traditional medicine by indigenous communities and local populations [13]. This diversity of bioactive properties has motivated studies in the area of research and innovation, which seek to evaluate the effectiveness of jucá when combined with other compounds, whether natural or synthetic [14]. In addition, efforts have been directed towards the development of new technologies for the extraction and purification of its active compounds, with the aim of maximising its therapeutic potential and expanding its applications [15,16].

Given the recognised pharmacological properties of Jucá, *Libidibia ferrea*, the research group at the Leishmaniasis and Chagas Disease Laboratory/National Institute for Amazonian Research (INPA) has developed a significant line of research focused on the application of this plant in the context of combating leishmaniasis, contributing to the exploration of therapeutic alternatives based on natural products [17].

Over the last two decades, several studies have highlighted the pharmacological contributions of *Libidibia ferrea* in the context of leishmaniasis. Cortez (2004) was the first to evaluate the *in vitro* activity of phytochemical extracts from *L. ferrea*. Subsequently, Falcão (2010) investigated the biological activity of plant extracts against *Leishmania* (*Viannia*)

guyanensis and analysed semi-purified fractions of this species. Expanding on these findings, Comandolli-Wyrepkowski (2017) demonstrated the antileishmanial activity of *L. ferrea* extracts through *in vitro* and *in vivo* assays. In the same year, Jensen (2017) reported the antileishmanial potential of the dichloromethane fraction of *L. ferrea*, followed by additional preclinical studies on cutaneous leishmaniasis using this fraction (Jensen, 2020). More recently, Silva et al. (2021, 2023) deepened knowledge about the plant's immunomodulatory potential by evaluating the activity of a copper(I) complex combined with *L. ferrea* in cutaneous leishmaniasis and analysing the lymphoproliferative responses of mononuclear cells from patients treated with the extract. In addition, these authors developed a microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (methyl gallate) for topical treatment in an *in vivo* model. Continuing this line of research, Hanada et al. (2024) evaluated the *in vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of methyl gallate in association with conventional treatment for cutaneous leishmaniasis.

Regarding the bioactive compounds of *Libidibia ferrea*, methyl gallate (MG) is the methyl ester of gallic acid, a phenolic acid prevalent in the plant kingdom, and its presence in herbal medicines may be related to its remarkable biological effects, such as its antioxidant, antitumour, and antimicrobial activities. Although some indirect evidence suggests anti-inflammatory activity for MG, there are no studies demonstrating this effect in animal models [18]. However, Bacha et al. (2023) demonstrated the efficacy of a microemulsion containing methyl gallate, alone or in combination with Glucantime[®], for the experimental treatment of cutaneous leishmaniasis in a 30-day *in vivo* trial using golden hamsters infected with *L. (L.) amazonensis*. Although none of the treatments achieved clinical or parasitological cure, remarkable improvements were observed in the combined group, with significant reductions in skin lesions on the nose and parasite load when compared to the control. The authors concluded that the integration of a topical methyl gallate microemulsion with intralesional Glucantime[®]

showed potential as an effective treatment for cutaneous leishmaniasis [19]. Correa et al. (2016) demonstrated that MG (0.7-70 mg/kg) inhibited experimental zymosan-induced arthritis in a dose-dependent manner. Oral administration of MG (7 mg/kg) attenuated zymosan-induced arthritis by affecting oedema formation, leukocyte migration, and the production of inflammatory mediators (IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL-1, LTB₄, and PGE₂). Pre-treatment with MG inhibited CXCL-1-induced neutrophil chemotaxis *in vitro*, as well as the adhesion of these cells to endothelial cells prepared with TNF- α . MG also impaired zymosan-stimulated macrophages, inhibiting IL-6 and NO production, COX-2 and iNOS expression, and intracellular calcium mobilisation. Thus, MG is likely to have an anti-inflammatory effect by acting on multiple cellular events, such as the production of various inflammatory mediators, as well as the activation and migration of leukocytes. The results presented make MG a promising candidate for safer and more effective therapeutic approaches, including for leishmaniasis [20].

The immune response in ACL is complex and crucial for controlling infection, although the pathogen has mechanisms for immune evasion. Pharmacological treatment is the basis of therapy, with options varying depending on the clinical syndrome and *Leishmania* species. Understanding the variants in the immune response is fundamental to developing new therapeutic strategies, including drugs that aim to correct the alternative pathways created by the parasite to escape the immune system. Therefore, knowledge of the lymphoproliferative response is essential in the search for therapeutic targets for the disease, as it allows us to understand the interaction between the host's immune system and the parasite and to identify immune pathways that can be modulated to control the disease or provide advanced treatments. Measuring the lymphoproliferative response to parasitic antigens can serve as a biomarker of disease status and treatment efficacy, as high levels of lymphocyte proliferation may be indicative of the immune system's ability to control infection. By understanding which

lymphoproliferative responses are protective and which are ineffective or harmful, it is possible to develop therapeutic strategies aimed at stimulating desirable immune responses. This may include the use of specific cytokines, vaccine antigens, or immune cell manipulation.

Analysis of patients' lymphoproliferative responses before and after treatment can indicate the efficacy of the therapies used. For example, an increase in lymphoproliferative response after treatment may suggest a better immune response against the parasite. To evaluate the immunomodulatory effects of MG on PBMCs from patients with ACL and advance our understanding of the immunomodulation of this disease, corroborating our knowledge of phenolic compounds, this study allows us to suggest new therapeutic compounds that are less invasive, safe, and economical, suitable for patients with chronic diseases. The results have innovative potential in the investigation of natural substances and can provide valuable contributions to public health policies, especially benefiting the most vulnerable populations affected by NTDs.

MATERIALS AND METHODS

Study cohort and data collection

This study is divided into two cohorts: one for patients infected with *Leishmania* (n=10) diagnosed and confirmed after parasitological tests, who had not yet started the therapeutic regimen, and another for a negative control group for leishmaniasis, with no history of LCA infection, residing in the city of Manaus, AM, considered volunteers (n=10). Both groups were recruited during the same seven-month evaluation period. Written informed consent was required before enrolment of all study participants. For both groups, the *in vitro* lymphoproliferative response to MG exposure was investigated using immunological parameters.

Parasitological diagnosis

The group (Gr1) of patients with primary infection consisted of individuals recently diagnosed with ACL, without previous treatment (n=10), from the Metropolitan Region of Manaus-AM; they had previously undergone anamnesis, swab and/or scarification of the inner edge of the lesion. The collected material was smeared on a slide and then stained with the Quick Panoptic Kit® (Laborclin) to detect *Leishmania* spp. amastigotes and confirm the diagnosis of ACL. The samples collected were also seeded in NNN (Novy, MacNeal and Nicolle) culture medium for parasitological confirmation of the presence of promastigote forms of the parasite. Group 2 (Gr2), composed of volunteers with no history of LCA infection (n=10), residing in the city of Manaus, had blood samples collected for comparative analysis, serving as a control group for the study.

Molecular identification of *Leishmania* species by qPCR in house

To identify parasites isolated from patients with ACL, TaqMan® real-time PCR assays were performed, targeting the HSP70 and ITS-1 gene regions.

Genomic DNA extraction: Genomic DNA extraction from the parasite mass of isolates from infected patients was performed using the DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions, with minor adaptations for protozoa. The parasite mass, previously obtained from parasites isolated in culture, was subjected to digestion with proteinase K in ATL buffer, followed by incubation at 56 °C for 1 hour. After lysis, AL buffer and absolute ethanol were added, with subsequent transfer to the purification columns (centrifugation columns) provided by the kit. The washing steps were performed with AW1 and AW2 buffers, according to the standard protocol, and the DNA was eluted in AE buffer [21]. The extracted DNA was stored at -20 °C until use. After extraction of genomic DNA from the parasite mass, molecular characterisation of the samples was performed to identify the *Leishmania* species.

Reaction: The reactions were performed in 96-well plates, sealed with optical film, centrifuged briefly to eliminate bubbles and homogenise, and then processed in the 7500 Fast Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, USA). The thermal programme used consisted of: initial denaturation at 95 °C for 10 minutes; 40 amplification cycles consisting of denaturation at 95 °C for 15 seconds and annealing/extension at 60 °C for 1 minute, with fluorescence acquisition at the end of each cycle. The data were analysed using 7500 Software v2.3® (Applied Biosystems) [22].

Obtaining peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and lymphoproliferation assay

In vitro lymphoproliferation assays were performed with peripheral blood mononuclear cells isolated from the blood of volunteers [23]. The plates for the *in vitro* cell proliferation experiments will have 96 individual wells, with samples organised in triplicates. A total of 100 μL /well of PBMCs ($2 \times 10^5/\text{mL}$) was added, and the plate will be organised as follows: wells with cells stimulated with methyl gallate (methyl ester of gallic acid, methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate) [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]; cells treated with Glucantime[®] [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]; cells without substance stimulation [RPMI medium (Gibco) only, negative control]; and phytohaemagglutinin (PHA) [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$], considered a positive control for lymphoproliferation. Methyl gallate (methyl ester of gallic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoate methyl ester (Sigma-Aldrich/St. Louis, MO, USA) and the concentration used was previously defined at [54 $\mu\text{g}/\text{mL}$], as described in Jensen (2020) [24]. The substances were previously diluted in complete RPMI medium and, after adding all substances and PBMCs, the plates were incubated for 72 hours in an oven (ThermoScientific Forma[®] Series II WaterJacketed CO₂ Incubators) at 37 °C with CO₂ levels of 5% and humidity of 95%. The lymphoproliferation assay was performed according to the procedures described in Silva et al. (2021). The kit used was Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche), which quantifies cell proliferation through the incorporation of the thymidine analogue 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) during DNA synthesis in replicating cells.

Statistical analysis

The data obtained were statistically evaluated using GraphPad Prism[®] software (version 9.4.1; San Diego, CA, USA) and analysed by analysis of variance (ANOVA) ($p < 0.05$) and Tukey's test, with a confidence limit of 95%.

Ethical approval

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and samples were collected and analysed under protocols approved by the Human Research Ethics Committee (CEP) of the Federal University of Amazonas (UFAM) - CAAE/UFAM: 81512524.3.0000.5020. Informed consent was obtained from all participants involved in the study.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of nine males and one female (Gr1) with confirmed diagnosis of ATL, aged between 18 and 50 years (mean: 26.8 years), were included in the study. The participants worked in various professions: farmers (majority, 40%), poultry workers, and heavy machinery operation students (Fig. 2).

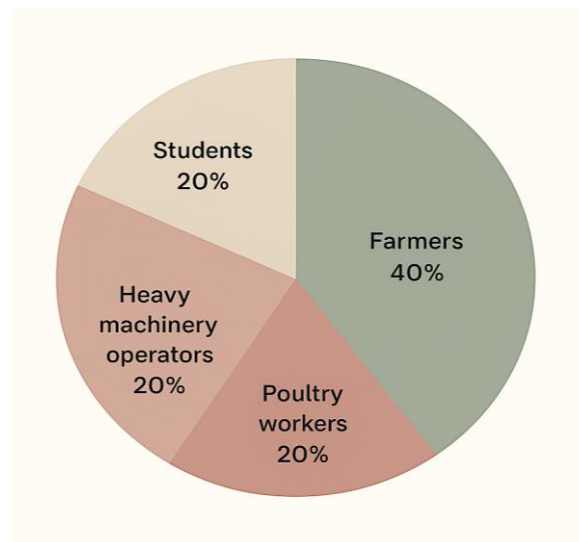


Figure 2 - Diagram of work activities of patients infected with *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the municipality of Rio Preto da Eva, AM, BR.

This demographic profile is in accordance with the epidemiological pattern described for ACL in Brazil, characterized by male predominance (male 9/10, female 1/10), young adult age group (20–50 years) and greater occupational exposure in rural or peri-urban environments [25,27], which confirms the representativeness of the sample in question (Table).

Regarding education, the majority of patients did not complete elementary school, equivalent to 90%, which represents one of the obstacles that can influence this, from adherence to preventive measures, directly impacting the early search for health care, for early diagnosis, as well as adherence to the recommended treatment. These data are in line with other studies that associate low education levels with greater vulnerability to ACL, reflecting the pattern found in rural Amazonian populations [28, 29].

Regarding clinical variables, diverse morphologies were observed, including impetigoid, plaque, frank ulcer, ecthematoid, and papular forms. The time of infection, ranging from 7 to



UFAM

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



60 days, indicated that many lesions were in the early stages, a condition that may explain the presence of less ulcerated papular and nodular forms [30, 31]. The predominance of injuries in the lower and upper limbs suggests a typical skin exposure in these regions, which corroborates the findings of [32, 33] while the occurrence of injuries in the back may be associated with environmental factors and the type of clothing used during rural activities [34]. From an epidemiological and environmental point of view, it was found that the majority of patients reside on roads along the AM-010 highway, between km 08 and km 135, demonstrating the relationship between proximity to forested or recently deforested areas and the risk of transmission [32]. It was observed that km 91 presented the highest frequency of cases, highlighting a possible point of greatest exposure to the vector. This pattern reinforces that environmental exposure, combined with the sociodemographic profile and education level, directly influences the occurrence of ATL [34].

Table. Clinical-epidemiological data of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Amazonas, Brazil*.

Sample code designations ²	Age (years) sex	Level of education	Location of transmission	Infection time (days)	Cutaneous lesions			
					Numb er	Size (cms)	Characteristi cs	Location
MHOM/BR/24/IM625 0	22/M	IE	Km 91 AM010	14	2	1.5 x 2.0	Plaque	ULL
MHOM/BR/24/IM625 4	37/M	PE	Km 127 AM010	45	2	1.0 x 2.5	Impetigoid	LLR
MHOM/BR/24/IM625 5	18/M	IE	Km 105 AM010	30	6	2.2 x 2.4	frank ulcer	LLL
MHOM/BR/24/IM625 8	28/M	IE	Km 08 AM010	45	2	4.1 x 2.7	Ecthymatoid	LLR
MHOM/BR/24/IM626 0	27/M	IE	Km 135 AM010	60	1 + satellite s	1.2 x 0.7	Plaque	Back
MHOM/BR/24/IM626 1	50/F	PE	Km 45 AM010	45	2+ satellite s	2.0 x 4.0	Impetigoid	LLL
MHOM/BR/25/IM626 2	19/M	IE	municipal headquarte rs	25	2	2.8 x 1.5	frank ulcer	ULL
MHOM/BR/25/IM626 3	37/M	IE	Km 57 AM 010	20	4	2.5 x 1.5	Ecthymatoid	Back
MHOM/BR/25/IM626 4	32/M	IE	Km 91 AM010	07	1	1.0 x 1.1	Papular	ULL
MHOM/BR/25/IM626 6	24/M	ES	Km 129 AM 010	60	3	2.6 x 2.2	Impetigoid	ULR

*Coming from the Names of Basic Health Unit – BHU, Dona Maria de Lourdes de Azevedo dos Santos, BHU Hamilton Cidade, BHU Ednaide Lopes, BHU Nossa Senhora Aparecida, BHU Manoel Rumao, municipality of Rio Preto da Eva/AM; ¹: identification established by qPCR; M=male; F=Female; IE = incomplete elementary school; PE= primary education; ES=elementary school; LLR=Lower limbs right side; LLL=Lower limbs left side; ULR=upper limbs right side; ULL=upper limbs left side. ²Samples: Host [M= Mammalia: HOM= Homo sapiens /country of origin/year of isolation/INPA's original code;

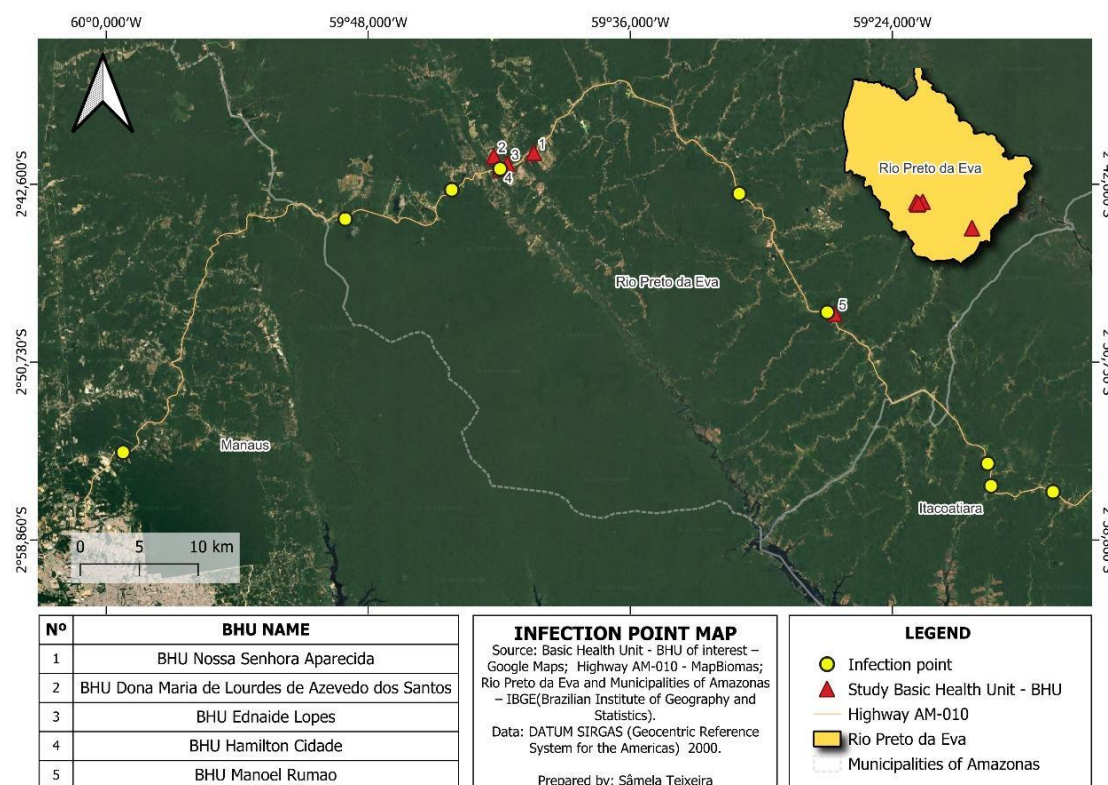


Figure 3 - Location map of the Basic Health Unit (BHU) of interest and the infection point distribution in the municipality of Rio Preto da Eva, Amazonas State, Brazil.

From an epidemiological and environmental point of view, it was found that the majority of patients reside on roads along the AM-010 highway, between km 08 and km 135, demonstrating the relationship between proximity to forested or recently deforested areas and the risk of transmission [32]. It was observed that km 91 presented the highest frequency of cases, highlighting a possible point of greatest exposure to the vector. This pattern reinforces that environmental exposure, combined with the sociodemographic profile and education level, directly influences the occurrence of ATL [34].

In view of this, molecular characterization of the samples revealed that 100% (10/10) of the isolates belonged to the species *L. (V.) guyanensis*. This finding confirms the predominance of this species as the etiological agent of ATL in the Amazon region [26, 34,35], and is associated with the wide distribution of vectors of the genus *Lutzomyia* and the adaptation of the parasite to local wild reservoirs, which ensures its maintenance in the zoonotic cycle [35,37]. In agreement, Silva *et al.* (2023) highlighted the predominance of this species in the metropolitan region of Manaus, particularly in the municipality of Rio Preto da Eva, AM which through their study identified that 88% of the isolates from patients demonstrated infection by

L. (V.) guyanensis [38], corroborating the data investigated by Figueira *et al.* (2014), who analyzed the clinical and epidemiological aspects of 90 patients with ATL in the aforementioned municipality between 2005 and 2012, of which 80 of the 90 isolated strains were characterized by *L. (V.) guyanensis* [39].

Family farmers living in the branches (Fig. 3) of the municipality of Rio Preto da Eva, AM, are characterized as rural Amazonian populations with strong ties to subsistence agriculture and small animal husbandry. However, unlike groups recognized as Traditional Peoples and Communities by Decree No. 6,040/2007, these communities do not, in general, have a specific cultural identity that formally places them in one of the 28 TPC (Traditional Peoples and Communities in Brazil) categories. Therefore, it is classified within the scope of family farming, defined by Law No. 11,326/2006, and not as a Traditional People or Community.

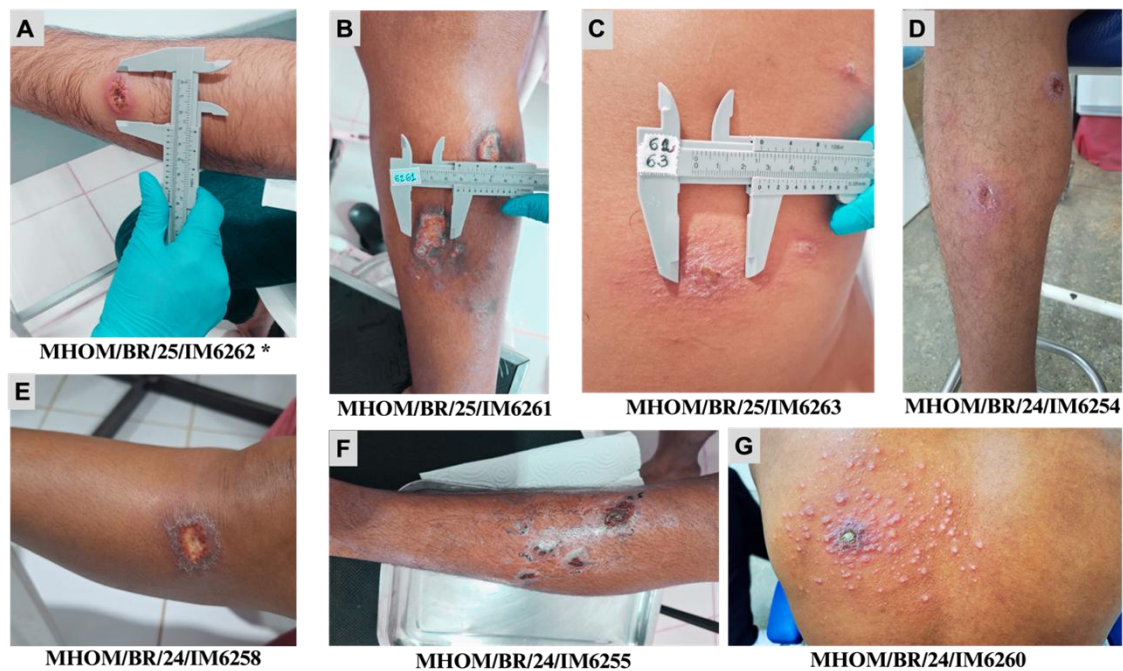


Fig.

Figure 4 - Diversity of skin lesions in patients infected with *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the municipality of Rio Preto da Eva - AM, BR. (A) Localized cutaneous form, single ulcerated lesion; ulcer with frame-like edges; (B) double lesion with impetigoid appearance; (C): multiple lesions, ecthematoid; (D) double lesion, impetigoid; (E) ecthematoid with deep ulceration and thick crusts; (F) multiple lesions, evolving into a frank ulcer, with crusts in the center; (G) Plaque lesions formed by several erythematous and infiltrated papules.

Skin lesions caused by *L. (V.) guyanensis* infection are usually single or multiple ulcers, with raised edges and a central ulcerated area with a granular base, infiltrated,

erythematous-violaceous color, and painless. They begin as a papule, rapidly increasing in size and forming an ulcer (Fig. 4). However, lesions can have different appearances and types, and their progression is influenced by the patient's immune status. Because the lesions are mostly painless and patients take various medications, the disease progresses, and patients often delay seeking diagnosis and appropriate treatment.

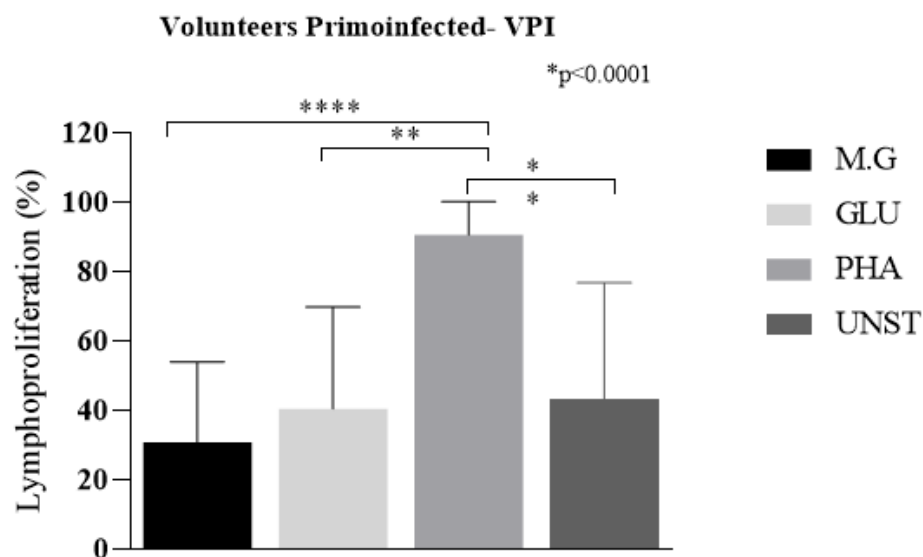
Espir *et al.* (2014) also demonstrated a predominance of patients infected by *L. (V.) guyanensis*, in the municipality of Rio Preto da Eva, AM, where of the 33 volunteers investigated, 19 were affected by this species. They also observed an immunological profile characterized by elevated levels of the cytokines IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-17, when compared to other species, suggesting the simultaneous involvement of Th1, Th2 and Th17 immune responses. This complex immune response influences both parasite control and disease pathogenesis, contributing to the clinical diversity observed in patients [40]. Considering the clinical manifestations, patients presented from one to six skin lesions. The highest proportion was observed in the group with two lesions, corresponding to 50% (5/10) of the sample. Patients with a single lesion represented 20% (2/10) of the cases, while 10% (1/10) had four lesions and 10% (1/10) had six lesions. One patient (10%) had a main skin lesion associated with multiple satellite lesions distributed around the primary lesion. The time for their presentation and evolution was 14 to 60 days. These findings differ from those observed by Espir *et al.* (2014) regarding the period of evolution, such as: from 07 to 180 days [32], also by the species *L. (V.) guyanensis*.

Lymphoproliferative response of PBMCs: Regarding the lymphoproliferative response of T lymphocytes, used to assess the responsiveness of the immune system, patients primarily infected with *Leishmania* spp. showed an average cell proliferation of 30% when stimulated with MG and 34% in the presence of Glucantime[®]. The positive control with the mitogen for T

cells – phytohemagglutinin (PHA), showed a 92% response, confirming the viability and functionality of the cells and ruling out intrinsic cellular dysfunction (Fig 5).

Figure 5 - Lymphoproliferative activity of primary infected patients, in response to stimulation with Methyl Gallate (M.G), Glucantime® (GLU) and unstimulated cells (UNST).

In the control group -Gr2 (Fig 6), MG induced an average proliferation of 51%, Glucantime®



63%, and PHA 87%, with statistically significant differences between stimulation and groups ($p < 0.0001$ for patients and $p = 0.0102$ for controls).

Volunteers without a history of *Leishmania* infection-VWLI

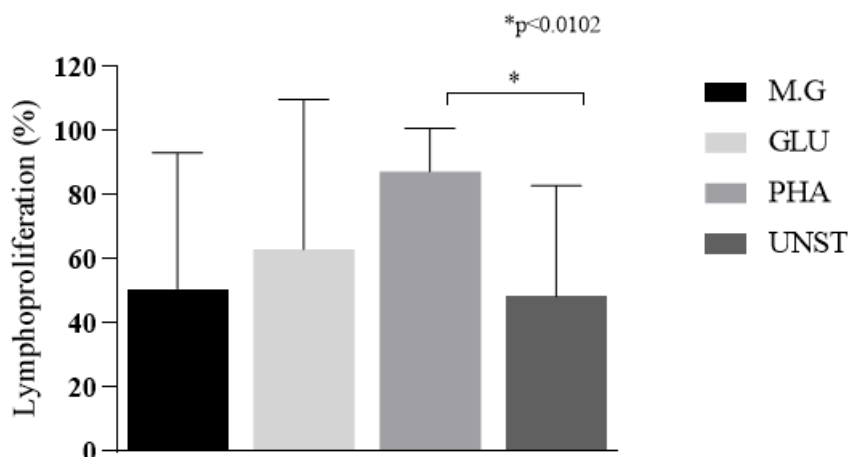


Figure 6 - Lymphoproliferative activity of T lymphocytes from volunteers without a history of *Leishmania*-VSH infection, in response to stimulation by Methyl Gallate- M.G, Glucantime®- GLU and Unstimulated cells- UNST.

The data obtained show that MG was able to induce a lymphoproliferative response in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from both patients primarily infected with ATL and control individuals, although with different magnitudes.

In patients, the average proliferation observed was 30% with MG, a value slightly lower than that obtained with Glucantime® (34%), while in controls, MG promoted 51% proliferation, surpassed by Glucantime® (63%).

**Volunteers Without a History of *Leishmania* Infection-VWLI
Volunteers Primoinfected- VPI**

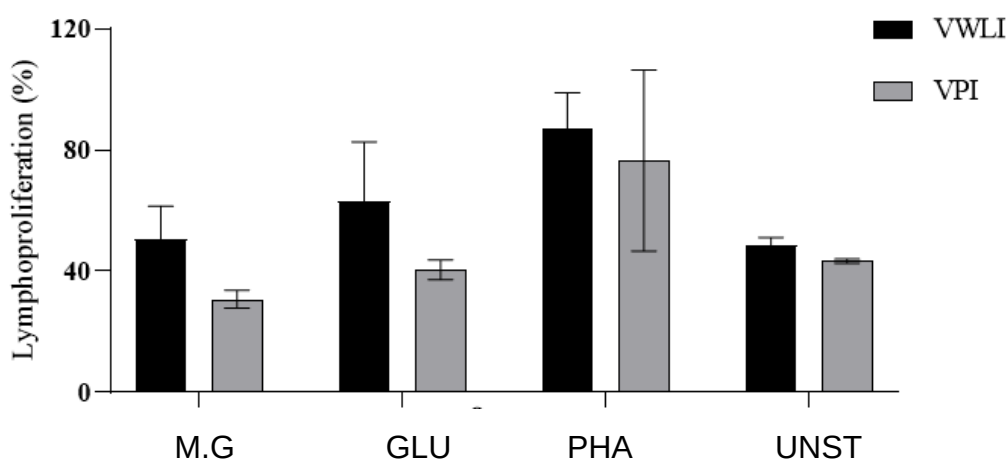


Figure 7 - Comparison of lymphoproliferative activity of T lymphocytes from volunteers without a history of *Leishmania*-VWLI infection in contrast to primary infected patients in response to stimulation by Methyl Gallate- M.G, Glucantime®- GLU and Unstimulated cells-UNST.

Figure 7 compares the intensity of the lymphoproliferative immune response in both experimental groups after exposure of human T lymphocytes to the phenolic and organic compound methyl gallate and Glucantime®. The latter contains pentavalent antimony semimetal (SB5+), which is part of the meglumine antimoniate salt, as its active ingredient. A more intense lymphoproliferative response is observed in healthy volunteers (Gr2) when exposed to both substances. Regarding Gr1, with cells from patients infected with *Leishmania*, cellular lymphoproliferation stimulated by both substances was also observed, also verifying the immunomodulatory effect of the drugs tested. The lymphoproliferative response in both groups can be induced and stimulated by MG and Glucantime®.

Previous studies demonstrate that MG has relevant immunomodulatory properties, capable of interfering in the activation and proliferation of T lymphocytes. Lee *et al.* (2010) showed that MG exerts potent antitumor activity by inhibiting the infiltration of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, modulating the inflammatory microenvironment and favoring effector responses.

This mechanism may explain the ability of MG to promote lymphocyte proliferation in the present study, since the reduction of the suppressive influence of Tregs may potentiate the expansion of responsive T cells [41].

Rahman *et al.* (2021) and Liang *et al.* (2023) reinforce that the phenolic compounds, such as MG, have a wide range of pharmacological effects, including antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory activities, which can vary according to the host's immune status. This may explain the difference in proliferative magnitude between patients and controls in the context of leishmaniasis [41] [42]. On the other hand, Anderson & Teuber (2010) observed that polyphenols, such as ellagic acid, can inhibit PBMC proliferation and modulate cytokine secretion, demonstrating that the effect of these molecules can be stimulatory or inhibitory, depending on the concentration, exposure time and immunological context [44]. Correa *et al.* (2016), complement this understanding by demonstrating that MG reduces neutrophil recruitment, inflammatory mediator production, and macrophage activation in an experimental arthritis model [45, 46].

The proliferative response induced by Glucantime® is associated with its direct antiparasitic action and reduced antigenic load [48], which influences the cellular response.

However, limitations to the use of Glucantime® include increasing parasite resistance, with mechanisms such as overexpression of transport genes and alteration of efflux pumps, in addition to toxicity and invasive routes of administration, which hinder its application [50,51].

Despite the relevant findings, the absence of data such as cytokine dosage: IFN- γ , IL-2, IL-6 IL-4, IL-10 and IL-13, is necessary to correlate proliferation with functional activation of T cells, and identification of the paradox of Th1/Th2 profiles. Furthermore, analysis of patients at different clinical stages may provide additional insights into the dynamics of the immune response during infection and treatment.

5. CONCLUSIONS

It was found that MG is capable of inducing a significant lymphoproliferative response in PBMCs from healthy individuals and patients primarily infected with *L. (V.) guyanensis*, although with less intensity in the latter group. This study contributes to a more diligent look at the importance of the MG immunomodulatory effect. Although the analysis of cell proliferation provides initial evidence considered relevant for better elucidation of the regulation of inflammation induced by MG, future investigations must complement these findings with more robust functional approaches, such as flow cytometry for phenotypic characterization of the cell subpopulations involved, as well as the measurement of inflammatory and regulatory cytokines, such as IFN- γ , IL-10, IL-4, and TNF- α , to better understand these immune mechanisms.

Therefore, these findings suggest that MG has relevant potential for therapeutic use (45), with a significant proliferative effect on cells from uninfected individuals, and with moderate but significant action in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V.) guyanensis*.

The lymphoproliferative response induced by MG favors the understanding of how this organic substance can affect the immune response, leading to the development of new, more effective and targeted therapeutic strategies, including its inclusion as an immunomodulatory therapy. Assessing this response can provide valuable information about the effectiveness of the treatment, the patient's adaptive immune response, and aid in the development of new therapeutic strategies for the disease in question. The dose-dependent profile and host immunological context should be considered in future investigations to elucidate the mechanisms involved and explore its therapeutic potential.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Amazonas State Research Support Foundation FAPEAM (POSGRAD), Project PUBLIC CALL NO. 003/2022 - YOUNG DOCTORS (Process No. 01.02.016301.01061/2023-22), and for the support of Municipal Health Secretariat, Rio Preto da Eva, AM, BR.

REFERENCES

- 1- Santos, M. F. D., Lorenz, C., Chiaravalotti-Neto, F., & Lima-Camara, T. N. (2024). Análise espacial da leishmaniose tegumentar americana no estado do Amazonas. *Revista de saúde pública*, 58, 11. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2024058005662>.
- 2-BRASIL. Ministério da Saúde. Painel de Monitoramento das Leishmanioses. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: [https://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/5fc3a7ec-22b9-4402-9a52-a5001ca659ad?embed=true&_g=\(\)&show-top-menu=false](https://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/5fc3a7ec-22b9-4402-9a52-a5001ca659ad?embed=true&_g=()&show-top-menu=false). Acesso em: 13 ago. 2025.
- 3- FUNDAÇÃO HOSPITALAR ALFREDO DA MATTA. Boletim Epidemiológico 2023. Manaus: FUHAM, 2023. Disponível em: https://www.fuham.am.gov.br/wp-content/uploads/2024/08/Boletim-Epidemiologico_FUHAM-2023.pdf
- 4- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2004May;99(3):239–51 [acesso 2023 Jul 2]. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>.
- 5- FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO – FUHAM. Protocolo interno para detecção e identificação de espécies de *Leishmania* por PCR em tempo real. Manaus, 2024. Disponível em: <https://medtrop2024.com.br/evento/medtrop2024/trabalhosaprovados/naintegra/1893>.
- 6- MATTOS, Alexandra Brugnera Nunes de; TUMELERO, Júlia Lippert. Perfil epidemiológico da Leishmaniose tegumentar no Brasil de 2015-2020. *Research, Society and Development*, [S.l.], v. 12, n. 3, e17212340385, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i3.40385>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/40385>. Acesso em: 7 maio 2025.

- 7- Peixoto, C. de O. (2020). Saúde, ciência e desenvolvimento: a emergência da leishmaniose tegumentar americana como desafio médico-sanitário no Amazonas. *História, Ciências, Saúde-manguinhos*, 27(3), 741–761. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702020000400003>
- 8- Guimarães Ananias Facundes, Barbosa Victor Linec Maciel, Silva Mariana Paula da, Portugal Jéssica Karoline Alves, Reis Marcelo Henrique da Silva, Gama Abel Santiago Muri. Acesso a serviços de saúde por ribeirinhos de um município no interior do estado do Amazonas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* [Internet]. 2020 [citado 2025 Maio 07] ; 11: e202000178. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232020000100012&lng=pt. Epub 21-maio-2020. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232020000178>.
- 9- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi). Relatório anual 2023: Equity at the heart of medical innovation. [Genebra]: DNDi, 2023. Disponível em: <https://dndi.org/publications/2024/dndi-2023-annual-report/>. Acesso em: 13 ago. 2025.
- 10- Barcelos Viana MT, Marinho dos Santos V. Desafios Da Terapêutica Da Leishmaniose: Limitações Atuais E Perspectivas Futuras. *Braz. J. Implantol. Health Sci.* [Internet]. 21º de setembro de 2024 [citado 3º de dezembro de 2024];6(9):3501-18. Disponível em: <https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/3618>
- 11- Duque MCO et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumine antimoniate at a primary care unit in Brazil. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, v. 6, n. 2, 240-248, 2017.
- 12- Brito AQ, Silva RS, Medeiros MD et al. "Evaluation of Cytotoxicity and Antileishmanial Activity of Plant-Derived Compounds Against Leishmania Species." *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 247, 2020, pp. 112-119. doi:10.1016/j.jep.2020.112119.
- 13- Mota BAS, Resque RLV, Fani DM. Estudo In Silico Das Atividades Biológicas Dos Metabólitos Isolados De *Libidibia ferrea* Martius. *Arigó - Revista do Grupo PET e Acadêmicos de Geografia da Ufac*, [S. l.], v. 3, n. 2, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/arigoufac/article/view/5567>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- 14- Bk AS - 2021 - repositorio.uespi.br. Utilização do Jucá (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz) Em Barro Duro, Área Rural de Tutóia, Maranhão. uespi.br
- 15-Silva AC - 2024 - tede.ufam.edu.br. A Etnofarmacologia na Amazônia: um estudo de caso nas comunidades São Francisco e São José sobre o uso de plantas medicinais no município de Careiro da Várzea. ufam.edu.br



UFAM

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



- 16- Almeida Júnior JS - 2023 - Universidade Federal do Oeste do Estudos pré-clínicos de segurança e eficácia da oleoresina de copaíba e dos extratos da andiroba e jucá para o desenvolvimento de um fitoterápico.
- 17- Miki SA - 2021 - tede.ufam.edu.br. Desenvolvimento de formulações semissólidas contendo extrato seco padronizado de *Libidibia ferrea*. ufam.edu.br
- 18- Correa, L. B., Pádua, T. A., Seito, L. N., Costa, T. E., Silva, M. A., Candéa, A. L., Rosas, E. C., & Henriques, M. G. (2016). Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. *Journal of natural products*, 79(6), 1554–1566. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01115>
- 19- Bacha TJ, Jensen BB, Rodrigues DC, Silva M, Araújo A, Geraldi KS et al. Microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: an in vivo assay. *Acta Amaz* [Internet]. 2023Jul;53(3):246–53. Available from: <https://doi.org/10.1590/1809-4392202300681>
- 20- Noleto Dias, C., Nunes, T. A. L., Sousa, J. M. S., Costa, L. H., Rodrigues, R. R. L., Araújo, A. J., Marinho Filho, J. D. B., da Silva, M. V., Oliveira, M. R., Carvalho, F. A. A., & Rodrigues, K. A. D. F. (2020). Galato de metila: A atividade antileishmania seletiva se correlaciona com os efeitos direcionados da célula hospedeira. *Interações químico-biológicas*, 320, 109026. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109026>
- 21- QIAGEN/QuantiTect Probe PCR Handbook. 2022. Disponível em: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=2e58e8ef-94e7-41c2-b134-0d812c5b0e4f>.
- 22- FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO – FUHAM. Protocolo interno para detecção e identificação de espécies de *Leishmania* por PCR em tempo real. Manaus, 2024. Disponível em: <https://medtrop2024.com.br/evento/medtrop2024/trabalhosaprovados/naintegra/1893>. Acesso em: 8 ago. 2025.
- 23- SILVA EO. et al. Evaluation of the lymphoproliferation of mononuclear cells in cutaneous leishmaniasis patients treated with *Libidibia ferrea*. *Acta Brasiliensis*. 5(3): 97-102, 2021.
- 24- Jensen BB. Avaliação da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea. 2020. 148 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7969>.

- 25- Santos GRAC, Santos JJ, Silva BAT, Santos AS, Nogueira RS, Nascimento VAS. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil. *Enferm Foco*. 2021;12(5):1047–53.
- 26- Nascimento V dos S, Noletto IH, Franco TF, Veiga RB, de Araújo YB. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Estado de Mato Grosso de 2018 a 2022. *REAS* [Internet]. 31out.2024 [citado 7maio2025];24(10):e18641. Available from: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/18641>
- 27- Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, Barbosa MGV, Paes MG. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 2006; 22(11) doi: 10.1590/S0102-311X2006001100006
- 28- LOPES, L. L.; COSTA, D. M.; OLIVEIRA, P. L. R.; OLIVEIRA, T. S.; DIAS, B. P.; SANTOS, I. A.; VIEIRA, J. A. I.; NETO, P. O.; SANTOS, D. F.; MARAMALDE, A. C. R.; RODRIGUES, L. O.; MORAES, E. P.; SILVA, E. L. Caracterização epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana no estado do Amapá entre os anos de 2018 a 2022. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, supl. 1, p. 103128, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103128>. Acesso em: 20 ago. 2025.
- 29- ALENCAR, D. G. da S.; COSTA, F. S. da. Resiliência pedagógica: escolas ribeirinhas frente às variações de seca e cheia do Rio Amazonas. *Educação e Pesquisa*, v. 47, e230347, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1678-4634202147230347>. Acesso em: 20 ago. 2025.
- 30- Gontijo B., Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003
- 31- CASTRO, A. T. Polimorfismo das lesões causadas por Leishmaniose Tegumentar Americana no Amazonas: Atlas clínico diagnóstico. 104 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Dermatologia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.
- 32- Nogueira LSC, Sampaio RNR. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *An Bras Dermatol* 76: 51-62, 2001.
- 33- ALBERIO, S. H. V. de O.; CUNHA, L. M. da; LIMA, A. V. M.; PANTOJA, M. de S.; CUNHA, V. M. da; LIMA, C. Â. M. Impact of environmental factors on the incidence of American Tegumentary Leishmaniasis in the state of Pará. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 23, n. 7, p. 1-10, jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.25248/REAS.e13624.2023>

- 34- CRUZ, B. R. da; LIMA, A. D. A. de; BARRETO, F. B.; CARVALHO, E. R. de. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): formas de contaminação e coinfeção. *Brazilian Journal of Development*, v. 9, n. 7, 2023. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv9n7-038>
- 35 LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis: Ecology and Epidemiology. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, 2005, p. 1–120.
- 36 Júnior, R.D., Pinheiro, F.G., Naiff, M.D., Souza, I.D., Castro, L.M., Menezes, M.P., & Franco, A.M. (2009). ESTUDO DE UMA SÉRIE DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE RIO PRETO DA EVA, AMAZONAS, BRASIL. *Revista de Patologia Tropical*, 38, 103-114.
- 37- PINHEIRO F.G; NERY, L.R; FIGUEIRA, L.P; REIS, S.R; GOMES, L.H.M; FREITAS, L.A; FRANCO, A.M.R. Um mundo desconhecido dos insetos de asas entreabertas: os flebotomíneos (Diptera:Psychodidae). In: *Desvendando as fronteiras do conhecimento na região amazônica do Alto Rio Negro*. Editores: Luiz Augusto Gomes de Souza e Eloy Guillermo Castellón, 1ª edição: INPA, Manaus, Amazonas, p. 323 -336., 2012
- 38- SILVA, Alana Cristina Vinhote da; PINHEIRO, Francimeire Gomes; FIGUEIRA, Luanda; JENSEN, Bruno Bezerra; BORGES, Paula Figliuolo da Cruz; SILVA, Erika Oliveira da; FRANCO, Antonia Maria Ramos. Caracterização bioquímica de isolados humanos de *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. In: FRANCO, Antonia Maria Ramos et al. (org.). *Formação do conhecimento científico em leishmaniose tegumentar no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – a iniciação acadêmica em estudos parasitológicos, bioquímicos e moleculares*. Belo Horizonte: Poisson, 2023. v. 1.
- 39- FIGUEIRA, Luanda de Paula. Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional. 2013. 180 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/4362/2/Tese%20-%20Luanda%20de%20Paula%20Figueira.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2025
- 40- ESPIR, T. T.; FIGUEIRA, L. P.; NAIFF, M. F.; et al. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines related to clinical forms of *Leishmania guyanensis* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010810.
- 41 LEE, H. et al. Methyl gallate exhibits potent antitumor activity by inhibiting CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell infiltration in tumors. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 185, n. 11, p. 6698–6705, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001373>.

- 42- RAHMAN, Md. Mostafizur et al. Role of phenolic compounds in human diseases: current knowledge and future prospects. *Molecules*, v. 27, n. 1, p. 233, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>.
- 43- LIANG, Huaguo et al. Methyl gallate: Review of pharmacological activity. *Pharmacological Research*, v. 194, p. 106849, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106849>.
- 44- ANDERSON, Koren C.; TEUBER, Suzanne S. O ácido elágico e os polifenólicos presentes nos grãos de nozes inibem in vitro a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano e alteram a produção de citocinas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, [S. l.], v. 1190, p. 86–93, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05259.x>. Acesso em: 21 jul. 2025.
- 45- CORREA, Carolina R. et al. Anti-inflammatory effect of methyl gallate on experimental arthritis: inhibition of neutrophil recruitment, production of inflammatory mediators, and activation of macrophage. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 6, p. 1554–1566, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01115>.
- 46- Alves, M.M.d.M., Brito, L.M., Souza, A.C. et al. Ácidos gálico e elágico: dois compostos imunomoduladores naturais resolvem a infecção de macrófagos por *Leishmania major*. *Arco Farmacol 390 de Naunyn-Schmiedeberg*, 893–903 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1387-y>
- 47- Oliveira LF, et al. Combinando compostos naturais e antimoniais no tratamento da leishmaniose: perspectivas e limitações. *Drug Des Devel Ther.* 2020; 14:3549–63.
- 48- Rath, S.; Luciano Augusto Trivelin, L.A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D.M.; Jesús, M. N.; Marzal, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Quim. Nova, Vol. 26, No. 4, 550-555, 2003.
- 49- Brelaz-de-Castro MC, de Almeida AF, de Oliveira AP, de Assis-Souza M, da Rocha LF, Pereira VR 2012. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol* 279: 180-186.
- 50- Pourmohammadi, B., Motazedian, M. H., Handjani, F., Hatam, G. H., Habibi, S., & Sarkari, B. (2011). Glucantime efficacy in the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 42(3), 502–508.
- 51- Karamian, M., Faroghi Bojd, M.S., Salehabadi, A., Hemmati, M. & Barati, D.A. (2015). Eficácia do antimoniato de meglumina contra *L. tropica* em um foco recentemente emergido de leishmaniose cutânea em Birjand, leste da República Islâmica do Irã. *EMHJ-Jornal de Saúde*



UFAM

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



do Mediterrâneo Oriental, 21 (4), 280 - 286. Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Mediterrâneo Oriental. <https://iris.who.int/handle/10665/255104>.

ANEXO A – PARECER DO CEP-UFAM

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

Telefone: (92)3305-1181

Município: MANAUS

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: *;* Indivíduos com casos confirmados de Leishmaniose Cutânea (LC); *;* Indivíduos sem tratamento anterior para a infecção por *Leishmania* spp.; *;* 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. *;* Visualização de amastigotas de *Leishmania* sp. no exame direto, e/ou; *;* Visualização de promastigotas de *Leishmania* sp. na cultura.

Critérios de inclusão dos indivíduos do Grupo 2 *;* 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) *;* Gestantes. *;* Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores; *;* Comorbidades como Diabetes; *;* 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

Continuação do Parecer: 7.069.426

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

Telefone: (92)3305-1181

Município: MANAUS

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

Continuação do Parecer: 7.069.426

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 Folhaderostocep.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.pdf20/06/2024 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

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 declaracaoopesquisadores.pdf17/05/2024 17:04:08 e
Declaracaoopesquisadorprincipalassinado.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

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

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	declaracaocoordenadoraprojetofinanceiro.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	anunciasesmdariopreto.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	retornodosbeneficiosaosparticipantes.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	declaracaooufamabhistologia.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:
Elia 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 B– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE):
GRUPO 1**

Nós, os pesquisadores José Fernando Marques Barcellos, Antonia Maria Ramos Franco, Rafaela Benício Santana, Mayara Arguello da Silva e Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, estamos aqui para lhe contar sobre um projeto de pesquisa que estamos realizando. Ele se chama “**Avaliação dos Efeitos Imunomodulatórios de compostos sintéticos frente a Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) de Pacientes com Leishmaniose Cutânea**”. Gostaríamos muito de convidá-lo(a) para fazer parte desse projeto. Se você precisar de mais tempo para pensar sobre sua participação ou quiser conversar com seus familiares ou outras pessoas antes de decidir, fique à vontade. E caso decida não participar ou mudar de ideia durante a pesquisa, isso não afetará o tratamento que você recebe nas Unidades Básicas de Saúde Ednaide Lopes da Costa, Maria de Lourdes da Costa Azevedo e Manoel Rumão, em Rio Preto da Eva. É importante que sua decisão seja livre e bem pensada. Agora, vamos explicar mais sobre a pesquisa.

Estamos fazendo um estudo sobre uma doença chamada Leishmaniose Tegumentar Americana, conhecida por muitos como “ferida brava”. Aqui na nossa região, essa doença pode afetar pessoas que vivem perto da floresta, rios e estradas. E essas pessoas têm mais dificuldades para receber cuidados médicos e o tratamento da doença, principalmente por causa da distância até o local de atendimento ou até mesmo pela falta de remédios. E por isso estamos aqui, para entender mais sobre a Leishmaniose. Saber suas formas e como atinge as pessoas de diferentes maneiras. Além de identificar quais espécies de parasitos causadores da doença circulam na nossa região, principalmente em Rio Preto da Eva – AM.

Também estamos tentando encontrar um tratamento de origem natural, mais barato, menos doloroso e que possa ajudar sem causar muito efeito colateral. Vamos ver como as células do sangue de pessoas que têm a doença, que já tiveram e quem nunca teve a doença reagem quando tratadas com certo composto (Metil 3, 4, 5 Trihidroxibenzoato) em laboratório. O objetivo do nosso estudo é responder essas perguntas e tentar ajudar as pessoas atingidas pela Leishmaniose.

Inicialmente, iremos fazer um exame chamado “escarificação” na sua lesão. Neste exame, usaremos um bisturi esterilizado para fazer um pequeno arranhão na borda da sua ferida. Não se preocupe, o procedimento é rápido e seguro. Depois, o material coletado será

examinado no microscópio para procurar por um parasito chamado *Leishmania*, que causa a doença. Se o parasito estiver presente, isso confirmará o diagnóstico de leishmaniose.

Se confirmado o seu diagnóstico e você concordar em participar do nosso estudo, fará parte do grupo nomeado como **“Primoinfectados”**. Este grupo é composto por pessoas maiores de 18 anos, que estão recebendo o diagnóstico de Leishmaniose pela primeira vez e que não receberam o tratamento antes. Ou seja, irão iniciar agora o tratamento para a doença.

Em seguida, iremos preencher nossa ficha de investigação. Através dela vamos coletar algumas informações sobre você e sobre sua lesão (perguntas que envolvam, principalmente, questões de saúde). Saiba que caso não se sinta confortável com alguma das perguntas, o(a) senhor(a) tem total direito de recusar responder. Feito isso, iremos realizar uma coleta do seu sangue.

Iremos solicitar que você se sente confortavelmente em uma cadeira para a coleta de sangue. Vamos escolher uma veia em seu braço para realizar a coleta. Antes de começarmos, iremos limpar a área com um algodão e uma solução antisséptica para garantir que esteja limpa. Em seguida, iremos usar uma seringa estéril para retirar 10 mL de sangue de sua veia. O sangue será colocado em tubos de coleta especiais chamados “vacutainers”, que são usados para armazenar o sangue de forma segura.

Toda pesquisa com seres humanos envolve riscos aos participantes. Durante a coleta de sangue, você pode sentir uma pequena dor ou desconforto no momento da picada da agulha. Isso é normal e geralmente dura apenas alguns segundos. Além disso, é possível que você sinta uma leve pressão na área onde o sangue está sendo coletado. Após o procedimento, você pode 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. Para reduzir esses riscos, faremos tudo em um lugar confortável e verificaremos se você está bem antes de começar.

Se durante a realização de qualquer um dos procedimentos, o senhor(a) sentir-se mal, apresentar tontura ou queixar-se de qualquer dor, a coleta de amostras será interrompida e o atendimento necessário pela equipe de pesquisadores será oferecido (aferição de pressão, respiração, oximetria de pulso, temperatura), e caso necessário, iremos lhe encaminhar para atendimento médico.

Você tem o direito claro e certo de receber ajuda grátis e completa se algo der errado por causa da pesquisa. Se acontecerem problemas por participar, você terá cuidados médicos sem precisar pagar. Estaremos aqui para garantir que você receba todo o suporte necessário

para se recuperar totalmente, pelo tempo que for preciso. Sua segurança e bem-estar são muito importantes para nós.

A vantagem de sua participação é apenas de caráter científico, ao auxiliar este estudo que poderá proporcionar um tratamento menos agressivo para Leishmaniose e através do seu sangue poderemos conhecer quais células estão envolvidas no processo de cura da infecção. O sangue coletado será transportado em caixa adequada para o laboratório (Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/INPA) e será utilizado, exclusivamente, para ensaios onde iremos avaliar a atividade dos compostos estudados frente às suas células do sangue. O restante do sangue que não for utilizado durante o período atual, com sua autorização, será armazenado no Biobanco (no Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/INPA) por 5 anos, podendo ser utilizado em outros projetos de pesquisa. E caso se pretenda a utilização dessas amostras armazenadas o senhor como voluntário será consultado a respeito e será convidado para assinar novo TCLE.

Garantimos que seguiremos todas as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), como a RDC 50 e a RDC 302, que asseguram a segurança em cada etapa, desde a escarificação da lesão até o transporte adequado das amostras para nosso laboratório. Nosso compromisso é realizar cada passo com muita atenção para garantir a qualidade e a segurança do material coletado, assim como a sua segurança e a da equipe envolvida.

Ao aceitar participar, você estará contribuindo para o avanço do conhecimento científico sobre a doença, o que pode levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e acessíveis. Ao realizar os exames e fornecer informações sobre sua condição, você estará ajudando os pesquisadores a entender melhor como a Leishmaniose afeta diferentes pessoas e a identificar possíveis soluções para enfrentar o problema. Sua participação é fundamental para o sucesso deste estudo e para a busca por uma solução para uma doença que afeta tantas pessoas em nossa região.

Queremos que você se sinta bem e seguro ao participar da nossa pesquisa. Estamos aqui para aprender sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana sem causar nenhum problema para você. Antes, durante e depois da sua participação, vamos cuidar para que você se sinta confortável. Vamos explicar tudo claramente antes de fazer qualquer coisa, responder a todas as suas perguntas e garantir que você entenda o que vai acontecer. Sua saúde e conforto são muito importantes para nós, e vamos fazer o nosso melhor para garantir que sua participação seja segura e tranquila.

Sua participação é voluntária e ao concordar em participar o senhor não terá nenhuma

despesa, assim como também nenhuma remuneração. Havendo necessidade de seu comparecimento para nova coleta no INPA ou sede do laboratório de referência, o pesquisador se responsabilizará pelo seu transporte e sua alimentação (caso necessário), bem como de seu acompanhante (caso necessário).

Garantimos a você e seu acompanhante, quando necessário, o ressarcimento das despesas devido sua participação na pesquisa, ainda que não previstas inicialmente. Também estão assegurados o direito a pedir indenizações e a cobertura material para reparação a qualquer possível dano causado pela pesquisa ao participante da pesquisa.

Garantimos a você a manutenção do sigilo e da privacidade de sua participação e de seus dados durante todas as fases da pesquisa e posteriormente na divulgação científica. Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre. As informações obtidas através do instrumento de coleta de dados serão apagadas de nosso banco de dados após o período de 5 anos. O papel onde você concorda com a pesquisa terá duas folhas originais (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Todas as páginas serão rubricadas e assinadas por você ou seu representante legal, além do pesquisador responsável. As assinaturas ficarão juntas para facilitar. Assim, sua participação na pesquisa fica bem registrada.

Se você decidir mudar de ideia durante o estudo, pode retirar sua autorização a qualquer momento. Não será penalizado por isso e seu tratamento no serviço de saúde não será afetado. Sua liberdade de escolha é respeitada em todas as fases da pesquisa.

Se quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato com a pesquisadora responsável, Mayara Arguello da Silva, pelo número (92) 99318-0806 ou pelo email: mayarguello08@gmail.com.

O (A) Sr (a). também pode entrar em contato, caso tenha interesse, com o Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) e com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), O CEP/UFAM fica na Escola de Enfermagem de Manaus (EEM/UFAM) – Sala 07, Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus-AM. Fone: (92) 3305-1181, Ramal 2004, E-mail: cep@ufam.edu.br. O CEP/UFAM é um grupo formado por pessoas de diferentes áreas e conhecimentos, que trabalham juntas para proteger os participantes de uma pesquisa, garantindo que sejam tratados com respeito e que a pesquisa seja feita de forma correta, seguindo regras éticas.

Consentimento Depois de Receber Informações

Eu, _____, declaro que fui informado (a) sobre os objetivos, procedimentos e possíveis riscos envolvidos na pesquisa sobre Leishmaniose Tegumentar Americana. Entendi que minha participação é voluntária e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem penalização alguma. Declaro também que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas de forma satisfatória.

Consentimento para Armazenamento de Amostras de Sangue

Autorizo o armazenamento das amostras de sangue coletadas durante a pesquisa para estudos futuros relacionados à Leishmaniose Tegumentar Americana.

☐ Sim ☐ Não

_____, ____/____/____

--

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador Responsável.

ANEXO C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE): GRUPO 2

Nós, os pesquisadores, José Fernando Marques Barcellos, Antonia Maria Ramos Franco, Rafaela Benício Santana, Mayara Arguello da Silva e Rebecca Sayuri Barbosa Hanada, estamos aqui para lhe contar sobre um projeto de pesquisa que estamos realizando. Ele se chama “Avaliação dos Efeitos Imunomodulatórios de compostos sintéticos frente a Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) de Pacientes com Leishmaniose Cutânea”. Gostaríamos muito de convidá-lo (a) para fazer parte desse projeto. Se você precisar de mais tempo para pensar sobre sua participação ou quiser conversar com seus familiares ou outras pessoas antes de decidir, fique à vontade. É importante que sua decisão seja livre e bem pensada. Agora, vamos explicar mais sobre a pesquisa.

Estamos fazendo um estudo sobre uma doença chamada Leishmaniose Tegumentar Americana, conhecida por muitos como “ferida brava”. Aqui na nossa região, essa doença pode afetar pessoas que vivem perto da floresta, rios e estradas. E essas pessoas têm mais dificuldades para receber cuidados médicos e o tratamento da doença, principalmente por causa da distância até o local de atendimento ou até mesmo pela falta de remédios. E por isso estamos aqui, para entender mais sobre a Leishmaniose. Saber suas formas e como atinge as pessoas de diferentes maneiras. Além de identificar quais espécies de parasitos causadores da doença circulam na nossa região, principalmente em Rio Preto da Eva – AM. Também estamos tentando encontrar um tratamento de origem natural, mais barato, menos doloroso e que possa ajudar sem causar muito efeito colateral. Vamos ver como as células do sangue de pessoas que têm a doença, que já tiveram e quem nunca teve a doença reagem quando tratadas com certos compostos (Metil 3, 4, 5 Trihidroxibenzoato e 2-Hidroxi- 1,4 Naftoquinona) em laboratório. O objetivo do nosso estudo é responder essas perguntas e tentar ajudar as pessoas atingidas pela Leishmaniose.

Se você concordar em participar do nosso estudo, fará parte do grupo nomeado como “Controle Negativo”. Este grupo é composto por pessoas maiores de 18 anos, sem história clínica de infecção por Leishmaniose, ou seja, pessoas que nunca tiveram a doença. Em seguida, iremos preencher nossa ficha de investigação, através dela vamos coletar algumas informações sobre você (perguntas que envolvam, principalmente, questões de saúde). Saiba que caso não se sinta confortável com alguma das perguntas, o (a) senhor (a) tem total direito de recusar responder. Se concordar em se voluntariar, sua doação de sangue será coletada durante os exames laboratoriais já agendados na clínica, e os 10 mL de sangue será colocado em tubos de coleta especiais chamados “vacutainers”, que são usados para armazenar o sangue de forma

segura, não havendo necessidade de realizarem punção extra para coleta, além da qual o senhor (a) já será submetido para realizar seus exames. O objetivo é realizar os mesmos ensaios que serão feitos com o grupo de primoinfectados, ou seja, pessoas diagnosticadas com LC, para compararmos os resultados de como as substâncias avaliadas modulam a resposta imune dos participantes dos dois grupos.

Toda pesquisa com seres humanos envolve riscos aos participantes. Durante a coleta de sangue, você pode sentir uma pequena dor ou desconforto no momento da picada da agulha. Isso é normal e geralmente dura apenas alguns segundos. Além disso, é possível que você sinta uma leve pressão na área onde o sangue está sendo coletado. Após o procedimento, você pode 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. Para reduzir esses riscos, faremos tudo em um lugar confortável e verificaremos se você está bem antes de começar.

Se durante a realização de qualquer um dos procedimentos, o senhor (a) sentir-se mal, apresentar tontura ou queixar-se de qualquer dor, a coleta de amostras será interrompida e o atendimento necessário pela equipe de pesquisadores será oferecido (aferição de pressão, respiração, oximetria de pulso, temperatura), e caso necessário, iremos lhe encaminhar para atendimento médico.

Você tem o direito claro e certo de receber ajuda grátis e completa se algo der errado por causa da pesquisa. Se acontecerem problemas por participar, você terá cuidados médicos sem precisar pagar. Estaremos aqui para garantir que você receba todo o suporte necessário para se recuperar totalmente, pelo tempo que for preciso. Sua segurança e bem-estar são muito importantes para nós.

A vantagem de sua participação é apenas de caráter científico, ao auxiliar este estudo que poderá proporcionar um tratamento menos agressivo para Leishmaniose e através do sangue poderemos conhecer quais células estão envolvidas no processo de cura da infecção. O sangue coletado será transportado em caixa adequada para o laboratório (Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/INPA) e será utilizado, exclusivamente, para ensaios onde iremos avaliar a atividade dos compostos estudados frente às suas células do sangue. O restante do sangue que não for utilizado durante o período atual, com sua autorização, será armazenado no Biobanco (no Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/INPA) por 5 anos, podendo ser utilizado em outros projetos de pesquisa. E caso se pretenda a utilização dessas amostras armazenadas o senhor como voluntário será consultado a respeito e será convidado

para assinar novo TCLE.

Ao aceitar participar, você estará contribuindo para o avanço do conhecimento científico sobre a doença, o que pode levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e acessíveis. Ao realizar os exames e fornecer informações sobre sua condição, você estará ajudando os pesquisadores a entender melhor como a Leishmaniose afeta diferentes pessoas e a identificar possíveis soluções para enfrentar o problema. Sua participação é fundamental para o sucesso deste estudo e para a busca por uma solução para uma doença que afeta tantas pessoas em nossa região.

Queremos que você se sinta bem e seguro ao participar da nossa pesquisa. Estamos aqui para aprender sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana sem causar nenhum problema para você. Antes, durante e depois da sua participação, vamos cuidar para que você se sinta confortável. Vamos explicar tudo claramente antes de fazer qualquer coisa, responder a todas as suas perguntas e garantir que você entenda o que vai acontecer. Sua saúde e conforto são muito importantes para nós, e vamos fazer o nosso melhor para garantir que sua participação seja segura e tranquila.

Sua participação é voluntária e ao concordar em participar o senhor não terá nenhuma despesa, assim como também nenhuma remuneração. Havendo necessidade de seu comparecimento para nova coleta no INPA ou sede do laboratório de referência, o pesquisador se responsabilizará pelo seu transporte e sua alimentação (caso necessário), bem como de seu acompanhante (caso necessário).

Garantimos a você e seu acompanhante, quando necessário, o ressarcimento das despesas devido sua participação na pesquisa, ainda que não previstas inicialmente. Também estão assegurados o direito a pedir indenizações e a cobertura material para reparação a qualquer possível dano causado pela pesquisa ao participante da pesquisa.

Garantimos a você a manutenção do sigilo e da privacidade de sua participação e de seus dados durante todas as fases da pesquisa e posteriormente na divulgação científica. Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre. As informações obtidas através do instrumento de coleta de dados serão apagadas de nosso banco de dados após o período de 5 anos.

O papel onde você concorda com a pesquisa terá duas folhas originais (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Todas as páginas serão rubricadas e assinadas por você ou seu representante legal, além do pesquisador responsável. As assinaturas ficarão juntas para facilitar. Assim, sua participação na pesquisa fica bem registrada.

Se você decidir mudar de ideia durante o estudo, pode retirar sua autorização a qualquer

momento. Não será penalizado por isso e seu tratamento no serviço de saúde não será afetado. Sua liberdade de escolha é respeitada em todas as fases da pesquisa.

Se quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato com a pesquisadora responsável, Mayara Arguello da Silva, pelo (92) 99318-0806 ou pelo email: mayarguello08@gmail.com.

O Sr. participante da pesquisa também pode entrar em contato, caso tenha interesse, com o Comitê de Ética do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, situado na sede Av. André Araújo, 2936, Prédio da Diretoria, térreo, Sala-CEP, telefone (92)3643-3287 ou pelo e-mail: cep.inpa@inpa.gov.br.

Consentimento Depois de Receber Informações

Eu, _____, declaro que fui informado (a) sobre os objetivos, procedimentos e possíveis riscos envolvidos na pesquisa sobre Leishmaniose Tegumentar Americana. Entendi que minha participação é voluntária e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem penalização alguma. Declaro também que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas de forma satisfatória.

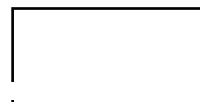
Consentimento para Armazenamento de Amostras de Sangue

Autorizo o armazenamento das amostras de sangue coletadas durante a pesquisa para estudos futuros relacionados à Leishmaniose Tegumentar Americana.

☐ Sim

☐ Não

_____, ____/____/____



Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador Responsável