

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CURSO DE BIOMEDICINA**

**DOUGLAS SOARES DE OLIVEIRA
JOSÉ WHESLLEY RODRIGUES DE LUCENA**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E
IMUNOMODULADORA DO GALATO DE OCTILA SOBRE FORMAS
AMASTIGOTAS DE *Leishmania (leishmania) infantum***

**PARNAÍBA - PI
2025**

DOUGLAS SOARES DE OLIVERIA
JOSÉ WHESLEY RODRIGUES DE LUCENA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E
IMUNOMODULADORA DO GALATO DE OCTILA SOBRE FORMAS
AMASTIGOTAS DE *Leishmania (leishmania) infantum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção de grau de
Bacharel em Biomedicina, pela Universidade
Federal do Delta do Parnaíba.

Orientador: Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca
Rodrigues.

PARNAÍBA - PI

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

L935a Lucena, José Wheslley Rodrigues de
Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania e imunomoduladora do galato de octila sobre formas amastigotas de *leishmania* (*leishmania*) *infantum* [recurso eletrônico] / José Wheslley Rodrigues de Lucena; Oliveira, Douglas Soares de. – 2025.
43 p.

TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues.

1. Leishmaniose visceral. 2. Galato de octila. 3. Leismania infantum.
I. Rodrigues, Klinger Antonio da Franca. II. Título.

CDD: 612

DOUGLAS SOARES DE OLIVEIRA
JOSÉ WHESLLEY RODRIGUES DE LUCENA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E
IMUNOMODULADORA DO GALATO DE OCTILA SOBRE FORMAS
AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum***

Aprovado em: 27/06/2025

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 KLINGER ANTONIO DA FRANCA RODRIGUES
Data: 09/07/2025 10:53:28-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Prof. Dr. Klinger Antônio da Franca Rodrigues

Orientador

Documento assinado digitalmente
 JULYANNE MARIA SARAIVA DE SOUSA
Data: 09/07/2025 11:14:01-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Ma. Julyanne Maria Saraiva de Sousa

1º Examinador

Documento assinado digitalmente
 MARIA GABRIELLY GONCALVES DA SILVA SOUSA
Data: 09/07/2025 10:36:38-0300
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Bac. Maria Gabrielly Gonçalves da Silva Sousa

2º Examinador

Dedicamos este trabalho a Deus, por nos conceder força, sabedoria e perseverança ao longo de toda esta jornada. Sem a Sua presença constante, este caminho teria sido muito mais difícil. A Ele, toda a honra e toda a glória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me permitir chegar até aqui, por nunca ter me desamparado e por me capacitar a alcançar meus objetivos. A **Ele** também agradeço pela saúde, força sabedoria e determinação que me concedeu, assim como por colocar em minha trajetória acadêmica pessoas especiais.

Aos meus pais, **Jeovane** e **Valdirene**, que, sob muito sol, fizeram-me chegar aqui na sombra. Que são meus maiores exemplos de vida, meu aconchego e meu alicerce. Obrigado por nunca medirem esforços para que eu pudesse buscar meus sonhos, por renunciarem aos de vocês para viverem os meus. Sem vocês, eu não sou ninguém.

À minha irmã **Débora**, a pessoa por quem tenho mais zelo neste mundo, pelo amor dedicado a mim, por estar sempre presente e torcer incansavelmente pelo meu sucesso. Sou seu maior fã e incentivador. O mundo é seu.

À minha avó paterna **Maria**, que foi como uma mãe para mim. Sou grato por, desde cedo, ter me incentivado, por tudo o que me ensinou, por ter sido colo nos momentos difíceis e por continuar comigo até hoje. Espero ser motivo de orgulho para a senhora, aí do céu.

Ao meu parceiro de pesquisa, **Whesley**, que está comigo desde que ingressamos no LADIC. Sou grato pela sua amizade, companheirismo, dedicação e por todos os momentos que vivemos ao longo dessa jornada, tanto os bons quanto os difíceis. Este trabalho não existiria sem você. Obrigado!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues**, pela oportunidade e confiança concedidas para a realização deste trabalho. Agradeço também pela dádiva de ser seu aluno e pelos quase três anos de aprendizados. O senhor, para mim, é um profissional excepcional e inspirador.

A **equipe do LADIC**, que auxiliou na realização dos experimentos deste trabalho e tornou o ambiente e os dias mais leves. Em especial, agradeço à **Gaby**, que sempre esteve à disposição para ajudar, desde as atividades mais simples até os cálculos mais complexos, além de ter sido uma amiga fora do ambiente científico, proporcionando-me inúmeros momentos felizes.

Aos **meus queridos amigos da graduação**, que alegraram minha jornada e me fortaleceram, impedindo que eu desistisse. Vocês não mensuram a real importância que têm para mim. Também agradeço às minhas amigas **Erika** e **Vitória**, que, mesmo distantes, sempre se fizeram presentes em minha vida, apoiando-me, ouvindo-me e aconselhando-me.

Aos membros da banca, agradeço por aceitarem o convite e por contribuírem para o enriquecimento e aprimoramento deste trabalho.

At.te.

Douglas Soares

AGRADECIMENTOS

Normalmente, todos começam agradecendo a **Deus**, e aqui não será diferente, pois é Ele quem nos proporciona todas as oportunidades e nos guia pelo seu encantador caminho. Então, Deus, muito obrigado por me guiar nesta trajetória. Desde o começo, eu sabia que tudo aconteceria no Seu tempo e do Seu jeito – e foi incrível! Nem nos meus melhores planos poderia ter imaginado algo tão perfeito quanto os Seus. Para resumir essa caminhada, deixo um trecho da Bíblia que me fortaleceu nos momentos difíceis:

"Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque Tu estás comigo." – Salmo 23:4

Mas essa jornada não foi trilhada apenas por mim e Deus; muitas pessoas foram colocadas no meu caminho para me ajudar e torná-lo mais leve. Por isso, agradeço à base de tudo: minha mãe, **Cícera Rodrigues de Moura**, e meu pai, **Givanildo José de Lucena**. Vocês foram os pilares fundamentais para que este momento se tornasse realidade, proporcionando o possível e o impossível, sem medir esforços. Sou eternamente grato.

Agradeço também ao meu irmão **João Whermenson** e à sua esposa **Nicoly Kelly** pelo apoio e por me presentearem com duas joias raras, meus sobrinhos **João Nicolas** e **Maria Agatha**. Na reta final, em meio aos últimos desafios, foi o amor por eles que me deu forças para continuar. Aos demais membros da minha **família**, que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui, meu muito obrigado!

Gostaria de agradecer imensamente ao meu amigo e companheiro de pesquisa, **Douglas Soares**, por toda a parceria, dedicação e amizade ao longo destes anos. Foram meses de esforço, desafios e aprendizados que enfrentamos juntos, sempre com muita paciência e apoio mútuo. Obrigado por compartilhar essa caminhada comigo e por contribuir tanto na minha vida.

Além da família de sangue, tive a felicidade de encontrar pessoas que me acolheram como se fossem família. Aos amigos que estiveram comigo desde o início desse sonho – **David, Fabiana, Camille, Bianca, Renan e Regiane** –, meu mais sincero obrigado. E àqueles que a universidade me trouxe e que tornaram essa caminhada mais leve – **Beatriz Guimarães, Joanna, Elber, Vinícius, Victor, Rodrigo, Lívia, Luan** e tantos outros –, sou muito grato pela companhia e amizade. Não poderia deixar de mencionar alguém que a vida fez questão de colocar no meu caminho, mesmo não sendo pela universidade: **Gladys**, muito obrigado! A todos os meus amigos, vocês são incríveis.

Este TCC também se tornou possível graças à confiança que o **Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues** depositou em mim e ao apoio dos meus companheiros de pesquisa do Laboratório de Doenças Infecciosas (LADIC), que, com paciência, me ensinaram muito — em especial, **Maria Gabrielly**, sua amizade tão sincera, seu jeito meigo e companhia fez toda diferença nessa caminhada, tornando o processo mais leve e feliz.

Um agradecimento especial ao meu companheiro, **Rikelmy Santos Sales**, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e me ajudando. Você estava comigo às três horas da madrugada, estudando bioestatística, química e tantas outras matérias. E em todas as outras situações difíceis, você foi meu porto seguro, me acalmando e me incentivando. Obrigado por tudo!

Por fim, quero dedicar este TCC à minha irmã, **Cícera Clara Rodrigues de Lucena**. Em tempos difíceis, você foi forte e, ainda assim, torceu por mim. Tenho muito orgulho da mulher que está se tornando e prometo que irei retribuir tudo o que fez por mim.

Com gratidão,
Whesley Rodrigues

*“Algumas histórias nunca deveriam acabar,
mas pelo bem ou pelo mal, tudo chega ao seu fim.”*

-Lídia, em *Las Chicas del Cable*

RESUMO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) afetam mais de um bilhão de pessoas, com forte impacto em regiões pobres como o Nordeste do Brasil, especialmente o estado do Piauí. Entre essas doenças, a leishmaniose visceral (LV) se destaca pela gravidade, pelos efeitos letais e socioeconômicos. O tratamento atual, baseado em fármacos de 1º e 2º linha, é limitado por alta toxicidade, efeitos adversos e resistência crescente do parasita. Diante disso, o galato de octila (GO), um derivado do ácido gálico com propriedades antioxidantes e antiparasitárias, surge como uma alternativa promissora contra *Leishmania spp*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do GO sobre as formas amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania infantum*) internalizadas em macrófagos, bem como investigar seus efeitos sobre mediadores imunológicos. Células RAW 267.4 foram infectadas com promastigotas de *L. infantum* e tratadas com diferentes concentrações de GO, por períodos de 24 e 72 horas. A análise foi feita por microscopia óptica, avaliando a porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas por macrófago. O GO demonstrou efeito antileishmania significativo, com inibição progressiva da infecção em todas as concentrações testadas. O CE_{50} foi de 3,87 μM (24 h) e 3,04 μM (72 h), indicando maior eficácia do GO no tempo de 72 h. Para avaliar o estímulo imunológico induzido pelo GO, foram utilizados os sobrenadantes dos ensaios de infecção, os quais foram analisados por meio do método ELISA do tipo sanduíche para a quantificação da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-6), produzidas por macrófagos infectados com *L. infantum*. Os resultados denotaram que o GO induziu uma resposta imune Th1, com aumento significativo na produção de TNF- α e IL-12, enquanto os níveis de IL-10 foram significativamente reduzidos e os níveis de IL-6 não sofreram alterações nas condições avaliadas. Esses dados indicam o potencial imunomodulador do GO, favorecendo um ambiente pró-inflamatório eficaz contra o parasita. A produção de óxido nítrico (ON) por macrófagos infectados com *L. infantum* e tratados com GO foi avaliada indiretamente por meio da quantificação de nitrito (NO_2^-). Após 24 e 72 horas de incubação, os sobrenadantes das culturas foram analisados. Após 72 horas, a concentração de 25 μM foi a única a promover efeito significativo quando comparada ao controle. Em 24 horas, também foi observada elevação de nitrito na concentração de 25 μM . Conclui-se então, que o GO é eficaz contra *L. infantum* em macrófagos, inibindo a infecção de forma eficiente, com alta potência mesmo em baixas concentrações. Além da ação antiparasitária, o GO estimula a resposta imune Th1, aumentando TNF- α e IL-12, reduzindo IL-10 e ativando os mecanismos de defesa dos macrófagos, promovendo a produção de ON. Dessa forma, o GO é um candidato promissor para tratamentos contra LV.

Palavras-chaves: leishmaniose visceral; galato de octila; *leishmania infantum*.

ABSTRACT

Neglected tropical diseases (NTDs) affect more than one billion people, with a significant impact in impoverished regions such as Northeastern Brazil, especially the state of Piauí. Among these diseases, visceral leishmaniasis (VL) stands out due to its severity, lethal effects, and socioeconomic burden. Current treatment, based on first- and second-line drugs, is limited by high toxicity, adverse effects, and growing parasite resistance. In this context, octyl gallate (OG), a derivative of gallic acid with antioxidant and antiparasitic properties, emerges as a promising alternative against *Leishmania* spp. Therefore, the aim of this study was to evaluate the activity of OG on amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) infantum* internalized in macrophages, as well as to investigate its effects on immune mediators. RAW 267.4 cells were infected with *L. infantum* promastigotes and treated with different concentrations of OG for periods of 24 and 72 hours. Analysis was performed by optical microscopy, evaluating the percentage of infected cells and the number of amastigotes per macrophage. OG demonstrated a significant anti-leishmanial effect, with progressive inhibition of infection at all tested concentrations. The EC₅₀ was 3.87 µM (24 h) and 3.04 µM (72 h), indicating greater efficacy of OG at 72 hours. To assess the immunomodulatory effects induced by OG, the supernatants from the infection assays were analyzed by sandwich ELISA to quantify the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-12) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-6) produced by macrophages infected with *L. infantum*. The results showed that OG induced a Th1 immune response, with a significant increase in TNF-α and IL-12 production, while IL-10 levels were significantly reduced and IL-6 levels remained unchanged under the evaluated conditions. These data indicate the immunomodulatory potential of OG, promoting an effective pro-inflammatory environment against the parasite. Nitric oxide (NO) production by macrophages infected with *L. infantum* and treated with OG was indirectly evaluated by measuring nitrite (NO₂⁻) levels. After 24 and 72 hours of incubation, the culture supernatants were analyzed. After 72 hours, the 25 µM concentration was the only one to show a significant effect compared to the control. At 24 hours, an increase in nitrite was also observed at the 25 µM concentration. It can thus be concluded that OG is effective against *L. infantum* in macrophages, efficiently inhibiting infection with high potency even at low concentrations. In addition to its antiparasitic action, OG stimulates a Th1 immune response, increasing TNF-α and IL-12, reducing IL-10, and activating macrophage defense mechanisms by promoting NO production. Therefore, OG is a promising candidate for treatments against VL.

Palavras-chaves: visceral leishmaniasis; octyl gallate; leishmania infantum.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Epidemiologia da leishmaniose visceral (LV)	13
2.2	Parasita e vetor	15
2.3	Fases do desenvolvimento de <i>Leishmania spp.</i>	17
2.4	Manifestações clínicas	18
2.5	Resposta imune diante infecção por espécies do gênero <i>Leishmania</i>....	20
2.6	Tratamentos convencionais e suas limitações	21
2.7	Galato de octila (GO)	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo Geral	24
3.2	Objetivos Específicos	24
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	Composto estudado	25
4.2	Parasito e células.....	25
4.2.1	Cultivo de parasitos	25
4.2.2	Culturas de células.....	25
4.3	Ensaio anti-amastigota intracelular de <i>L. infantum</i>	26
4.4	Quantificação de citocinas	27
4.5	Dosagem de óxido nítrico (ON)	27
4.6	Análise estatística.....	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Atividade do GO contra formas amastigotas de <i>L. infantum</i> internalizadas em macrófagos RAW 267.4	29
5.2	Dosagem de citocinas para avaliação do estímulo imunológico do GO em macrófagos infectados com <i>L. infantum</i>	30

5.3	Produção de óxido nítrico (ON) por macrófagos tratados com diferentes concentrações do GO em 24 h e 72 h	32
6	DISCUSSÃO	33
7	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo diversificado de mais de 20 doenças infecciosas causadas por protozoários, helmintos, bactérias, vírus, fungos e, até mesmo, acidentes com animais peçonhentos. Essas enfermidades afetam cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente em regiões marcadas por desigualdade social e pobreza (Alshahrani, Alarifi e Assiri, 2025). Segundo o Boletim Epidemiológico de DTNs no Brasil, publicado em janeiro de 2024, entre os anos de 2016 e 2020 foram registrados 583.960 novos casos dessas doenças no país, com uma média anual de 116.792 casos. Além disso, a região Nordeste é a mais afetada, com o Piauí se destacando como um dos estados mais endêmicos (de Andrade *et al.*, 2023).

Entre as doenças mais graves e prevalentes desse grupo destacam-se as leishmanioses, uma doença parasitária causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* (Knight *et al.*, 2023;). Elas são consideradas um grande problema de saúde em quatro regiões ecoepidemiológicas do mundo: Américas, África Oriental, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático, sendo endêmica em 99 países e com mais de 12 milhões de pessoas infectadas (OPAS/OMS, 2024). Além disso, estimativas recentes indicam que entre 700 mil e 1 milhão de novos casos de leishmanioses ocorrem a cada ano em todo o mundo (Cosma *et al.*, 2025).

A leishmaniose visceral (LV) é amplamente reconhecida como a forma mais grave das leishmanioses, devido ao seu potencial altamente letal quando não tratada de forma adequada. Além do impacto clínico, a LV representa um importante problema de saúde pública e impõe uma carga socioeconômica significativa, especialmente em regiões endêmicas. Os custos diretos relacionados à doença incluem despesas com consultas médicas, exames laboratoriais, internações e medicamentos, sendo agravados por pagamentos informais, muitas vezes necessários para obter acesso a serviços de saúde em sistemas sobrecarregados ou com baixa cobertura (Duarte *et al.*, 2025; Geto *et al.*, 2024).

Os tratamentos para LV disponíveis desde 1940 baseiam-se, principalmente, em fármacos de primeira linha, denominados antimoniais pentavalentes, como o antimoníato de meglumina e o estibogluconato de sódio. Além disso, utiliza-se fármacos de segunda linha, incluindo pentamidina, anfotericina B, e miltefosina (Neves, das *et al.*, 2024). A escolha do tratamento depende de muitos fatores, como eficácia, custo, aceitabilidade do paciente e possíveis efeitos citotóxicos associados aos fármacos, sobretudo aos de primeira linha, essas limitações têm levado ao uso mais frequente de medicamentos de segunda linha, embora estes também possam acarretar efeitos colaterais graves (OPAS, 2023; Dias *et al.*, 2024).

Em acréscimo, esses medicamentos estão associados a diversas limitações, como alta toxicidade, efeitos adversos graves como: genotoxicidade, alta incidência de reações infusionais e nefrotoxicidade. Além disso, apresentam elevado custo e um arsenal terapêutico bastante restrito, com poucos medicamentos aprovados, relatos crescentes de resistência aos parasitas e, muitas vezes, necessidade de suporte hospitalar (Berhe *et al.*, 2024; Sundar *et al.*, 2024).

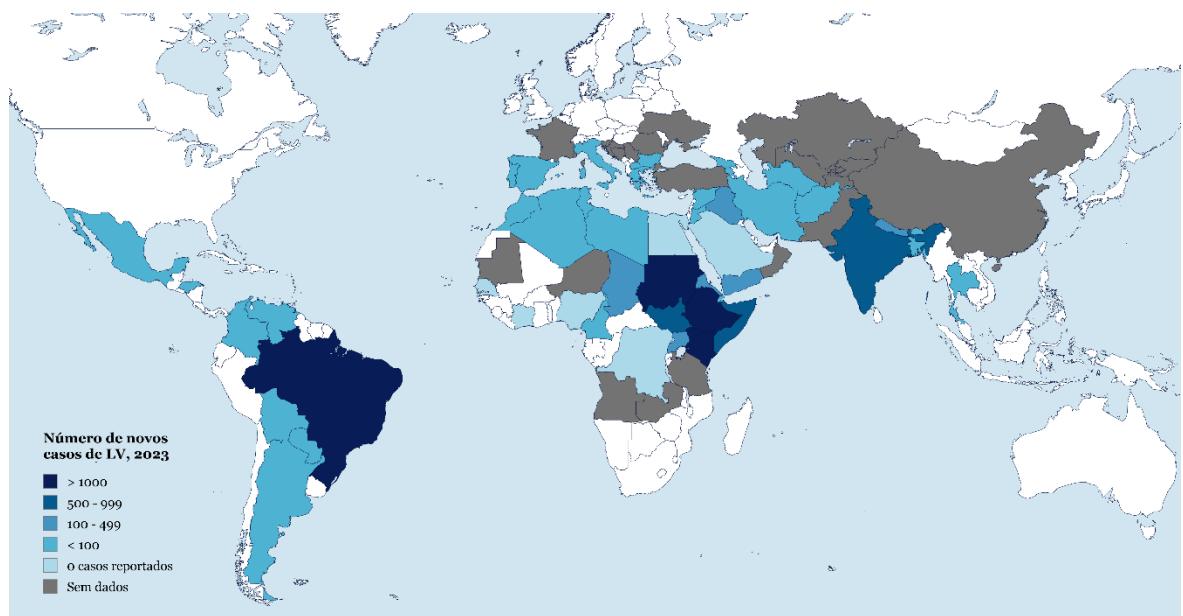
Devido a essas desvantagens se faz necessário a procura por novos métodos de tratamento menos tóxicos, que tratem a doença de maneira eficaz e preserve as células do hospedeiro. Nesse contexto, o galato de octila (GO), um derivado do ácido gálico, é amplamente reconhecido por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (Ni *et al.*, 2024). Ele tem apresentado atividades biológicas promissoras, destacando-se pela ação antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como por seus efeitos antiparasitários. Entre estes, observa-se a inibição do crescimento de *Toxoplasma gondii* e, de forma mais expressiva, uma significativa efetividade contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (Feuser *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023). Diante dessas propriedades, principalmente observadas na Família Trypanosomatidae, o GO surge como um candidato promissor para o desenvolvimento de novas terapias contra a LV.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral (LV)

Globalmente, as leishmanioses estão entre as 10 principais DTNs, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo (OMS, 2024). A LV, quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos, sendo que aproximadamente cerca de 85% dos casos globais dessa doença foram registrados no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, os quais, predominantemente, possuem clima tropical e subtropical (Geto *et al.*, 2024; Nina *et al.*, 2023). Essa forma clínica é causada por espécies do subgênero *Leishmania*, principalmente *Leishmania (leishmania) infantum* e *Leishmania (leishmania) donovani* (Ayala *et al.*, 2024). Essas duas espécies se destacam como as principais causadoras de LV no Velho Mundo, África, Ásia, Europa e Oriente Médio. Já no Novo Mundo, correspondente à América Central e do Sul, a principal responsável pela doença é a *L. infantum*, como é observado na figura 01 (Rodrigues Monteiro *et al.*, 2023).

Figura 01: Status de endemicidade de leishmaniose visceral (LV) mundial.

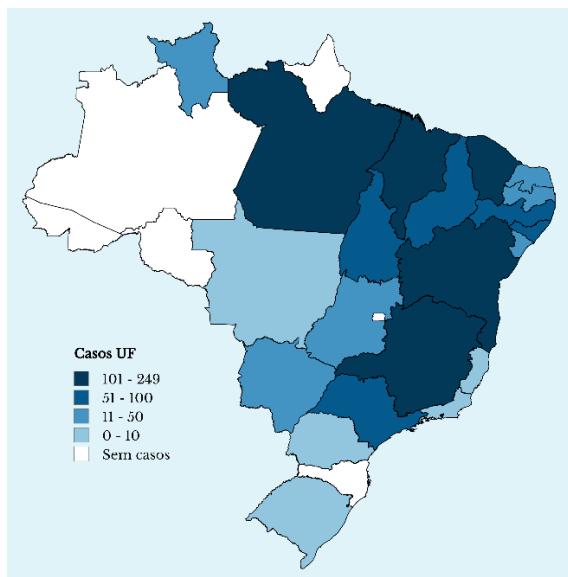


Fonte: WHO, 2024. Número de novos casos de leishmaniose visceral em 2023.

De acordo com dados epidemiológicos, o Brasil posiciona-se entre os 5 países com maior incidência da LV no mundo, sendo a região Nordeste a mais acometida (Ferro *et al.*, 2024). No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2019, foram registrados um total de 24.257 internações por LV em todo o país, com uma média de 2.425,7 casos por ano. Como é possível

observar na figura 02, a região Nordeste concentrou a maior porcentagem desses casos (55,03%), totalizando 13.350 internações, destacando-se o estado do Piauí, que respondeu por 9,6% das notificações dos casos no país (Castro Pereira Chaves, De *et al.*, 2022; Gois De Lima *et al.*, 2021).

Figura 02. Status de distribuição da leishmaniose visceral (LV) no Brasil em 2021.



Fonte: Ministério da Saúde do Brasil, 2022. Casos notificados no ano de 2021.

Além disso, em 2024 foram notificados 681 casos de LV no Brasil, dos quais 112 ocorreram no estado do Piauí. Desses, 14 evoluíram para óbito, sendo 5 registrados na capital do Estado, Teresina. Os demais óbitos foram atribuídos aos municípios de Bom Princípio do Piauí, Dirceu Arcoverde, Joca Marques, Pedro II, Parnaíba, Padre Marcos, Luís Correia e Valença do Piauí, com uma morte registrada em cada um deles, como se observa na figura 03. Esses dados refletem um aumento na incidência e na letalidade em relação aos anos anteriores: em 2021, foram confirmados 96 casos com 10 óbitos; em 2022, 101 casos com 11 óbitos; e, em 2023, 90 casos com 4 óbitos (TABNET, 2024).

Figura 03. Status de distribuição da leishmaniose visceral (LV) no Piauí em 2024.



Fonte: TABNET, 2024. Número de óbitos confirmados.

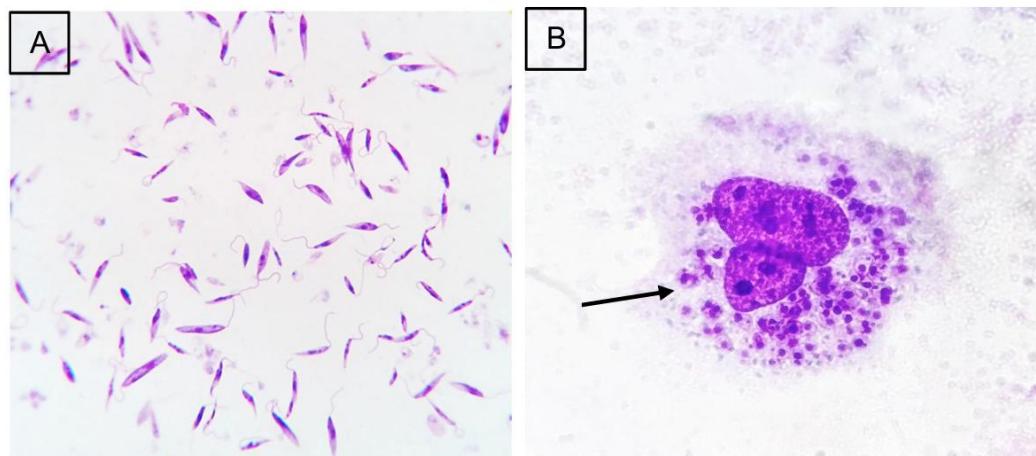
2.2 Parasita e vetor

As leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastidae. Esse gênero é dividido em dois subgêneros principais: *Leishmania* e *Viannia*, que se diferenciam pelo local de desenvolvimento no intestino do inseto vetor (Majoor *et al.*, 2025). Com pelo menos 21 espécies patogênicas (Kourieh *et al.*, 2025), seu ciclo de vida é divido entre o hospedeiro invertebrado, representado pelos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, e o hospedeiro vertebrado, incluindo mamíferos como cães e humanos (Makarani *et al.*, 2025).

Como é possível observar na figura 04, o parasito *Leishmania* apresenta duas formas morfológicas principais em seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. A forma promastigota, que ocorre no trato digestivo do inseto vetor (flebotomíneo), é alongada, flagelada e livre, medindo cerca de 15 a 20 µm de comprimento (figura A04). Essa forma é responsável pela infecção inicial no hospedeiro vertebrado, sendo fagocitada por macrófagos após a picada do vetor (Rihs *et al.*, 2025; Sasidharan e Saudagar, 2021). Dentro dessas células, o parasita se transforma na forma amastigota, que é oval ou arredondada, com flagelo interior e com cerca

de 2 a 5 μm , adaptada ao ambiente intracelular dos fagolisossomos (figura B04). Essa forma se multiplica por divisão binária e é a responsável pela patogenicidade no hospedeiro humano. A alternância entre essas morfologias é essencial para a sobrevivência do parasita nos diferentes ambientes que compõem seu ciclo de vida (Rogers, Pablos, de e Sunter, 2024).

Figura 04: Morfologia de *Leishmania* spp.



Fonte: Autoria própria. Formas promastigotas (A); Formas amastigotas – seta preta (B).

A transmissão ocorre por meio do repasto sanguíneo de insetos vetores pertencentes à ordem Diptera e à família Psychodidae, que agrupam os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, responsáveis pela transmissão das leishmanioses no Velho e no Novo Mundo, respectivamente. Esses insetos são conhecidos popularmente como mosquito-palha, asa-dura, tatuquiras e birigui, são pequenos e possuem cerca de 5 mm de comprimento, como é visto na figura 05 (Cecílio, Cordeiro-da-Silva e Oliveira, 2022). Apenas as fêmeas são hematófagas e, portanto, capazes de transmitir o parasito causador da doença. Sua presença é comum em regiões tropicais e subtropicais, sendo sua proliferação fortemente influenciada por fatores climáticos, especialmente a temperatura (Navarro *et al.*, 2025).

A disseminação e a distribuição dos flebotomíneos estão diretamente relacionadas à ocorrência das leishmanioses. O gênero *Phlebotomus* predomina no Velho Mundo, abrangendo ecossistemas áridos ou semiáridos, enquanto o gênero *Lutzomyia* é o principal transmissor nas Américas, especialmente em áreas de floresta tropical e em ambientes peridomésticos (Aklilu *et al.*, 2023). No Brasil, a espécie mais relevante é a *Lutzomyia longipalpis*, amplamente associada à transmissão da LV (Santos, dos, Coelho e Reimão, 2025). Esses vetores são mais ativos ao amanhecer e ao entardecer, possuem picadas quase indolores que não emitem som, o que permite que a pessoa seja picada sem perceber (Msellemu *et al.*, 2024).

Figura 05: Inseto vetor das leishmanioses.



Fonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2015. - Fêmea de flebotomíneo.

2.3 Fases do desenvolvimento de *Leishmania spp.*

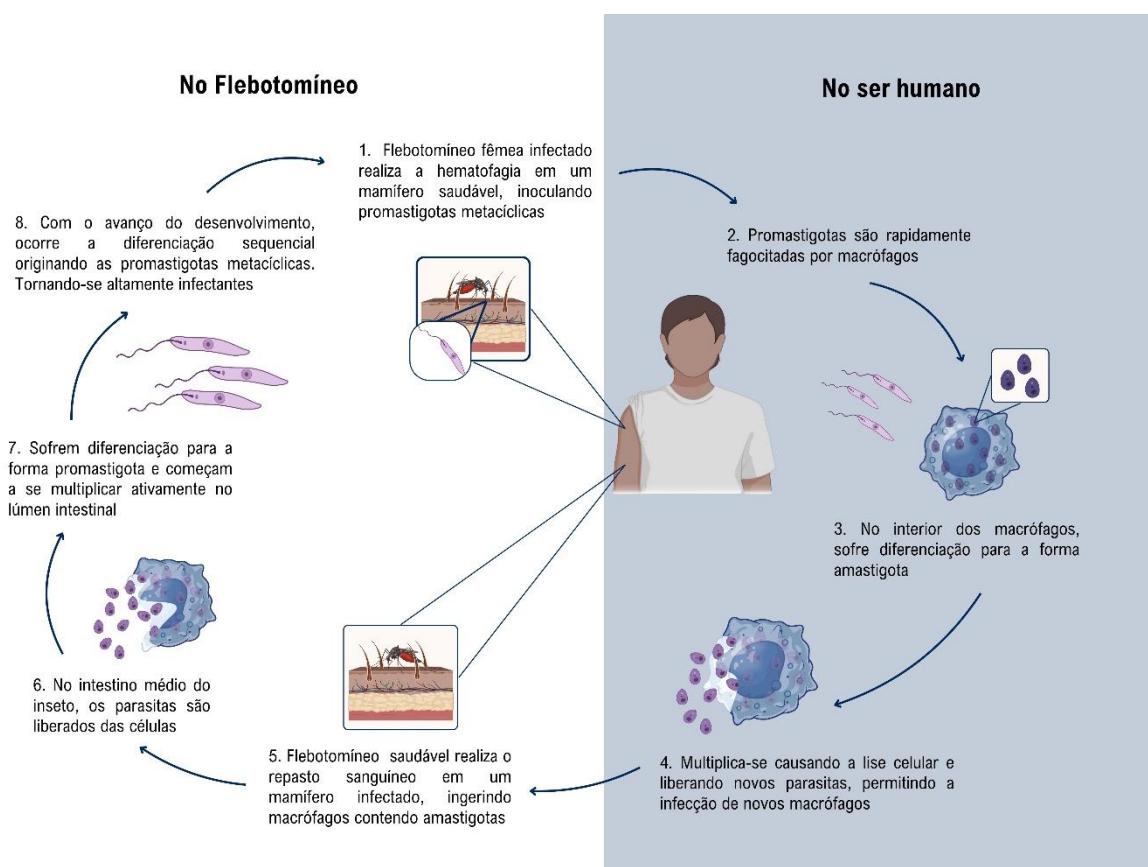
Transitando entre duas principais morfologias, o ciclo de vida da *Leishmania* é heteroxênico e digenético, envolvendo dois hospedeiros distintos: um mamífero, onde ocorre a fase intracelular, e um inseto vetor, onde ocorre a fase extracelular (Tchatat Tali *et al.*, 2023). Durante esse ciclo, o parasita alterna entre dois estágios morfológicos principais: as amastigotas, formas intracelulares esféricas e imóveis encontradas no hospedeiro vertebrado, (Castro Pereira Chaves, De *et al.*, 2022; Rogers, Pablos, de e Sunter, 2024) e as promastigotas, formas extracelulares alongadas e flageladas presentes no flebotomíneo. O ciclo se inicia quando um flebotomíneo fêmea infectado realiza a hematofagia em um mamífero saudável, inoculando promastigotas metacíclicas altamente infectantes através da saliva (Navarro *et al.*, 2025).

Dentro do organismo do hospedeiro, as promastigotas são rapidamente fagocitadas por macrófagos e neutrófilos como parte da resposta imune inata. No entanto, o parasita é capaz de resistir à degradação dentro dos fagolisossomos e, no interior dos macrófagos, sofre diferenciação para a forma amastigota. Essa forma intracelular se multiplica por fissão binária, causando a lise celular e liberando novos parasitas no meio extracelular, permitindo a infecção de novos macrófagos e perpetuando o ciclo. O parasita tem preferência pelo sistema retículo-endotelial, afetando principalmente órgãos como o baço, o fígado, a medula óssea e os tecidos linfoides. Essa disseminação está diretamente associada às manifestações clínicas da doença (Elawad *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2023; Tchatat Tali *et al.*, 2023).

Como demonstrado na figura 06, a transmissão para o vetor ocorre quando um flebotomíneo fêmea saudável realiza o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingerindo

macrófagos contendo amastigotas. No intestino médio do inseto, os parasitas são liberados das células e sofrem diferenciação para a forma promastigota, que começa a se multiplicar ativamente no lúmen intestinal. Com o avanço do desenvolvimento, ocorre a diferenciação sequencial originando as promastigotas metacíclicas, que adquirem um corpo celular afunilado e um flagelo longo, tornando-se altamente infectantes. Durante a picada, esses parasitas são liberados no tecido do novo hospedeiro, reiniciando o ciclo biológico (Salloum, Tokajian e Hirt, 2021; Tom *et al.*, 2024).

Figura 06: Ciclo biológico de *Leishmania spp*



Fonte: Autoria própria.

2.4 Manifestações clínicas

A manifestação clínica da leishmaniose é determinada pela interação entre a resposta imunológica do hospedeiro, espécie do protozoário envolvido e entre outros fatores como o ambiente. A doença pode se apresentar em cinco formas, como observado na figura 07 (Dourado *et al.*, 2024). A leishmaniose cutânea (LC), forma mais comum e se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões ulceradas na pele, que podem ser únicas ou múltiplas, localizadas

ou difusas (figura 07 A). A leishmaniose mucocutânea (LMC), uma manifestação mais agressiva, na qual o parasita dissemina-se para as mucosas da cavidade oral, nasal e faríngea (figura 07 B). A leishmaniose cutânea difusa (LCD), é uma variação da forma cutânea e apresenta múltiplas lesões disseminadas por todo o corpo, sem tendência à ulceração (figura 07 C). Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK), que manifesta-se após a cura da LV, apresentando lesões cutâneas com nódulos e placas na pele (figura 07 D). E a LV, também conhecida como calazar, forma mais grave da doença, acometendo órgãos internos como fígado, baço e medula óssea (figura 07 E) (Ahmadi *et al.*, 2024; Hemmert *et al.*, 2025).

A LV manifesta-se clinicamente como uma infecção crônica, caracterizada por um período de incubação variável entre 10 dias e 1 ano. Os principais sintomas incluem febre persistente, perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (Ardeshtiri *et al.*, 2025). A febre pode ser inicialmente intermitente, tornando-se contínua à medida que a doença progride (Ahmadi *et al.*, 2024). A hepatoesplenomegalia indolor resulta da infecção do sistema reticuloendotelial, enquanto a pancitopenia ocorre devido à invasão da medula óssea pelos parasitas, levando a anemia (causando palidez), trombocitopenia (aumentando o risco de hemorragias) e leucopenia (favorecendo infecções oportunistas) (Alvar, Boer, den e Dagne, 2021; Sreedharan e Rao, 2023).

A leishmaniose cutânea pós-calazar é uma complicação da forma visceral, causada por *L. donovani* ou *L. infantum*, e afeta principalmente pacientes imunodeprimidos. Pode surgir até 20 anos após o tratamento ou, em casos de coinfecção por HIV, ocorre antes da forma visceral. Manifesta-se por máculas, nódulos e pápulas, geralmente no rosto. A apresentação varia conforme a região: forma macular na Ásia e papular na África (Abadías-Granado *et al.*, 2021).

Figura 07: Formas nas quais as leishmanioses se manifestam.



Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2024.

2.5 Resposta imune diante infecção por espécies do gênero *Leishmania*.

A resposta imune à infecção por *Leishmania* spp. é um processo complexo e multifacetado, envolvendo a interação entre o parasito e o sistema imunológico do hospedeiro (Sabbahi *et al.*, 2024). O parasito é transmitido pela picada do flebotomíneo (mosquito-palha), e os promastigotas metacíclicos entram na pele do hospedeiro, onde são reconhecidos por células do sistema imune inato. Os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas identificam a *Leishmania* através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores Toll-like (TLRs), que detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície do parasita (Goto, 2025). Os neutrófilos geralmente são as primeiras células a chegar ao local da infecção e fagocitam os parasitas, entretanto muitas vezes não conseguem eliminá-los completamente. Em vez disso, eles podem servir como transporte do parasita para outras células, como os macrófagos, considerados as principais células alvo (Hammi *et al.*, 2025; Khandibharad, Nimsarkar e Singh, 2022).

Após a fagocitose pelos macrófagos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas, que conseguem sobreviver ao inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, estabelecendo uma infecção persistente (Valigurová e Kolářová, 2023). Um dos principais fatores que determinam o desfecho da doença é a polarização dos macrófagos, que podem assumir um perfil M1, associado a uma resposta inflamatória e microbicida, ou M2, que favorece a replicação do parasita e contribui para a cronicidade da infecção. Os macrófagos M1 são ativados pela resposta Th1, mediada em especial por IFN- γ (Interferon-Gama) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- Alfa), que induzem a produção de óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio (ROS), substâncias leishmanicidas essenciais para o controle da infecção. Em contrapartida, os macrófagos M2 são estimulados pela resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-6, IL-10 e TGF- β , que levam à desativação dos macrófagos, promovem um ambiente imunossupressor e favorecem a persistência do parasita (Bogdan, Islam, N.-A.-K., et al., 2024; Koh, Gollob e Dutra, 2025).

Para evadir a resposta efetiva, a modulação do sistema imune pelo parasita é um aspecto crítico da patogênese da doença. O parasito emprega diversos mecanismos, incluindo a inibição da apresentação de抗ígenos, a modulação da produção de citocinas e a indução de tolerância imune. Moléculas derivadas de *Leishmania*, como o lipofosfoglicano (LPG), desempenham um papel importante na modulação. O LPG modula a sinalização de TLR2 e o eixo PI3K/Akt em macrófagos, essa modulação leva a uma redução na produção de IL-12 e favorece a resposta Th2, que suprimem a resposta Th1 protetora (Teufel, Joosten e Santos, dos, 2024). Além disso, a *Leishmania* pode inibir a apoptose e prevenir a piroptose, permitindo que o parasita persista na célula hospedeira por longos períodos (Fernandes e Zamboni, 2024).

2.6 Tratamentos convencionais e suas limitações

Historicamente, os antimoniais pentavalentes, como o antimonioato de meglumina e o estibogluconato de sódio, denominados medicamentos de primeira linha, têm sido o tratamento mais comum para a LV (Griensven, van et al., 2024; Salari et al., 2022). Porém, devido à toxicidade associada e ao surgimento de resistência, outros medicamentos foram desenvolvidos ou avaliados (Sifontes-Rodríguez et al., 2024). A anfotericina B convencional foi introduzida em áreas com resistência aos antimoniais. No entanto, por apresentar toxicidade significativa, foi substituída por formulações de anfotericina B à base de lipídios (principalmente anfotericina B lipossomal [L-AmB]) devido à menor toxicidade dessas formulações, entretanto sua

aplicação é dificultada por possuir elevado custo e se torna inviável em ambientes com poucos recursos e de difícil acesso (Zhang *et al.*, 2025).

A duração do tratamento varia conforme o tipo de leishmaniose. Em geral, o antimoníato de meglumina (Glucantime®) é administrado por 28 a 30 dias, enquanto a anfotericina B pode ser aplicada diariamente ou em dias alternados por 15 a 20 doses, especialmente nos casos de LV. Para a leishmaniose cutânea, a miltefosina é administrada diariamente por 28 dias. Os derivados azólicos, como cetoconazol e itraconazol, podem ser utilizados no tratamento da leishmaniose cutânea e mucocutânea. A escolha do regime terapêutico leva em consideração o estado clínico do paciente e a decisão médica, podendo envolver terapias combinadas para aumentar a eficácia e reduzir a resistência medicamentosa (Ansari *et al.*, 2025; Pal *et al.*, 2023; Sheikh *et al.*, 2024).

A miltefosina é atualmente o único medicamento oral disponível, porém possui muitas desvantagens, incluindo a baixa barreira genética à resistência, teratogenicidade, efeitos colaterais gastrointestinais (geralmente moderados) e potencial toxicidade ocular (Castro *et al.*, 2023). Esses tratamentos além de todos os efeitos colaterais anteriormente citados, ainda são inacessíveis financeiramente, negligenciados pelo poder público e, muitas das vezes, exigem que o indivíduo seja hospitalizado, decorrente de abordagens terapêuticas ineficazes que prejudicam a adesão do paciente, levando à seleção de estirpes resistentes (Mota *et al.*, 2024).

Estudos recentes indicam que a *Leishmania* spp tem desenvolvido mecanismos genéticos de resistência, incluindo mutações nos genes AQP1 (Aquaglyceroporin 1), responsável por facilitar o transporte de água e solutos, incluindo o antimonial (Singh e Sharma, 2024). Mutações ou redução na expressão deste gene diminuem a sensibilidade ao medicamento. Outra mutação notável é no gene MRPA, um transportador da subfamília ABCC, associados ao transporte de metabólitos e fármacos. O aumento na expressão de MRPA foi frequentemente ligado à resistência aos fármacos de referência (Nery *et al.*, 2024; Santana, de, Miranda e Carvalho, 2025a).

2.7 Galato de octila (GO)

O GO é um éster derivado do ácido gálico, um composto fenólico amplamente encontrado em fontes vegetais, como cascas de carvalho do gênero *Quercus*, raízes de romã, *Camellia sinensis* e folhas de uva-ursina (Sahu e Rawal, 2024). Reconhecido por suas potentes propriedades antioxidantes, o GO é aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos

Estados Unidos, sendo amplamente incorporado na indústria alimentícia para evitar a oxidação de óleos e prolongar a estabilidade de produtos (Avuloglu Yilmaz, Yuzbasioglu e Unal, 2023).

A sua aplicabilidade na indústria farmacêutica tem sido alvo de pesquisa na área da microbiologia. O GO vem mostrando atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, incluindo cepas multirresistentes, como *S. epidermidis*, *S. Pyogenes* e *B. subtilis*, destacando uma baixa citotoxicidade e atividade hemolítica (Yang *et al.*, 2024). No estudo de Tamang *et al.*, 2022, o GO mostrou efeito sinérgico com β -lactâmicos (penicilina, ampicilina e cefalotina) contra o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), tornando-o sensível a esses antibióticos. O mesmo efeito foi visto na pesquisa de Santativongchai *et al.*, 2022, que o GO aumentou as atividades bacteriostáticas e bactericidas da penicilina e da bacitracina contra *S. epidermidis*.

No contexto das infecções fúngicas, o GO demonstrou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, promovendo disfunção mitocondrial, danos à membrana celular e inibição do ciclo do glioxilato, um importante mecanismo de adaptação do fungo (Saibabu *et al.*, 2020). O que foi confirmado no estudo posterior, especificando que o GO é um inibidor específico da bomba de efluxo CaCdr1p, reforçando seu potencial terapêutico para infecções resistentes (Singh, Fatima e Hameed, 2020).

Recentemente, o GO tem sido investigado no campo da parasitologia, demonstrando eficácia contra *Toxoplasma gondii*, reduzindo significativamente a proliferação do taquizoíto sem induzir toxicidade às células hospedeiras (Lu *et al.*, 2022). O efeito inibitório do GO em parasitas da ordem Kinetoplastidae fica evidente no estudo de Feuser *et al.*, 2019, onde foi avaliado nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) carregadas com galato de octila e o GO em sua forma pura demonstraram eficácia contra *L. amazonensis*, sem efeito citotóxico em eritrócitos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antileishmania e o perfil imunomodulador do GO frente às formas amastigotas de *L. infantum* em macrófagos infectados *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a capacidade do GO em reduzir a taxa de infecção e a carga parasitária intracelular em diferentes concentrações e tempos de exposição.
- Determinar a concentração efetiva média (CE_{50}) do GO.
- Analisar o impacto do GO na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-6) em macrófagos infectados.
- Avaliar a produção de óxido nítrico (ON) pelas células tratadas, como indicativo de ativação imunológica frente à infecção.

4 METODOLOGIA

4.1 Composto estudado

O composto GO, com pureza de 99%, foi adquirido comercialmente da empresa Merck Life Science. Para a preparação das soluções-estoque, o GO foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO; Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, EUA) na concentração de 20 mg/mL. As diluições subsequentes foram realizadas nos meios de cultura específicos de cada ensaio, de modo a alcançar as concentrações desejadas, assegurando que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 0,5%. Os ensaios de atividade biológica foram conduzidos no Laboratório de Doenças Infecciosas (LADIC), sob a coordenação e orientação do Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues, da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis Velloso.

4.2 Parasito e células

4.2.1 Cultivo de parasitos

Os parasitos da espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) foram cultivados seguindo a metodologia adaptada Bethencourt-Estrella *et al.*, 2024. O protozoário foi cultivado na morfologia infectante para mamíferos (promastigota), em meio de cultura denominado nesse trabalho como Schneider completo (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (meio Schneider suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (Cutilab, Campinas, Brasil), e 1 % de solução antibiótica (penicilina 10 000 UI / estreptomicina 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) . As garrafas contendo os parasitos foram incubadas a 26 °C em incubadora de demanda biológica de oxigênio (BOD, do inglês Biochemical oxygen demand) (Eletrolab EL202, São Paulo, Brasil).

4.2.2 Culturas de células

A linhagem celular de macrófagos RAW 267.4 foi mantida em garrafas de culturas com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado a 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de solução antibiótica (penicilina 10

000 UI / estreptomicina 10 mg/mL) e denominado DMEM completo neste trabalho. As garrafas de culturas foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ em incubadora de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Ao atingir 80% de confluência eram feitos repiques, em torno de 48 h a 72 h após o acondicionamento (Ardeshiri *et al.*, 2025).

Para os repiques, o meio foi retirado e as garrafas lavadas entre duas a três vezes com PBS estéril (salina tamponada com fosfato), assim garantindo a remoção das células inviáveis e não aderidas. Posteriormente, Tripsina-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foi adicionado e as garrafas foram incubadas durante 5 minutos em temperatura de 37 °C e 5 % de CO₂. Após o tempo, meio DMEM completo foi adicionado ao conteúdo da garrafa para inibir a ação da tripsina. Em seguida as células foram transferidas para tubos de poliestireno estéreis e centrifugados a 1000 rpm por 10 min. Decorrido o tempo, as células foram diluídas, coradas (Azul de Tripan; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e contadas em câmara de Neubauer, e cerca de 1 x 10⁵ células/garrafa foram usadas para novos repiques (Wang *et al.*, 2021).

4.3 Ensaio anti-amastigota intracelular de *L. infantum*

Para avaliar o efeito do GO sobre amastigotas intracelulares de *L. infantum*, macrófagos RAW 267.4 foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis (13 mm), na concentração de 1 x 10⁵ células por poço, em meio DMEM completo. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por um período de 4 horas para permitir a adesão celular. Após esse período, as células foram infectadas com formas promastigotas em fase estacionárias de *L. infantum* na proporção de 10 parasitas por macrófago e incubadas sob as mesmas condições por um período de 12 h. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS para remover parasitas não internalizados (Alanazi e Alghabban, 2024).

As células infectadas foram submetidas ao tratamento com GO em concentrações variáveis entre 3,12 e 25 µg/mL, sendo incubadas por um período de 24 e 72 horas (Araújo, de *et al.*, 2024). O grupo controle negativo consistiu em macrófagos infectados não tratados, incubados em meio DMEM contendo 0,5% de DMSO (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, USA). Ao término do período de incubação, as lamínulas foram removidas, fixadas e coradas com corante panóptico rápido. A infecção foi analisada por microscopia óptica, contabilizando-se 300 macrófagos por lamínula para a determinação da taxa de infecção e do número de parasitos por célula. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração efetiva média (CE₅₀). Além disso, ao final dos experimentos, o sobrenadante dos poços foi coletado e

armazenado a -20 °C para posterior análise de mecanismos indiretos da atividade do GO sobre os parasitos (Alanazi e Alghabban, 2024).

4.4 Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas TNF- α e IL-12 (associadas ao perfil Th1), bem como IL-10 e IL-6 (relacionadas ao perfil Th2), foi realizada conforme o Procedimento Operacional Padrão (POP) estabelecido pelo fabricante do kit (Peprotech®). A análise foi conduzida por meio da técnica de ELISA do tipo sanduíche, utilizando os sobrenadantes obtidos dos macrófagos infectados. Para assegurar a precisão dos resultados, curvas padrão foram geradas com citocinas recombinantes, permitindo a interpolação dos dados e a determinação das concentrações nas amostras testadas. (Ding *et al.*, 2024).

As placas de microtitulação (NUNC-ImmunoTM, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram previamente revestidas com anticorpos de captura específicos e incubadas a 4 °C por 18 horas para permitir a adesão eficiente dos anticorpos à superfície da placa. Após esse período, os poços foram lavados com tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, seguido do bloqueio de sítios inespecíficos com solução de PBS suplementada com albumina. A placa foi então mantida por 1 hora em ambiente refrigerado. Após nova série de lavagens, os sobrenadantes das amostras experimentais foram adicionados aos poços, juntamente com diluições seriadas das citocinas recombinantes. A placa foi novamente incubada por 18 horas a 4 °C (Ding *et al.*, 2024).

Na etapa seguinte, realizou-se nova lavagem com PBS-Tween e adicionou-se o anticorpo de detecção biotinilado, formando o complexo de reconhecimento. A placa permaneceu incubada por mais 1 hora em temperatura controlada. Posteriormente, foi aplicado o conjugado enzimático avidina-peroxidase (avidina-HRP), com tempo de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. A detecção da reação enzimática foi realizada pela adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em presença de peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 N. A leitura da absorbância foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro (Ding *et al.*, 2024).

4.5 Dosagem de óxido nítrico (ON)

A produção de ON foi avaliada indiretamente por meio da quantificação de nitrito (NO_2^-) presente no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados e tratados com GO, utilizando o reagente de Griess (Promega). Após a incubação, 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços, juntamente com concentrações crescentes de nitrito de sódio (NaNO_2 ; 3,12–125 µM) diluído em meio RPMI, para construção da curva padrão. Em seguida, adicionou-se 100 µL do reagente de Griess (composto por 1% de sulfanilamida em 10% [v/v] de ácido fosfórico e 0,1% de naftilenodiamina, ambos em água Milli-Q®) a cada poço. As placas foram incubadas por 10min, momento seguinte foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm e a concentração de nitrito foi estimada por interpolação a partir da curva padrão (Kopelyanskiy *et al.*, 2022).

4.6 Análise estatística

O valor de CE_{50} (concentração efetiva média) foi determinado por meio de análise de regressão não linear. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, realizados em triplicata, garantindo a reproducibilidade dos resultados. Para a comparação estatística entre os grupos, foi aplicada análise de variância (ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey e Teste t-student (comparação entre grupos 24 e 72 h). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (Castro *et al.*, 2024).

5 RESULTADOS

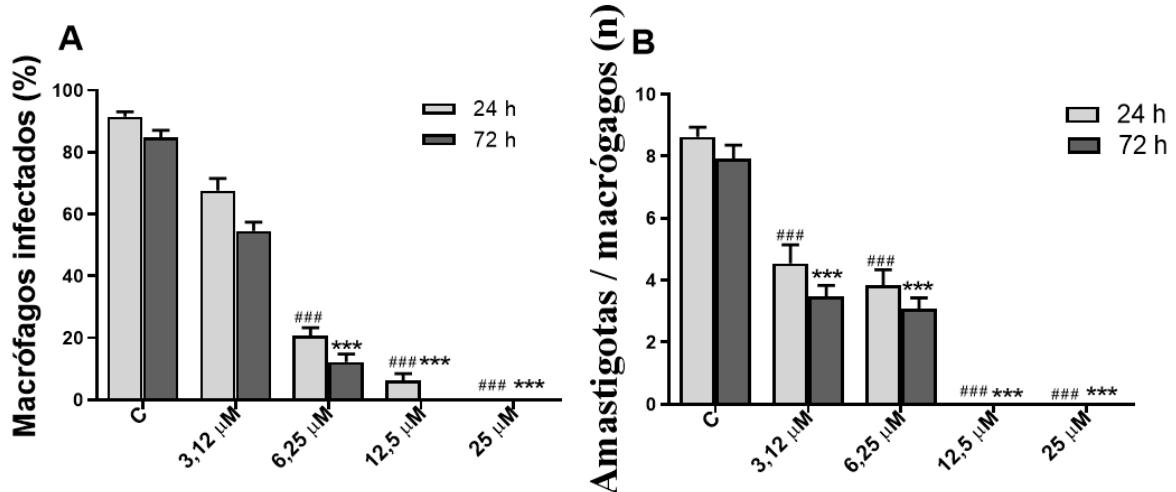
5.1 Atividade do GO contra formas amastigotas de *L. infantum* internalizadas em macrófagos RAW 267.4

O tratamento com GO, por 24 horas, promoveu uma queda progressiva na porcentagem de infecção de macrófagos, mesmo em concentrações mais baixas. A redução foi de 77,33% em 6,25 μM , 93,25% em 12,5 μM , alcançando 100% de inibição na concentração de 25 μM comparado com o controle (Gráfico 01A). No tratamento de 72 horas os resultados foram semelhantes, com redução de 85,61% em 6,25 μM e inibição de 100% nas concentrações 12,5 e 25 μM (Gráfico 01A).

Esse efeito também se refletiu no número de amastigotas por célula hospedeira, que foi significativamente reduzido no tempo de 24 horas. A menor carga parasitária foi observada na concentração de 12,5 e 25 μM , com inibição total (100%). Concentrações menores também apresentaram efeito, com reduções de 47,31%, e 55,45% nas concentrações de 3,12 μM e 6,25 μM , respectivamente (Gráfico 01B). Após 72 horas a inibição determinada foi de 56,37% em 3,12 μM , 61,15% em 6,25 μM e 100% em 12,5 e 25 μM (Gráfico 01B).

A partir dos dados obtidos, foi possível calcular a concentração efetiva média (CE_{50}), que corresponde à concentração necessária para reduzir em 50% a carga parasitária. O CE_{50} do GO foi estimado em 3,87 μM para 24 horas e 3,04 μM para 72 horas. O antimoniato de meglumina apresentou uma CE_{50} de 174,42 μM após 72 horas de exposição. Em contraste, após 24 horas, o antimoniato de meglumina não reduziu a sobrevivência dos amastigotas intramacrofágicos, tornando inviável a determinação de sua CE_{50} .

Gráfico 01: Atividade antileishmania do galato de octila (GO) em macrófagos infectados com *Leishmania infantum* após 24 e 72 h de tratamento.



Fonte: Elaboração própria. A - Porcentagem de infecção por macrófagos; B - Número de amastigotas internalizadas por macrófagos. Macrófagos 267.4 foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* na proporção de 10:1 macrófagos/parasito e tratadas em diferentes concentrações de GO por 24 e 72 horas. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação dos grupos com seu respectivo controle, sendo os grupos com asterisco em comparação com o controle de 24 h e “jogo da velha” em comparação com o controle de 72 h. Teste *t*-student foi utilizado para comparação entre grupos 24 e 72 h e não houve diferença. C – Controle (DMSO 0,5% em meio RPMI completo).

5.2 Dosagem de citocinas para avaliação do estímulo imunológico do GO em macrófagos infectados com *L. infantum*

A análise do perfil imunomodulador do GO em macrófagos RAW 267.4 infectados com *L. infantum* revelou alterações significativas na produção de citocinas associadas aos perfis Th1 e Th2, como ilustrado no Gráfico 02. De modo geral, o tratamento com GO promoveu o aumento de citocinas pró-inflamatórias típicas da resposta Th1, como TNF- α e IL-12, ao mesmo tempo em que reduziu a expressão de citocina anti-inflamatória do perfil Th2, como IL-10 e IL-6.

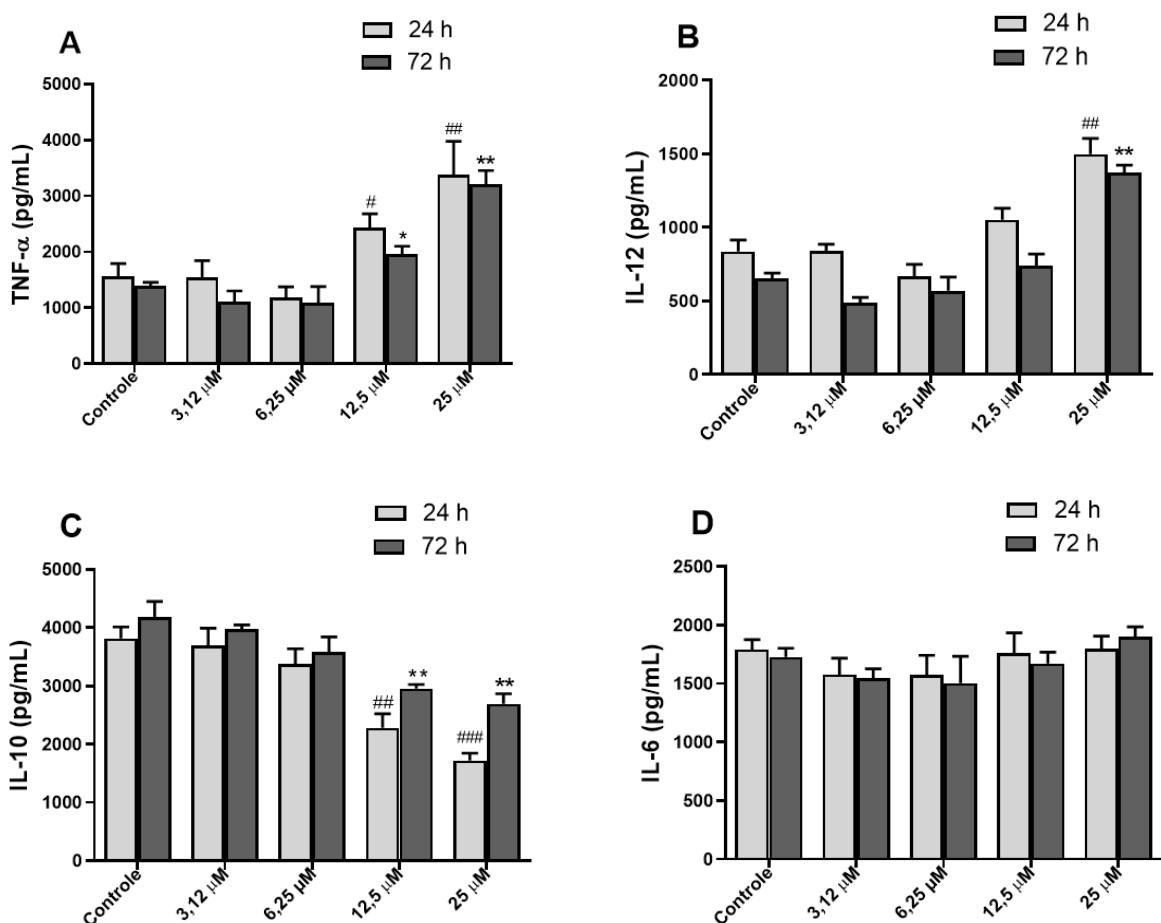
Em relação ao TNF- α em 24 horas, observou-se um aumento significativo de 55,45 % na concentração de 12,5 μM e de 116,14 % em 25 μM , quando comparado ao grupo controle negativo (Gráfico 02A). De maneira semelhante, após 72 horas os níveis de TNF- α apresentaram elevação significativa de 41,02% em 12,5 μM e 130,23% em 25 μM (Gráfico 02A), indicando o estímulo de uma resposta imune celular efetora.

Para a citocina IL-12 os resultados também apontaram elevações significativas. Em 24 horas, houve um aumento de 25,96% na concentração de 12,5 μM e de 79,14% em 25 μM .

Após 72 horas, a produção de IL-12 manteve-se elevada apenas na maior concentração testada, com 111,39% (Gráfico 02B).

Por outro lado, os níveis de IL-10 foram significativamente reduzidos após o tratamento com GO, com diminuições após 24 horas de 40,28% e 54,88% nas concentrações de 12,5 μM e 25 μM , respectivamente, em comparação ao controle (Gráfico 02C). Esse padrão se manteve após as 72 horas, com 29,38% em 12,5 μM e 35,62 em 25 μM . Já os níveis de IL-6 não se alteraram nas condições avaliadas (Gráfico 02D).

Gráfico 02: Avaliação do estímulo imunológico do galato de octila (GO) após 24 e 72 horas de tratamento.



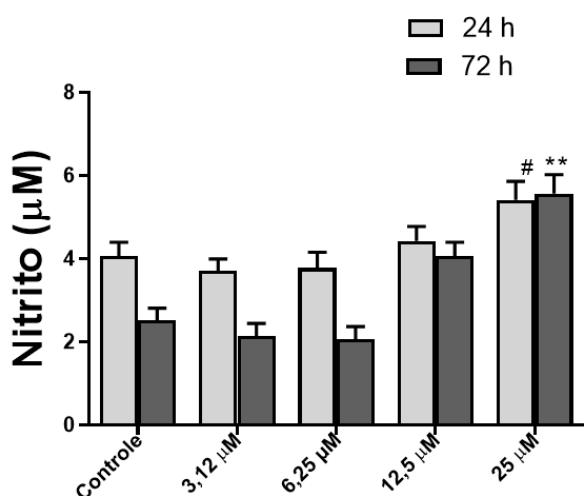
Fonte: Elaboração própria. As mensurações de citocinas TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-6 foram realizadas através do ensaio ELISA sanduíche utilizando o sobrenadante armazenado do ensaio de infecção. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação dos grupos com seu respectivo controle, sendo os grupos com asterisco em comparação com o controle de 24 h e “jogo da velha” em comparação com o controle de 72 h. Teste *t*-student foi utilizado para comparação entre grupos 24 e 72 h e não houve diferença.

5.3 Produção de óxido nítrico (ON) por macrófagos tratados com diferentes concentrações do GO em 24 h e 72 h

A produção de ON foi avaliada a partir da quantificação de nitrito (μM), no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados por *L. infantum* tratadas com diferentes concentrações de GO. Como demonstrado no Gráfico 03, os níveis de nitrito foram mensurados após 24 e 72 horas de incubação, com o objetivo de investigar uma possível ativação dessas células frente ao composto.

Os resultados revelaram um aumento progressivo na produção de ON conforme a elevação da concentração de GO, com destaque para os tempos mais prolongados de exposição. Após 72 horas, a concentração de 25 μM apresentou aumento nos níveis de nitrito, de 121,54% da concentração, quando comparada ao controle. Já após 24 horas, os valores de nitrito mantiveram-se próximos ao controle em todas as concentrações testadas, exceto na de 25 μM , que apresentou aumento significativo de 32,99% em relação ao grupo controle, como é possível observar no gráfico 03.

Gráfico 03: Atividade de óxido nítrico em macrófagos tratados após 24 e 72 horas.



Fonte: Elaboração própria . Foi realizado *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação dos grupos com seu respectivo controle, sendo os grupos com asterisco em comparação com o controle de 24 h e “jogo da velha” em comparação com o controle de 72 h. Teste *t-student* foi utilizado para comparação entre grupos 24 e 72 h e não houve diferença.

6 DISCUSSÃO

A LV, causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, como *L. infantum*, permanece sendo um sério problema de saúde pública em diversas regiões do mundo, com limitações terapêuticas significativas, especialmente no que se refere à toxicidade e resistência aos fármacos disponíveis (Barbosa *et al.*, 2024). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que combinem eficácia antileishmania e modulação da resposta imune é uma necessidade urgente. O presente estudo avaliou a atividade do GO, um derivado fenólico do ácido gálico, frente às formas amastigotas de *L. infantum* e sua capacidade de influenciar o perfil imunológico de macrófagos infectados.

Os resultados obtidos demonstraram que o GO foi capaz de reduzir de forma significativa tanto a porcentagem de macrófagos infectados quanto o número de amastigotas por célula. Esse achado é de grande relevância, pois as formas amastigotas representam o estágio do parasita adaptado ao ambiente intracelular, o principal desafio no tratamento da LV. Diferentemente das formas promastigotas, que se multiplicam no meio extracelular e são mais acessíveis às drogas, as amastigotas se replicam dentro dos fagolisossomos de macrófagos, onde estão protegidas por barreiras físicas, bioquímicas e imunológicas (Mathison e Bradley, 2023). Essa localização intracelular torna o parasita menos suscetível tanto aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro quanto à ação de fármacos convencionais, como os antimoniais, que demonstram eficácia limitada contra as formas intracelulares (de Santana; Miranda; Carvalho, 2025). Portanto, a atividade antileishmania observada para o GO contra as formas intracelulares evidencia seu potencial como candidato promissor para intervenções terapêuticas mais eficazes.

Além do efeito direto sobre o parasita, o GO também demonstrou uma notável capacidade de estimular o sistema imune inato, especialmente sobre o perfil de citocinas produzido por macrófagos infectados. O tratamento com GO resultou no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias características da resposta Th1, como TNF- α e IL-12, e na redução de citocinas associadas à resposta Th2, como IL-10. Esse estímulo é fundamental, visto que a polarização da resposta imune exerce papel central na resolução ou progressão das leishmanioses.

A resposta Th1 é reconhecida como essencial no controle de infecções por *Leishmania*, pois promove a ativação clássica de macrófagos, levando à produção NO e EROs, que são letais para o parasita (Tiwari *et al.*, 2024). Nesse contexto, TNF- α atua em sinergia com o IFN- γ (produzido por células T) na ativação de mecanismos antileishmania, enquanto a IL-12 estimula

a diferenciação de células T CD4+ em células Th1, perpetuando uma resposta protetora. Em contraste, a resposta Th2 é frequentemente associada à suscetibilidade à infecção, pois IL-10 e IL-6 exercem efeitos imunossupressores, inibindo a ativação de macrófagos e promovendo um ambiente permissivo à replicação do parasita (Goto e Mizobuchi, 2023; Tiwari *et al.*, 2024). Assim, o perfil de citocinas induzido pelo GO sugere que, além de agir diretamente sobre o parasito, ele também colabora para o restabelecimento de um ambiente imune mais eficaz, promovendo uma resposta inflamatória favorável à eliminação de *Leishmania*.

Outrossim, o ON desempenha um papel crucial na mediação da morte de parasitas intracelulares, sendo produzido pela atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2), cuja expressão é comumente induzida após infecções patogênicas (Acuña *et al.*, 2022). Desse modo, a ativação de MAP cinases a jusante de receptores de reconhecimento de padrões, como os TLRs, desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na expressão de NOS2, intensificando a produção de ON (Acuña *et al.*, 2022).

A montagem de uma resposta efetiva baseada em ON é determinante para limitar o crescimento e a disseminação do patógeno. Em contrapartida, a ausência dessa resposta favorece a progressão da infecção (Bogdan *et al.*, 2024). Estudos anteriores com outras espécies do gênero *Leishmania* reforçam que o ON atua não apenas na contenção do parasita, mas também na proteção contra danos teciduais decorrentes da infecção (Sebastian *et al.*, 2024).

No presente estudo, observou-se um aumento significativo na produção de ON, em consonância com achados prévios que apontam essa molécula como a principal efetora na morte intracelular do parasita. O referido efeito foi potencializado pela ação do GO, que estimulou a produção de ON por macrófagos infectados. Este aumento está associado a uma resposta pró-inflamatória robusta, caracterizada por elevação nos níveis de IL-12, promotora da resposta Th1 e indutora de TNF- α , que atua sinergicamente com o IFN- γ para intensificar a expressão de iNOS e, consequentemente, a síntese de ON. Tais dados reforçam que o aumento coordenado de ON, IL-12 e TNF- α constitui um eixo crucial para a resposta imune contra a LV (Almeida *et al.*, 2023; Dirkx *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que o uso de compostos que induzem aumento da resposta Th1 e reduz a Th2 representa uma abordagem promissora no tratamento das leishmanioses, sobretudo nas formas viscerais, onde a disfunção imunológica é um dos fatores determinantes para a progressão da doença (Tiwari *et al.*, 2024). Muitos pacientes com LV exibem uma resposta Th2 dominante ou supressão da resposta Th1, dificultando o controle parasitário mesmo com o uso de medicamentos tradicionais (Novais, Amorim e Scott, 2021). Assim, compostos como o GO

, que demonstram capacidade de reverter esse perfil imune *in vitro*, podem representar um avanço significativo na terapêutica da doença (Feuser *et al.*, 2019).

Além disso, o fato do GO ter demonstrado baixa citotoxicidade em estudos anteriores reforça ainda mais sua aplicabilidade, considerando o delicado equilíbrio entre eficácia antiparasitária e menor toxicidade. Sua origem natural e estrutura fenólica ainda conferem vantagens adicionais, como maior estabilidade, biodisponibilidade e potencial sinergismo com outras drogas, características desejáveis em novos candidatos farmacológicos (Feuser *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2022; Saibabu *et al.*, 2020)

Outros derivados do GO também têm sido amplamente investigados por suas propriedades antiparasitárias, especialmente frente a protozoários da ordem *Kinetoplastida*, como *Trypanosoma* e *Leishmania* (Melo *et al.*, 2022; Moraes Alves, de *et al.*, 2020; Steverding *et al.*, 2022). O próprio ácido gálico já demonstrou efeitos significativos contra *L. donovani*, promovendo alterações morfológicas nos parasitas, comprometimento da integridade da membrana e indução de estresse oxidativo (Mehwish *et al.*, 2021). Em modelos *in vitro*, o ácido gálico foi capaz de reduzir a viabilidade de formas amastigotas de *L. amazonenses* com IC₅₀ de 7,2µg/mL . Esses achados reforçam a relevância da estrutura do ácido gálico como um núcleo bioativo com potencial antileishmania (Feuser *et al.*, 2019).

Além disso, ésteres de cadeia curta e média derivados do ácido gálico, como galato de metila, galato de propila e galato de heptila, também têm mostrado atividade antiparasitária. No entanto, o desempenho biológico desses compostos depende fortemente da hidrofobicidade e do comprimento da cadeia alquila, que influenciam sua capacidade de atravessar membranas celulares e alcançar compartimentos intracelulares (Melo *et al.*, 2022; Moraes Alves, de *et al.*, 2020; Steverding *et al.*, 2022). O GO, com uma cadeia intermediária e bom equilíbrio entre solubilidade e permeabilidade, parece reunir propriedades físico-químicas ideais para interagir tanto com o parasita quanto com as estruturas da célula hospedeira, otimizando sua atividade (Feuser *et al.*, 2019).

Em conjunto, os achados deste estudo evidenciam que o GO atua de forma dual contra *L. infantum*: promove a morte das formas intracelulares do parasito e, simultaneamente, estimula a resposta imune inata, favorecendo um perfil Th1. Tais características posicionam o GO como um composto promissor no desenvolvimento de terapias alternativas ou adjuvantes no combate à LV. Estudos adicionais serão necessários para validar esses efeitos em modelos *in vivo* e aprofundar os mecanismos moleculares envolvidos, especialmente quanto à via de sinalização ativada nos macrófagos e à produção de mediadores secundários associados à imunidade protetora.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o GO apresenta atividade antileishmania eficaz contra formas amastigotas de *L. infantum* internalizadas em macrófagos *in vitro*, com potencial mecanismo associado à estimulação da resposta imune do hospedeiro. A ação antileishmania do GO foi acompanhada por uma resposta pró-inflamatória caracterizada pelo aumento de citocinas do tipo Th1 e indução de óxido nítrico, sugerindo uma atuação combinada entre efeito direto sobre o parasito e ativação de vias microbicidas do sistema imune inato. Tais propriedade reforçam sua relevância como um candidato promissor na busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento da LV.

REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I. *et al.* Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601–618, 1 jul. 2021.
- ACUÑA, S. M. *et al.* miR-294 and miR-410 Negatively Regulate Tnfa, Arginine Transporter Cat1/2, and Nos2 mRNAs in Murine Macrophages Infected with Leishmania amazonensis. **Non-Coding RNA 2022, Vol. 8, Page 17**, v. 8, n. 1, p. 17, 6 fev. 2022.
- AHMADI, S. *et al.* An update on Leishmania martinicensis infections: Transmission, clinical characteristics, and treatment. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 27, p. e00386, nov. 2024.
- AKLILU, E. *et al.* Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Ethiopia. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e14344, 1 mar. 2023.
- ALANAZI, A. D.; ALGHABBAN, A. J. Antileishmanial and synergic effects of Rhanterium epapposum essential oil and its main compounds alone and combined with glucantime against Leishmania major infection. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 26, p. 100571, 1 dez. 2024.
- ALMEIDA, F. S. *et al.* Leishmaniasis: Immune Cells Crosstalk in Macrophage Polarization. **Tropical Medicine and Infectious Disease 2023, Vol. 8, Page 276**, v. 8, n. 5, p. 276, 15 maio 2023.
- ALSHahrani, N. Z.; Alarifi, A. M.; Assiri, A. M. Neglected Tropical Diseases (NTDs) in Saudi Arabia: Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2025.
- ALVAR, J.; BOER, M. DEN; DAGNE, D. A. Towards the elimination of visceral leishmaniasis as a public health problem in east Africa: reflections on an enhanced control strategy and a call for action. **The Lancet Global Health**, v. 9, n. 12, p. e1763–e1769, 1 dez. 2021.
- ANDRADE, N. R. N. DE *et al.* Judicialização do direito à saúde com foco em doenças tropicais negligenciadas: dimensões e desafios no Estado do Piauí, Nordeste do Brasil, 2000-2020. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 28, n. 1, p. 7–22, 6 jan. 2023.
- ANSARI, Z. *et al.* Comprehensive insights into leishmaniasis: From etiopathogenesis to a novel therapeutic approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 204, p. 107535, 1 jul. 2025.
- ARAÚJO, S. A. DE *et al.* Leishmanicidal and immunomodulatory activity of Terminalia catappa in Leishmania amazonensis in vitro infection. **Heliyon**, v. 10, n. 2, p. e24622, 30 jan. 2024.
- ARDESHIRI, H. *et al.* Evaluation the biological effect of niosomal hydrogel base amphotericin in combination with Artemisia sieberi essential oil for treatment of cutaneous leishmaniasis: In vitro and in vivo studies. **Results in Chemistry**, p. 102185, mar. 2025.
- AVULOGLU YILMAZ, E.; YUZBASIOGLU, D.; UNAL, F. Investigation of genotoxic effect of octyl gallate used as an antioxidant food additive in in vitro test systems. **Mutagenesis**, v. 38, n. 3, p. 151, 1 maio 2023.

- AYALA, A. *et al.* Advances in Leishmania Vaccines: Current Development and Future Prospects. **Pathogens** **2024**, Vol. 13, Page 812, v. 13, n. 9, p. 812, 20 set. 2024.
- BARBOSA, D. C. S. *et al.* 1,2,4-Oxadiazole Derivatives: Physicochemical Properties, Antileishmanial Potential, Docking and Molecular Dynamic Simulations of Leishmania infantum Target Proteins. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, n. 19, p. 4654, 1 out. 2024.
- BERHE, H. *et al.* The Potential Use of Peptides in the Fight against Chagas Disease and Leishmaniasis. **Pharmaceutics** **2024**, Vol. 16, Page 227, v. 16, n. 2, p. 227, 4 fev. 2024.
- BETHENCOURT-ESTRELLA, C. J. *et al.* Acrylonitrile derivatives: In vitro activity and mechanism of cell death induction against Trypanosoma cruzi and Leishmania amazonensis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 24, p. 100531, 1 abr. 2024.
- BOGDAN, C.; ISLAM, N.-A.-K.; *et al.* The immunomicrotope of Leishmania control and persistence. **Trends in Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 788–804, set. 2024.
- BOGDAN, C.; ISLAM, N. A. K.; *et al.* The immunomicrotope of Leishmania control and persistence. **Trends in Parasitology**, v. 40, n. 9, p. 788–804, 1 set. 2024.
- CASTRO, J. O. *et al.* In vitro leishmanicidal activity of Hancornia speciosa latex against Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Phytomedicine Plus**, v. 4, n. 4, p. 100658, 1 nov. 2024.
- CASTRO, M. D. M. *et al.* Cutaneous leishmaniasis treatment and therapeutic outcomes in special populations: A collaborative retrospective study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. e0011029, 1 jan. 2023.
- CASTRO PEREIRA CHAVES, A. F. DE *et al.* Leishmaniose visceral no Piauí, 2007-2019: análise ecológica de séries temporais e distribuição espacial de indicadores epidemiológicos e operacionais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, n. 1, p. e2021339, 27 abr. 2022.
- CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. **Communications Biology** **2022** **5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 4 abr. 2022.
- COSMA, C. *et al.* Correction: Cosma et al. Leishmaniasis in Humans and Animals: A One Health Approach for Surveillance, Prevention and Control in a Changing World. **Trop. Med. Infect. Dis.** **2024**, 9, 258. **Tropical Medicine and Infectious Disease** **2025**, Vol. 10, Page 74, v. 10, n. 3, p. 74, 12 mar. 2025.
- DIAS, E. AL *et al.* LEISHMANIOSE: REVISÃO DA INTEGRATIVA DA LITERATURA. **Periódicos Brasil. Pesquisa Científica**, v. 3, n. 2, p. 435–449, 29 jul. 2024.
- DING, S. *et al.* Effect and Mechanism of Mycobacterium avium MAV-5183 on Apoptosis of Mouse Ana-1 Macrophages. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 2, p. 885–894, 1 jun. 2024.
- DIRKX, L. *et al.* Long-term hematopoietic stem cells as a parasite niche during treatment failure in visceral leishmaniasis. **Communications Biology** **2022** **5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 25 jun. 2022.

- DOURADO, D. *et al.* Curcumin-loaded nanostructured systems for treatment of leishmaniasis: a review. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 15, p. 37–50, 4 jan. 2024.
- DUARTE, A. G. S. *et al.* An updated systematic review with meta-analysis and meta-regression of the factors associated with human visceral leishmaniasis in the Americas. **Infectious diseases of poverty**, v. 14, n. 1, p. 4, 1 dez. 2025.
- ELAWAD, M. A. *et al.* Natural products derived steroids as potential anti-leishmanial agents; disease prevalence, underlying mechanisms and future perspectives. **Steroids**, v. 193, p. 109196, maio 2023.
- FERNANDES, J. C. R.; ZAMBONI, D. S. Mechanisms regulating host cell death during *Leishmania* infection. **mBio**, v. 15, n. 11, 13 nov. 2024.
- FERRO, R. F. R. *et al.* Distribuição espacial e identificação de áreas prioritárias para vigilância e controle da Leishmaniose Visceral em Parnaíba, Piauí, Brasil. **REVISTA DELOS**, v. 17, n. 59, p. e1929–e1929, 23 set. 2024.
- FEUSER, P. E. *et al.* Increased in vitro leishmanicidal activity of octyl gallate loaded poly(methyl methacrylate) nanoparticles. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 24, n. 5, p. 593–599, 28 maio 2019.
- GETO, A. K. *et al.* Prevalence of human visceral leishmaniasis and its risk factors in Eastern Africa: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Public Health**, v. 12, p. 1488741, 2024.
- GOIS DE LIMA, R. *et al.* Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no Brasil, no período de 2010 a 2019. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 4, p. e6931–e6931, 13 abr. 2021.
- GOTO, Y. Immunomodulation by *Leishmania* parasites: Potential for controlling other diseases. **Parasitology International**, v. 104, p. 102987, fev. 2025.
- GOTO, Y.; MIZOBUCHI, H. Pathological roles of macrophages in *Leishmania* infections. **Parasitology International**, v. 94, p. 102738, 1 jun. 2023.
- GRIENSVEN, J. VAN *et al.* The status of combination therapy for visceral leishmaniasis: an updated review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. e36–e46, 1 jan. 2024.
- GUPTA, D. *et al.* Emerging strategies and challenges of molecular therapeutics in antileishmanial drug development. **International Immunopharmacology**, v. 115, p. 109649, fev. 2023.
- HAMMI, I. *et al.* FcR γ IIA response duality in leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 198, p. 107123, jan. 2025.
- HEMMERT, C. *et al.* Current state of the art of gold complexes as antileishmanial agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 528, p. 216408, abr. 2025.
- KHANDIBHARAD, S.; NIMSARKAR, P.; SINGH, S. Mechanobiology of immune cells: Messengers, receivers and followers in leishmaniasis aiding synthetic devices. **Current Research in Immunology**, v. 3, p. 186–198, 2022.

- KNIGHT, C. A. *et al.* Leishmaniasis: Recent epidemiological studies in the Middle East. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1052478, 2 fev. 2023.
- KOH, C. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Cytokine Networks and the Clinical Outcome of American Teg-Umentary Leishmaniasis: Unveiling Targets for Alternative Therapeutic Interventions. **Pathogens**, v. 14, n. 2, p. 188, 1 fev. 2025.
- KOURIEH, L. *et al.* Molecular diagnosis and epidemiological aspects of cutaneous Leishmaniasis in Aleppo: Current status. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 28, p. e00412, 1 fev. 2025.
- LU, D. *et al.* Investigation of Antiparasitic Activity of Two Marine Natural Products, Estradiol Benzoate, and Octyl Gallate, on Toxoplasma gondii In Vitro. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 841941, 17 mar. 2022.
- MAJOOR, A. *et al.* Leishmaniasis: Strategies in treatment development. **Parasite**, v. 32, p. 18, 2025.
- MAKARANI, N. *et al.* Leishmaniasis: A multifaceted approach to diagnosis, maladies, drug repurposing and way forward. **The Microbe**, v. 6, p. 100239, mar. 2025.
- MATHISON, B. A.; BRADLEY, B. T. Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. **Laboratory Medicine**, v. 54, n. 4, p. 363–371, 5 jul. 2023.
- MEHWISH, S. *et al.* Bioflavonoid-Induced Apoptosis and DNA Damage in Amastigotes and Promastigotes of Leishmania donovani: Deciphering the Mode of Action. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5843, 1 out. 2021.
- MELO, D. S. DE *et al.* Isopropyl Gallate, a Gallic Acid Derivative: In Silico and In Vitro Investigation of Its Effects on Leishmania major. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, 1 dez. 2022.
- MORAES ALVES, M. M. DE *et al.* Gallic and Ellagic Acids Are Promising Adjuvants to Conventional Amphotericin B for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 12, 1 dez. 2020.
- MOTA, W. J. S. *et al.* Classical and innovative drugs for the treatment of Leishmania infections. **Discover public health**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2024.
- MSELLEMU, D. *et al.* Occupational exposure to malaria, leishmaniasis and arbovirus vectors in endemic regions: A systematic review. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 6, p. 100185, 1 jan. 2024.
- NAVARRO, M. *et al.* Zinc from an Essential Element to an Antiparasitic Therapeutic Agent. **ACS Omega**, v. 10, n. 3, p. 2393, 28 jan. 2025.
- NERY, R. L. A. *et al.* Leishmania spp. genetic factors associated with cutaneous leishmaniasis antimony pentavalent drug resistance: a systematic review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, 2024.

- NEVES, M. A. DAS *et al.* Anti-Leishmania activity and molecular docking of unusual flavonoids-rich fraction from Arrabidaea brachypoda (Bignoniaceae). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 259, p. 111629, 1 set. 2024.
- NI, C. *et al.* Identification of octyl gallate, a novel apoptosis-inducing compound for colon cancer therapy, from Sanguisorba officinalis L. by cell membrane chromatography and UHPLC-(Q)TOF-MS/MS. **Heliyon**, v. 10, n. 11, p. e32230, 15 jun. 2024.
- NINA, L. N. DA S. *et al.* Distribuição espaço-temporal da leishmaniose viscer-ral no Brasil no período de 2007 a 2020. **Rev Panam Salud Publica**;47, nov. 2023, v. 47, 2023.
- NOVAIS, F. O.; AMORIM, C. F.; SCOTT, P. Host-Directed Therapies for Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 660183, 26 mar. 2021.
- PAL, R. *et al.* The role of natural anti-parasitic guided development of synthetic drugs for leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115609, 5 out. 2023.
- RIHS, J. B. *et al.* qPCR as a Tool for the Diagnosis of Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Acta Parasitologica** 2024 **70:1**, v. 70, n. 1, p. 1–16, 7 jan. 2025.
- RODRIGUES MONTEIRO, M. *et al.* Visceral Leishmaniasis in an Immunocompetent Patient: A Case Report. **Acta Médica Portuguesa**, v. 36, n. 12, p. 835–840, 23 jun. 2023.
- ROGERS, M. E.; PABLOS, L. M. DE; SUNTER, J. D. Gels and cells: the Leishmania biofilm as a space and place for parasite transmission. **Trends in Parasitology**, v. 40, n. 10, p. 876–885, 1 out. 2024.
- SABBAHI, R. *et al.* Leishmania–sand fly interactions: exploring the role of the immune response and potential strategies for Leishmaniasis control. **Journal of Parasitic Diseases** 2024 **48:4**, v. 48, n. 4, p. 655–670, 13 maio 2024.
- SAHU, R.; RAWAL, R. K. Modulation of the c-JNK/p38-MAPK signaling pathway: Investigating the therapeutic potential of natural products in hypertension. **Phytomedicine Plus**, v. 4, n. 2, p. 100564, 1 maio 2024.
- SAIBABU, V. *et al.* Octyl gallate triggers dysfunctional mitochondria leading to ROS driven membrane damage and metabolic inflexibility along with attenuated virulence in Candida albicans. **Medical Mycology**, v. 58, n. 3, p. 380–392, 1 abr. 2020.
- SALARI, S. *et al.* Global distribution of treatment resistance gene markers for leishmaniasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 8, p. e24599, 1 ago. 2022.
- SALLOUM, T.; TOKAJIAN, S.; HIRT, R. P. Advances in Understanding Leishmania Pathobiology: What Does RNA-Seq Tell Us? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 1 set. 2021.
- SANTANA, M. B. R. DE; MIRANDA, G. O.; CARVALHO, L. P. ATP-binding cassette transporters and drug resistance in cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 107315, fev. 2025a.

- _____. ATP-binding cassette transporters and drug resistance in cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 107315, 1 fev. 2025b.
- SANTATIVONGCHAI, P. *et al.* Synergistic Potentiation of Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Penicillin and Bacitracin by Octyl Gallate, a Food-Grade Antioxidant, in *Staphylococcus epidermidis*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2022.
- SANTOS, G. P. DOS; COELHO, A. C.; REIMÃO, J. Q. The latest progress in assay development in leishmaniasis drug discovery: a review of the available papers on PubMed from the past year. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 1 fev. 2025.
- SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 1 maio 2021.
- SEBASTIAN, P. *et al.* Polyamine-Enriched Exosomes from *Leishmania donovani* Drive Host Macrophage Polarization via Immunometabolism Reprogramming. **ACS Infectious Diseases**, 13 dez. 2024.
- SHEIKH, S. Y. *et al.* A review on potential therapeutic targets for the treatment of leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 100, p. 102863, 1 jun. 2024.
- SIFONTES-RODRÍGUEZ, S. *et al.* Compared Antileishmanial Activity of Clomiphene and Tamoxifen. **Biomedicines 2024, Vol. 12, Page 2290**, v. 12, n. 10, p. 2290, 9 out. 2024.
- SILVA, R. T. C. *et al.* New Palladium(II) Complexes Containing Methyl Gallate and Octyl Gallate: Effect against *Mycobacterium tuberculosis* and *Campylobacter jejuni*. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3887, 1 maio 2023.
- SINGH, N.; SHARMA, A. India should invest in the expansion of genomic epidemiology for vector-borne diseases filariasis, malaria and visceral leishmaniasis that are targeted for elimination. **IJID Regions**, v. 13, p. 100453, 1 dez. 2024.
- SINGH, R. *et al.* Recent Advances in Chemotherapeutics for Leishmaniasis: Importance of the Cellular Biochemistry of the Parasite and Its Molecular Interaction with the Host. **Pathogens 2023, Vol. 12, Page 706**, v. 12, n. 5, p. 706, 12 maio 2023.
- SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Octyl gallate reduces ABC multidrug transporter CaCdr1p expression and leads to its mislocalisation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 497–503, 1 set. 2020.
- SOUSA BRITO, S. P. DE *et al.* Mortalidade por doenças tropicais negligenciadas no Piauí, Nordeste do Brasil: tendência temporal e padrões espaciais, 2001-2018. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, n. 1, p. e2021732, 15 abr. 2022.
- SREEDHARAN, V.; RAO, K. V. B. Protease inhibitors as a potential agent against visceral Leishmaniasis: A review to inspire future study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 102739, 1 jan. 2023.
- STEVERDING, D. *et al.* Gallic Acid Alkyl Esters: Trypanocidal and Leishmanicidal Activity, and Target Identification via Modeling Studies. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5876, 1 set. 2022.

TAMANG, M. D. *et al.* Potentiation of β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Using Octyl Gallate, a Food-Grade Antioxidant. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 266, 1 fev. 2022.

TCHATAT TALI, M. B. *et al.* Current developments on the antimalarial, antileishmanial, and antitrypanosomal potential and mechanisms of action of Terminalia spp. **South African Journal of Botany**, v. 156, p. 309–333, maio 2023.

TEUFEL, L. U.; JOOSTEN, L. A. B.; SANTOS, J. C. DOS. Differential structure and immunomodulatory functions of lipophosphoglycan between Leishmania spp. **Immunology Letters**, v. 268, p. 106885, 1 ago. 2024.

TIWARI, R. *et al.* The development and maintenance of immunity against visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1486407, 2024.

TOM, A. *et al.* Interactions between Leishmania parasite and sandfly: a review. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 6, 6 jan. 2024.

VALIGUROVÁ, A.; KOLÁŘOVÁ, I. Unrevealing the Mystery of Latent Leishmaniasis: What Cells Can Host Leishmania? **Pathogens 2023, Vol. 12, Page 246**, v. 12, n. 2, p. 246, 3 fev. 2023.

WANG, Y. *et al.* Cetuximab-decorated and NIR-activated Nanoparticles Based on Platinum(IV)-prodrug: Preparation, Characterization and In-vitro Anticancer Activity in Epidermoid Carcinoma Cells. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 20, n. 1, p. 371, 1 jan. 2021.

YANG, J. *et al.* Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Antioxidant Octyl Gallate and Its Impact on Gut Microbiome. **Antibiotics**, v. 13, n. 8, p. 731, 1 ago. 2024.

ZHANG, H. *et al.* Progress in antileishmanial drugs: Mechanisms, challenges, and prospects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. e0012735, 1 jan. 2025.