



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL

PASTORA PEREIRA LIMA NETA

**Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* do Oseltamivir e Aciclovir e
seus efeitos em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Leishmania
amazonensis***

TERESINA-PI

2025

PASTORA PEREIRA LIMA NETA

Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* do Oseltamivir e Aciclovir e seus efeitos em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Leishmania amazonensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional/Universidade Federal do Piauí para cumprimento de defesa do Doutorado em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Medicina Veterinária

Linha de Pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves

TERESINA-PI

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

L732a Lima Neta, Pastora Pereira.
Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* do Oseltamivir e Aciclovir e seus efeitos em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Leishmania amazonensis*. / Pastora Pereira Lima Neta. -- 2025.
115 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2025.

“Orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves.”

1. Reposicionamento de fármacos. 2. Citotoxicidade. 3. Imunomodulação. 4. *Tenebrio molitor*. I. Alves, Michel Muálem de Moraes. II. Título.

CDD 636.7089364

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

Avaliação da atividade antileishmania in vitro do Oseltamivir e Aciclovir e seus efeitos em larvas de Tenebrio molitor infectadas com Leishmania amazonensis

Pastora Pereira Lima Neta

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES
Data: 10/02/2025 18:28:52 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves
(Presidente / Orientador) / DMV/ CCA / UFPI

Documento assinado digitalmente
 ANDRÉ LUIS MENEZES CARVALHO
Data: 06/02/2025 17:52:14 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho
(Examinador Externo) CCF/CCS/ UFPI

Documento assinado digitalmente
 LUANNA SOARES DE MELO EVANGELISTA
Data: 10/02/2025 13:39:46 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Luanna Soares de Melo Evangelista
(Examinador Interna) DPM/CCS/UFPI

Documento assinado digitalmente
 MAYARA LADEIRA COELHO
Data: 10/02/2025 17:59:49 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Mayara Ladeira Coelho
(Examinador Externa) FACID WYDEN

Documento assinado digitalmente
 KLINGER ANTONIO DA FRANÇA RODRIGUES
Data: 03/02/2025 19:48:07 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Prof. Dr. Klinger Antônio da França Rodrigues
(Examinador interno) UFDPA

Aos meus pais Francisco Cardoso de Lima e
Joana Soares de Lima, pelo amor incondicional
e o apoio fundamental.

Dedico.

“ O Senhor é o meu Pastor e nada me faltará.”

Salmos 23:

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor infinito concedido a mim, por segurar a minha mão em todos os momentos da minha vida e por estar ao meu lado guiando os meus passos.

Ao meu esposo Wllysses Stanley Santos de Carvalho e ao meu lindo filho Caio Lima Carvalho, por participarem juntos comigo deste processo de aprendizagem e serem o meu suporte para continuar firme com os meus objetivos.

Aos meus amados pais Francisco Cardoso de Lima e Joana Soares de Lima, que são a minha base, por todo os ensinamentos, pelo incentivo dado a mim em todo o percurso deste estudo, vocês são a minha referência de vida.

Aos meus queridos irmãos Raimunda, Lavoisier, Silvana, Zeca, Cardoso e todos os familiares pelo grande apoio, a minha irmã Maria de Fátima que acompanhou de perto essa jornada, tirou muitas dúvidas e muito me ajudou, as minhas irmãs Elizeth e Ivana por serem meu porto em muitos momentos recebendo o Caio, cuidando quando precisei me ausentar, ao meu irmão Denisfran e minha cunhada Ileana por terem me ajudado incondicionalmente no momento mais delicado que passei, ao meu tio Laudemiro que todos os dias me enviou mensagem de coragem e apoio, obrigada por tudo.

À Universidade Federal do Piauí, ao Instituto Federal Ciência e Tecnologia do Maranhão, ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas de Interesse Regional, ao Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais e ao Laboratório Antileishmania por me oportunizar a realização deste doutoramento.

Ao meu orientador Professor Michel Muálem de Moraes Alves, por ter me recebido tão bem e ter me ensinado com muita gentileza não só os protocolos acadêmicos, mas toda a bondade que ele emana em tudo o que faz, sendo minha referência de profissionalismo, sou muito grata pela sua paciência e o seu apoio nesta fase de estudos.

Ao Professor Fernando Aécio de Amorim Carvalho, por sempre disponibilizar muitos ensinamentos, pelo incentivo e pela vivência neste período de muitos conhecimentos, sempre trazendo muitas alegrias e deixando mais leve o convívio no laboratório.

A Professora Maria Christina Muratori, pelos seus ensinamentos maravilhosos, pela oportunidade de ter sido sua aluna e pelo impulso que me proporcionou em cada aula sua, obrigada por ter percebido em mim um potencial que me encorajou a seguir a diante, não posso esquecer do seu cuidado comigo quando enxergou que eu necessitava de um direcionamento.

Agradeço a maravilhosa equipe do laboratório que tanto me ajudou nos experimentos, meus amigos : Paulline pelo apoio incondicional em todos os momentos nos experimentos e fora do nosso ambiente de estudo, Victória Hanna e Bianca pela presença incansável nos experimentos, Rita de Cássia e Carla Germana e a todos que fizeram parte desta conquista.

A Jackellyne Georgia, por ter sido parte fundamental desde a inscrição do processo seletivo da Pós-Graduação até a conclusão deste estudo, obrigada por tudo.

Agradeço a todos os que me ajudaram durante todo o meu percurso acadêmico, que sonharam e torceram comigo, vibraram com as vitórias diárias e me ajudaram a jamais desistir.

Muito Obrigada!

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento disponível atualmente, apresenta alta toxicidade, elevado custo, resistência do parasito, além de dificuldades de adesão dos pacientes por serem de administração parenteral e de longa duração. Devido a isso, a procura por novos fármacos e/ou alternativas terapêuticas é de extrema importância e neste sentido o reposicionamento de fármacos torna-se promissor por possuir vantagens e já terem passado por diversos estudos de segurança e eficácia. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antileishmania, citotóxica, imunomoduladora dos fármacos Oseltamivir (OSV) e Aciclovir (ACV). Para tanto, foram realizados protocolos de atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) brasiliensis*, *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) major*, citotoxicidade sobre macrófagos murinos e eritrócitos de carneiro, bem como avaliação da atividade contra formas amastigotas internalizadas em macrófagos. Foram realizados ensaios de ativação de macrófagos como atividade lisossomal, capacidade fagocítica e avaliação da indução na produção de óxido nítrico em macrófagos, bem como avaliação da toxicidade aguda com os protocolos de melanização, mieloperoxidase e nitrito, diferencial hemocitário, alterações celulares, plasmátócitos infectados e carga parasitária sobre as larvas de *Tenebrio molitor*. As substâncias demonstraram potencial antileishmania; os valores de concentração inibitória média (CI_{50}) do OSV contra as diferentes espécies: *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. infantum* e *L. major* foram: 252,321; 268,161; 29,207 e 143,859 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente e do ACV foram: 25,726; 45,552; 580,741 e 608,981 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As concentrações citotóxicas médias (CC_{50}) do OSV e ACV foram 512,17 e 2568,75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. OSV e ACV reduziram significativamente o percentual de macrófagos infectados, com índice de seletividade (IS) >20. OSV e o ACV causaram aumento da capacidade fagocítica, contudo não exibiram aumento da atividade lisossomal e nem da indução significativa da síntese de óxido nítrico. Quanto à toxicidade aguda, as taxas de sobrevivência das larvas de *T. molitor* foram de 71,43% para o Oseltamivir e 92,86% para o Aciclovir. As taxas de melanização, mieloperoxidase e nitrito apresentaram baixos valores para OSV e ACV comparados com os valores para AnfB. Para o diferencial hemocitário e as alterações celulares a predominância foi granulócitos e plasmátócitos além de aumento com as substâncias, os plasmátócitos ativados apresentaram maiores valores e a carga parasitária diminuiu na presença de OSV e ACV, sendo 5% para o Oseltamivir e 15% para o Aciclovir comparados com a Anfotericina B que foi 16,6%. Os resultados deste estudo são promissores e servem como ponto de partida para a realização de pesquisas posteriores que visem novos fármacos para a terapêutica das leishmanioses.

Palavras-chave: Reposicionamento de fármacos. Citotoxicidade. Imunomodulação. *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The treatment currently available has high toxicity, high cost, parasite resistance, in addition to difficulties in patient adherence due to parenteral and long-term administration. Due to this, the search for new drugs and/or therapeutic alternatives is extremely important, in this sense, the repositioning of drugs becomes promising because it has advantages because they have already undergone several safety and efficacy studies. The aim of this study was to evaluate the antileishmania, cytotoxic, and immunomodulatory activities of the drugs Oseltamivir (OSV) and Acyclovir (ACV). To this end, protocols of anti-leishmania activity were carried out on promastigotes of *Leishmania* (L.) amazonensis, *Leishmania* (V.) brasiliensis, *Leishmania* (L.) infantum and *Leishmania* (L.) major, cytotoxicity on murine macrophages and sheep erythrocytes, as well as evaluation of activity against internalized amastigote forms in macrophages. Macrophage activation assays were carried out such as lysosomal activity, phagocytic capacity and evaluation of induction in nitric oxide production in macrophages, as well as evaluation of acute toxicity with melanization, myelotoxicity and nitrite protocols, hemocyte differential, cellular alterations, infected plasma cells and parasite load on *Tenebrio molitor* larvae. The substances demonstrated anti-leishmania potential; the mean inhibitory concentration (IC₅₀) values of OSV against the different species: *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. infantum* and *L. major* were: 252.321; 268,161; 29.207 and 143.859 µg/mL respectively and the ACV were: 25.726; 45,552; 580.741 and 608.981 µg/mL, respectively. The mean cytotoxic concentrations (CC₅₀) of OSV and ACV were 512.17 and 2568.75 µg/mL, respectively. OSV and ACV significantly reduced the percentage of infected macrophages, with a selectivity index (SI) >20. OSV and ACV caused an increase in phagocytic capacity, but did not exhibit an increase in lysosomal activity or significant induction of nitric oxide synthesis. Regarding acute toxicity, the survival rates of *T. molitor* larvae were 71.43% for oseltamivir and 92.86% for acyclovir. The melanization, myeloperoxide and nitrite rates showed low values for OSV and ACV. For the hemocyte differential and cellular alterations, granulocytes and plasma cells predominate, in addition to an increase with the substances, activated plasma cells presented higher values and the parasite load decreased in the presence of OSV and ACV, being 5% for Oseltamivir and 15% for Acyclovir compared to Amphotericin B, which was 16.6%. The results of this study are promising and serve as a starting point for further research aimed at new drugs for the treatment of leishmaniasis.

Key words: Drug repositioning. Cytotoxicity. Immunomodulation. *Tenebrio molitor*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO DE TESE	22
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1. Leishmanioses	23
3.1.1 O agente etiológico e o ciclo evolutivo	24
3.1.2 Epidemiologia	28
3.1.3 Tratamento convencional das leishmanioses	29
3.2 Reposicionamento de fármaco como alternativas de tratamento.	32
3.3 Modelos animais alternativos	35
4. OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo geral	38
4.2 Objetivos Específicos	38
5. CAPÍTULO 1	39
Avaliação da atividade antileishmania, citotóxica e padrões de ativação de macrófagos do Oseltamivir e Aciclovir	
6. CAPÍTULO 2	67
Avaliação terapêutica do Oseltamivir e Aciclovir em larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>Leishmania amazonensis</i>	

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	104
9. ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Insetos vetores das Leishmanioses	26
Figura 2. Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp	26
Figura 3. Ciclo biológico de parasitos do Gênero <i>Leishmania</i>	27
Figura 4. Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses	30
Figura 5. Estrutura química dos pró-fármacos Aciclovir (A) e Oseltamivir (B)	35
Figura 6. Formas larvais de <i>Tenebrio molitor</i>	36

CAPÍTULO I

Figura 1. Representação gráfica da atividade antileishmania do Oseltamivir e do Aciclovir em diferentes espécies de parasitas leishmania	49
Figura 2. Representação gráfica do efeito citotóxico do Oseltamivir e do Aciclovir contra macrófagos peritoneais murinos	50
Figura 3. Representação gráfica da atividade hemolítica dos antivirais Oseltamivir e Aciclovir.	51
Figura 4. Efeitos de OSV e Anf B (como controle positivo), para avaliar o percentual de macrófagos infectados (A) e o índice de amastigotas internalizadas (B) no tratamento de macrófagos murinos infectados por <i>L. amazonensis</i>	52
Figura 5. Macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 6. Ação do OSV e ACV sobre a atividade fagocítica (A), e atividade lisossomal (B).	55
Figura 7. Produção de óxido nítrico, através da quantificação de nitrito de macrófagos peritoneais murinos tratados com OSV e ACV por 24 h.	56

CAPÍTULO 2

Figura. 1 Percentual de sobrevivência da larva <i>T. molitor</i> exposta ao OSV e ACV.	75
--	----

Figura 2. Viabilidade das larvas de <i>T. molitor</i> .	76
Figura 3. Percentual de sobrevivência da larva <i>T. molitor</i> exposta ao OSV e ACV após infecção com <i>Leishmania amazonensis</i>	76
Figura 4. Níveis de melanização de larvas <i>T. molitor</i> expostas as substâncias OSV, ACV, Anf B nas doses 3 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg.	77
Figura 5. Níveis de melanização de larvas <i>T. molitor</i> após infecção com <i>Leishmania amazonensis</i> e tratadas as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg.	78
Figura 6. Atividade da enzima mieloperoxidase em larvas <i>T. molitor</i> expostas as substâncias OSV, ACV, Anf B nas doses 3 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg.	79
Figura 7. Atividade da enzima mieloperoxidase em larvas <i>T. molitor</i> após infecção com <i>Leishmania amazonensis</i> seguido de tratamento com as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg.	80
Figura 8. Concentração de nitrito em larvas <i>T. molitor</i> expostas as substâncias OSV, ACV, Anf B nas doses 3 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg.	81
Figura 9. Concentração de nitrito em larvas <i>T. molitor</i> após infecção com <i>Leishmania amazonensis</i> e tratamento com as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg	82
Figura 10. Diferencial hemocitário em larvas <i>T. molitor</i> por grupos experimentais com e sem administração das substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg.	83
Figura 11. Diferencial hemocitário em larvas <i>T. molitor</i> por grupos experimentais após infecção com <i>Leishmania amazonensis</i> seguida de tratamento com as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg.	84
Figura 12. Alterações celulares em larvas <i>T. molitor</i> por grupos experimentais com e sem administração das substâncias OSV, ACV e Anf B na dose 30 mg/Kg.	85
Figura 13. Alterações celulares analisadas em larvas de <i>T. molitor</i> por grupos experimentais após infecção com <i>Leishmania amazonensis</i> e tratadas com as substâncias OSV, ACV e Anf B na dose de 30 mg/Kg.	86
Figura 14. Quantificação da carga parasitária utilizando o índice LDU, analisada em larvas de <i>T. molitor</i> por grupos experimentais após infecção com <i>Leishmania</i>	

amazonensis e tratadas com as substâncias OSV, ACV e Anf B na dose de 30 mg/Kg. 87

Figura 15. Micrografias de luz de esfregaços de hemolinfa de *T. molitor* com infecção com *L. amazonensis*, corados por Panótico. 87

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Formas de manifestação da doença e espécies de protozoários relacionadas	25
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 Valores de concentração inibitória média de OSV, ACV e Anf B, nas formas promastigotas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	49
---	----

Tabela 2. Efeito citotóxico sobre células de mamíferos e valores de índice de seletividade calculados para OSV e ACV.	54
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Valores de DL_{50} para as substâncias Oseltamivir (OSV), Aciclovir (ACV) e Anfotericina B (Anf B).....	74
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACV: Aciclovir

CI₅₀ : Concentração inibitória média

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

IS: Índice de Seletividade

IVE: Ivermectina

LC: Leishmaniose Cutânea

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LM: Leishmaniose Mucocutânea

LPG: Glicoconjugado lipofosfoglicano

LPKA: leishmaniose cutânea pós-kala-azar

LT: Leishmaniose Tegumentar

LTA = Leishmaniose tegumentar americana

LV: Leishmaniose Visceral

MPO: Mieloperoxidase

MS: Ministério da Saúde

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrasodium

μM: Micromolar

NET: Neutrophil extracellular traps

NK: Natural killer

NO: Óxido nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

OSV: Oseltamivir

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate-Buffered Saline)

pH: Potencial Hidrogeniônico

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

Sb⁵⁺: Antimonial Pentavalente

SFB: Soro fetal bovino

TGF-β: transformação do crescimento beta

WHO: World Heath Organizat

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, constituindo um grande problema de saúde pública devido à sua alta incidência e letalidade (ALVAR *et al.*, 2012; BENITEZ *et al.*, 2018). A leishmaniose está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas. É endêmica em 99 países, sendo 89 endêmicos para Leishmaniose Cutânea (LC), 80 endêmicos para Leishmaniose Visceral (LV) e 71 endêmicos para as duas formas clínicas: LC e LV. Dos 9 países que notificam 85% dos casos de LC, 3 estão nas Américas: Brasil, Colômbia e Peru. Quatro países concentram 68% dos casos de LV no âmbito mundial: Índia, Sudão, Brasil e Quênia (WHO, 2022).

Em 2022 foram reportados 12 878 novos casos sendo 12.091 (94%) de leishmaniose cutânea e 785 (6%) leishmaniose mucocutânea (WHO, 2022). Apesar do número de casos de leishmaniose nas Américas ter reduzido nos últimos anos, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil o total de notificações permanecem elevados (BRASIL, 2019).

Os tratamentos convencionais para as leishmanioses são onerosos, limitados, pouco seguros e possuem uma gama de efeitos adversos, além de contribuírem para a resistência do parasita o que retarda o tratamento. A anfotericina B, por exemplo, é utilizada mundialmente como principal fármaco no tratamento da doença, porém possui grandes efeitos adversos, como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, além de seu elevado custo (ALIZADEH *et al.*, 2008; ASHFORD, 2000). Uma alternativa que tem surgido para acelerar o processo de validação de novas terapias é o reposicionamento de fármacos. Esse conceito consiste na utilização de fármacos já estabelecidos para o tratamento de novas doenças. Esse processo visa principalmente à redução de

custos e velocidade de desenvolvimento para a validação de um novo medicamento (CHONG, 2007).

O desenvolvimento de um novo fármaco envolve um grande investimento de recursos. Pesquisas revelam que em todo o processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco, os custos chegam a atingir bilhões de dólares e demoram vários anos para serem aprovadas, os financiamentos são ainda mais complexos pois são feitos geralmente por órgão públicos com bastante burocracia e pouca verba, despertando ainda mais a necessidade de se buscar soluções efetivas e baratas (VINCENT RAJKUMAR, 2020; JOURDAN et al., 2020)

Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos consiste no reaproveitamento de um ingrediente farmacêutico ativo que já está no mercado para uma nova indicação. Essa estratégia apresenta muitas vantagens, incluindo ajudar a superar o desgaste no campo da descoberta de novos fármacos (PUSHPAKOM et al., 2018). A história da medicina tem sido marcada por vários exemplos de medicamentos reposicionados. Muitas startups estão totalmente focadas nesse propósito, inclusive revistas científicas são dedicadas a isso (Drug Repurposing, *Rescue*, and Repositioning; MA Liebert Inc., Boston, MA, USA) e tem sido motivos principais em conferências internacionais.

O Oseltamivir (OSV) e o Aciclovir (ACV) são antivirais, sendo o OSV o primeiro inibidor oral seletivo da neuraminidase disponível para a profilaxia e o tratamento da influenza A e B, sendo um pró-fármaco rapidamente hidrolisado via esterases hepáticas a seu metabólito ativo, o carboxilato de oseltamivir. Isso inibe a enzima neuraminidase, que é expressa na superfície do vírus (ESPOSITO, 2015). O ACV possui ação seletiva na inibição da replicação viral e possui baixa toxicidade em células não infectadas do hospedeiro devido a um mecanismo de fosforilação sequencial do ACV, convertendo-o na forma ativa de aciclovir trifosfato (ou trifosfato de aciclovir), que ocorre apenas em células infectadas (LOREGIAN et al., 2001).

Estudos comprovam que a gravidade das leishmanioses em diferentes espécies é causada pela presença do Leishmania RNA Vírus, que faz parte da família viral *Totiviridae* (HARTLEY ET AL., 2012). As espécies em que o vírus é

mais frequentemente encontrado são do subgênero *Viannia*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* que causam lesões mucocutâneas e cutâneas. (HARTLEY ET AL., 2014). Além disso, estudos demonstram o papel do ácido siálico (Sias) e seu derivado neuramínico na infecção por leishmania. Esses compostos são importantes na comunicação celular e na infecção e sobrevivência de patógenos, mais de 20 patógenos podem sintetizar ou capturar Sias de seus hospedeiros e incorporá-los em seus próprios glicoconjugados e derivados (CAVALCANTE et al., 2021)

O oseltamivir atua bloqueando a função da enzima neuraminidase, uma proteína viral crucial para a liberação de novos vírus das células infectadas e para a disseminação da infecção, assim reduzindo a carga viral, limitando a propagação do vírus (Davies, 2010). O fármaco aciclovir (ACV) é um análogo nucleosídeo amplamente utilizado no tratamento de infecções por Herpes-vírus simples (HSV-1 e HSV-2). Sua estrutura é similar à guanossina e seu mecanismo de ação, basicamente, consiste em inibir a DNA polimerase viral (KLYSIK et al., 2018).

Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antileishmania, citotóxico e padrões de ativação de macrófagos do Oseltamivir (OSV) e Aciclovir (ASV), bem como avaliar sua ação terapêutica em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Leishmania (L.) amazonensis*.

2. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO DE TESE

A organização estrutural dessa Tese apresenta a abordagem do reposicionamento dos fármacos Oseltamivir e Aciclovir para possível terapia antileishmania. Dessa forma foi escrita em: Introdução, Revisão de literatura, Capítulo I, Capítulo II, Considerações Finais e Referências. O capítulo I, intitulado “**Avaliação da atividade antileishmania, citotóxica e padrões de ativação de macrófagos do Oseltamivir e Aciclovir.**”, organizado conforme as normas do periódico “Journal of toxicology and environmental health part A: Current issues”, Qualia A3 em Medicina Veterinária e fator de Impacto 1,7 e o capítulo II, intitulado: “**Avaliação terapêutica do Oseltamivir e Aciclovir em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Leishmania amazonensis***” organizado conforme as normas do periódico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leishmanioses

Leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias que apresenta um espectro de diferentes formas clínicas (BARRETT & CROFT, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a leishmaniose está entre as doenças tropicais negligenciadas e emergentes que afetam principalmente regiões pobres ao redor do globo, principalmente países em desenvolvimento, contribuindo para o estabelecimento e manutenção das desigualdades sociais (WHO, 2022).

O termo leishmaniose está relacionado com a condição de adoecer por uma infecção causada por *Leishmania*, e não por o indivíduo estar infectado com o parasito, uma vez que a maioria das pessoas infectadas não desenvolvem nenhum sintoma durante a vida (WHO, 2022).

Parasitas do gênero *Leishmania* são os agentes causadores das leishmanioses. Estes protozoários unicelulares são transmitidos aos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo da fêmea do inseto flebotomíneo infectado (Diptera: Psychodidae). Cerca de 21 espécies de *Leishmania* podem infectar mamíferos e muitas delas podem causar doenças em humanos (READY, 2014).

Dependendo da espécie infectante e da resposta imunológica do hospedeiro (KAYE & SCOTT, 2011), a doença pode se apresentar sob diferentes formas clínicas, tais como: (a) cutânea localizada, caracterizada pela presença de lesões exclusivamente no local da picada do inseto vetor; (b) mucocutânea, com lesões destrutivas na parte superior do trato respiratório; (c) cutânea difusa, com múltiplos nódulos não ulcerados, classicamente refratária aos tratamentos disponíveis; (d) e a visceral, uma forma sistêmica que afeta especialmente nódulos linfáticos, baço, fígado e medula óssea (LAINSON & SHAW, 2005).

3.1.1 O agente etiológico e o ciclo evolutivo

Os agentes etiológicos causadores das Leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania*. Este gênero foi criado em 1903 por Ross, após observações feitas no parasito. Desta forma, taxonomicamente a localização sistemática destes parasitos unicelulares causadores da leishmaniose começa no reino protista, transpassando o filo sarcomastigophora, ordem kinetoplastida, família trypanosomatidae, alcançando o gênero *Leishmania*, e ainda se dividindo nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (ASSIS et al., 2021).

Esses dois subgêneros de *Leishmania* são capazes de causar a doença em humanos. O subgênero *Leishmania* (L.) é composto pelas espécies dos complexos *donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*) e *mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e pelas espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. Já o subgênero *Viannia* é representado pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (SCHMIDT; ROBERTS; JANOBY, 2012)

Segundo a classificação de Lainson e Shaw (1987) o gênero *Leishmania* subdivide-se em dois subgêneros baseado na localização de promastigotas no trato alimentar do inseto. O subgênero *Leishmania* compreende espécies que se desenvolvem na porção anterior e média do intestino, enquanto o subgênero *Viannia* inclui espécies que desenvolvem uma fase prolongada no intestino posterior com migração de flagelados para o intestino médio e anterior do trato alimentar do vetor (BATES, 2007; REAL et al., 2013).

O gênero inclui muitas diversas espécies causadoras das leishmanioses, que divergem na distribuição geográfica, apresentação clínica, risco associado a complicações e resposta ao tratamento (**Quadro 1**) (BALASEGARAM et al., 2012).

Quadro 1. Formas de manifestação da doença e espécies de protozoários relacionadas.

Forma de manifestação da doença	Espécies
Leishmaniose visceral	<i>L.(L.) donovani</i> , <i>L.(L.) infantum chagasi</i>
Leishmaniose cutânea	<i>L. (L.) major</i> , <i>L.(L.) tropica</i> , <i>L.(L.) aethiopica</i> , <i>L.(L.) mexicana</i> , <i>L.(L.) pifanoi</i> , <i>L.(L.) amazonensis</i> , <i>L.(V.) braziliensis</i> , <i>L.(V.) guayanensis</i> , <i>L.(V.) panamensis</i> e <i>L. (V.) peruviana</i>
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) amazonenses</i>
Leishmaniose mucocutânea	<i>L.(V.) braziliensis</i> e <i>L. (V) panamensis</i>

Fonte: Adaptado de Kaye e Scott (2011).

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos de grande importância para a saúde pública, uma vez que são responsáveis pela transmissão de bactérias (como por exemplo *Bartonella* spp), um número de agentes virais causadores de febre do flebotomíneo, meningite de verão, estomatite vesicular e encefalite por vírus Chandipura e parasitas, incluindo *Leishmania* (DEPAQUIT et al., 2010; MAROLI et al., 2013). Acredita-se que aproximadamente 100 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados ou sob suspeita de transmitir este parasito (MAROLI et al., 2013). Os vetores de *Leishmania* são espécies de *Phlebotomus* na África, Ásia e Europa e de *Lutzomyia* na América Central e do Sul (**Figura 1**) (KAMHAWI, 2006; BRASIL, 2017).

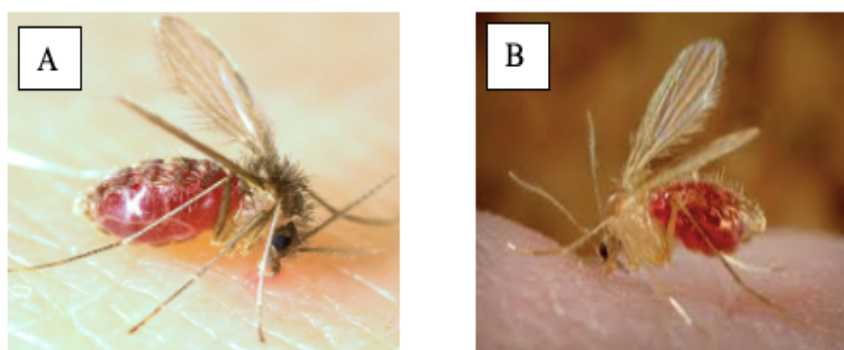


Figura 1. Insetos vetores das Leishmanioses. A) *Lutzomyia longipalpis*. B) *Phlebotomus papatasi*. Fêmeas de se alimentando de sangue em humano. Fonte: A) Wilson (2009); B) Gathany (2006).

Os organismos pertencentes ao gênero *Leishmania* possuem dois estágios morfológicos diferentes durante seu ciclo de vida: 1) Amastigota, presente no interior de células fagocíticas como macrófagos, não possuem motilidade e possuem formato arredondado; 2) Promastigota, presente nos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomya* e *Phlebotomus*, o parasito encontra-se na forma promastigota, caracterizada por apresentar flagelos livres, apresentando capacidade motora, sendo extracelular (CROFT et al., 2003; MARLOW et al., 2013; MOREIRA et al., 2015; TELES et al., 2019). (**Figura 2**).

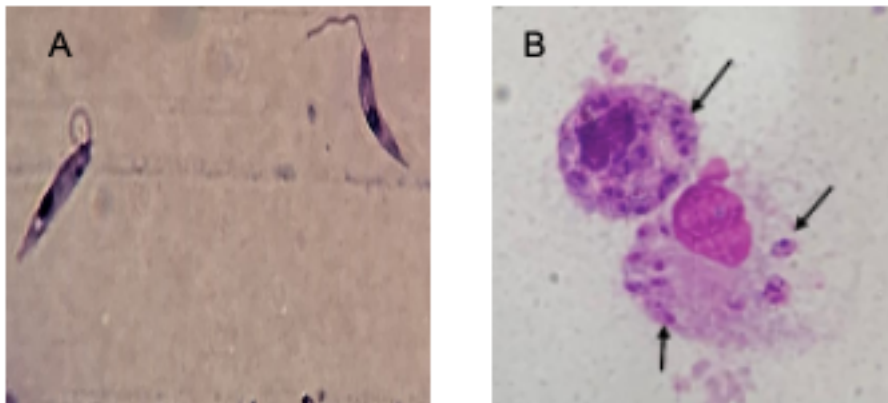
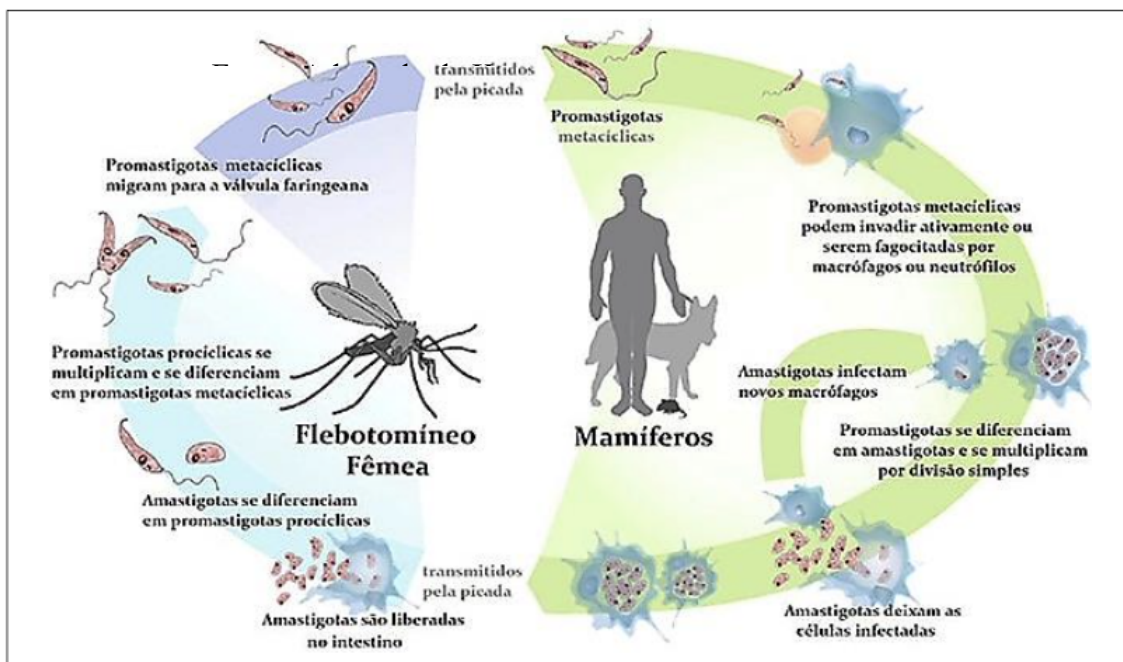


Figura 2. Formas evolutivas de *Leishmania* spp. (A) Formas promastigotas coradas com panótico rápido®. (B) Formas amastigotas internalizadas em macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis*. Aumento 1000x. Fonte: Arquivo pessoal.

As formas infectantes são as promastigotas metacíclicas as quais são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo infectado. Elas são então fagocitadas por macrófagos, onde se transformam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam e, após o rompimento dos macrófagos, invadem novas células, como células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos. Quando um flebotomíneo faz o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, os macrófagos infectados com as amastigotas são ingeridos. As formas amastigotas são posteriormente liberadas das células, transformando-se em promastigotas no intestino médio do inseto. Assim as promastigotas se multiplicam no intestino médio e migram para a probóscide do flebotomíneo, onde se transformam em promastigotas metacíclicas infecciosas. Como mostra os estágios do ciclo de vida na figura 3. Eventualmente, as

promastigotas metacíclicas são regurgitadas no hospedeiro mamífero e o ciclo continua (ZULFIQAR et al., 2017).

Figura 3. Ciclo biológico de parasitos do Gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Harhay et al. (2011)

3.1.2 Epidemiologia

As leishmanioses são caracterizadas como um problema de saúde pública e social negligenciado em vários países (BORGHI et al., 2017). Tal enfermidade tem evidenciado alterações quanto ao perfil epidemiológico nas últimas décadas, o qual vem experienciando um processo de urbanização. Diversos fatores estão envolvidos nesse transcurso, como as alterações ambientais ocasionadas por práticas antrópicas, e, por consequência disso, uma rápida migração e adaptação dos vetores aos centros urbanos. Além desses fatores, pode-se ressaltar a maior susceptibilidade e disponibilidade de reservatórios nesse perímetro (MAIA- ELKHOURY et al., 2008).

São doenças que afetam principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, estando associada à desnutrição, deslocamento populacional,

moradia precária, sistema imunológico fraco e falta de recursos. Dos 200 países e territórios que reportaram à Organização Mundial de Saúde, 99 países e territórios são endêmicos para leishmanioses em 2022. Isso inclui 71 países que são endêmicos para Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Cutânea (LC), 9 países que são endêmicos apenas para Leishmaniose Visceral e 19 países que são endêmicos apenas para Leishmaniose Cutânea. Em 2022, cerca de 85% dos casos globais de LV foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão e 8 países relataram mais de 5.000 casos de Leishmaniose Cutânea: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do), Iraque, Peru e República Árabe Síria, que juntos respondem por 85% da incidência global (WHO, 2022).

Mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas de leishmaniose e correm risco de infecção. Estima-se que 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente (WHO, 2022).

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade infecciosa de natureza variável, muitas vezes assintomática e crônica, que afeta diversas espécies de mamíferos. Na epidemiologia da leishmaniose visceral (LV), o cão é a espécie mais frequentemente infectada, assumindo um papel crucial como principal reservatório do parasita, no entanto, é crucial não negligenciar a possibilidade de infecção em seres humanos e outras espécies animais (MARTINS, et al., 2018).

Dentre os reservatórios envolvidos na transmissão da LV, existem várias espécies de animais silvestres (roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres), sinantrópicos (roedores) e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Com relação a esses últimos, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi esclarecido (BRASIL, 2019). Quanto à transmissão da LV, a principal fonte de infecção na área urbana é o cão (*Canis familiaris*) (SOUZA et al., 2008). Além de cães e outros possíveis reservatórios (roedores, gambás e raposas), foram demonstradas infecções em gatos domésticos (*Felis catus*) (Akhtardanesh et al., 2017; Batista et al., 2020).

Diante do contexto histórico das leishmanioses, observa-se o aumento do número de casos nos últimos 25 anos em todo o mundo, e pode-se inferir que a evolução da doença está intimamente relacionada a vários fatores: a globalização, mudanças climáticas e fatores humanos como urbanização, desmatamento e migração, os quais contribuem para a disseminação da doença em áreas não endêmicas (STEVERDING, 2017)

3.1.3 Tratamento convencional das leishmanioses

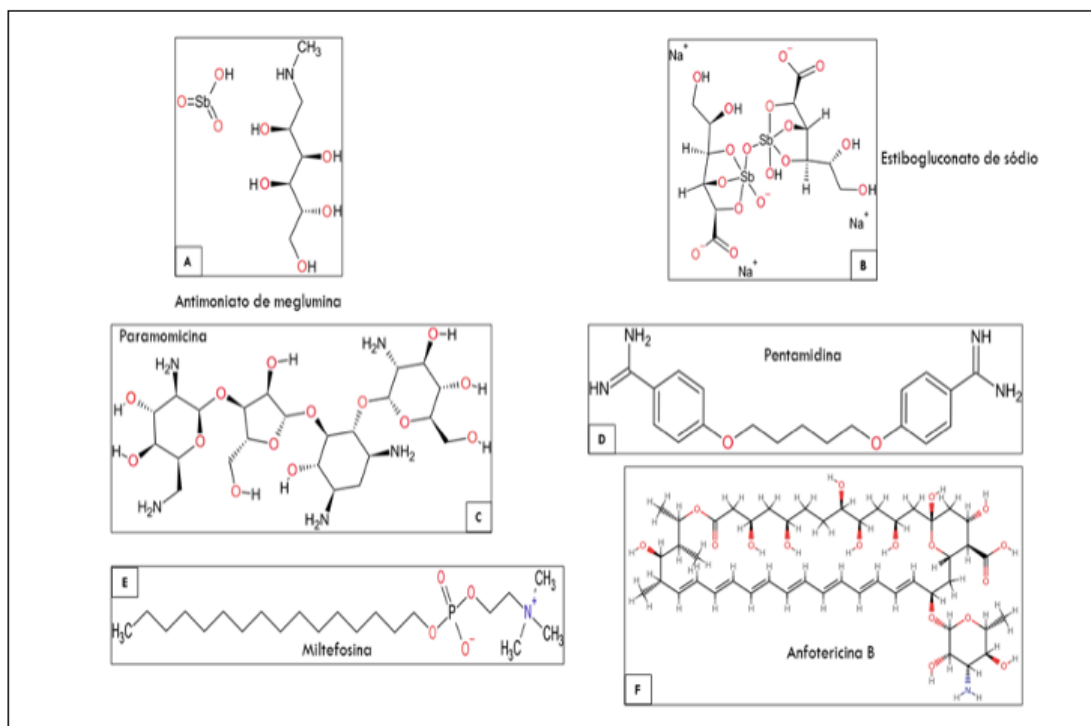
As leishmanioses são doenças com difícil tratamento devido a vários fatores, como a localização do parasito nos mamíferos e também a regulação imunológica do hospedeiro. Uma das maneiras de controle está no tratamento dos casos humanos, que quando eficaz, pode reduzir a prevalência da doença e que deve iniciar logo após o diagnóstico da doença (GARNIER & CROFT, 2002).

A eficácia do tratamento depende não só da espécie de leishmania, mas também da resposta do paciente ao parasito e de fatores como a imunidade. A resposta clínica é variável aos tratamentos, seja pela toxicidade dos fármacos ou resistência aos mesmos (GARNIER & CROFT, 2002). O tratamento contra as leishmanioses tem sido baseado no uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B (AmpB) e sua formulação lipossomal, miltefosina, paramomicina e pentamidinas (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2014; ULIANA et al., 2017; GHORBANI et al., 2018).

Os principais medicamentos utilizados no Brasil e no mundo são os antimoniais pentavalentes, tendo duas versões disponíveis no mercado como o Pentostam[®] (estibogluconato de sódio) que não tem comercialização no Brasil e o antimonato de meglumina, com o nome comercial Glucantime[®] (GLC), que é o fármaco de primeira escolha no Brasil. O seu mecanismo de ação não é completamente elucidado, o mais aceito é que os antimônios pentavalente (Sb^{+5}) são pró-fármacos que requerem redução biológica na forma trivalente (Sb^{+3}) para a sua atividade antileishmania. O local de ação (parasito ou macrófago) e a forma da sua redução (enzimático ou não-enzimático)

permanecem controversos. No entanto, vários estudos relataram que amastigotas axênicas são suscetíveis a sua forma pentavalente, diferente das promastigotas, sugerindo que sua redução seja específica neste estágio do ciclo de vida. Outros estudos observaram sua inibição da biossíntese macromolecular nas vias glicolítica e oxidativa de ácidos graxos nas amastigotas, contudo os alvos específicos nestas vias não foram identificados (Figura 4) (LINDOSO et al., 2012; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; KATO et al., 2014).

Figura 4. Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses



Fonte: Arquivo pessoal

Embora os antimoniais sejam o medicamento de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, seu uso apresenta diversos efeitos adversos, principalmente no final do tratamento. O principal efeito adverso está ligado a problemas cardiovasculares, no entanto, incluem outros sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, artralgias, mialgias, anorexia, elevação dos níveis de enzimas hepáticas, convulsões, pancreatite química e nefrotoxicidade (RIBEIRO et al., 2014).

A segunda opção mais utilizada no Brasil é a Anfotericina B, isso acontece quando o paciente não apresenta melhora ao tratamento com o antimonial, ou é contraindicado em algumas situações como: pacientes acima de 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias, doenças de Chagas e gestantes (ROCHA, et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014, LIMA, et al., 2015).

A anfotericina B é uma potente droga leishmanicida que atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tendo ótimos resultados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. É um antibiótico da classe dos poliênicos, produzido a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. É primariamente uma droga fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp., sendo o seu mecanismo de ação principal a ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) que estão presentes na membrana plasmática da *Leishmania*, levando à formação de poros na membrana e consequente lise osmótica com morte do parasito (LEMKE et al., 2005; WHO, 2022).

O Ministério da Saúde disponibiliza duas apresentações de Anfotericina B: o desoxicolato de anfotericina b e a anfotericina b lipossomal (AmBisome[®]), sendo a eficácia dessas apresentações comparáveis, porém a anfotericina b lipossomal apresenta uma menor toxicidade (MEYERHOFF, 1998).

Mesmo que a Anfotericina B seja uma droga eficaz, seu uso apresenta muitas limitações como custo elevado da medicação, todos os pacientes em tratamento devem ser acompanhados por equipe médica para monitoramento dos efeitos adversos, mesmo após o fim do tratamento. Os principais efeitos apresentados durante o uso da medicação são febre, cefaleia, náusea, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar. Além desses efeitos adversos citados, o desoxicolato de anfotericina b também pode causar anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia e distúrbios de comportamento (GONTIJO et al., 2003, BRASIL, 2014).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é outro medicamento utilizado no tratamento das leishmanioses, sendo, inicialmente, desenvolvido como droga antineoplásica e foi o primeiro medicamento a ser administrado por via oral no

tratamento da Leishmaniose Visceral. Este medicamento é usado em alguns países tanto para o tratamento da Leishmaniose Visceral quanto para a Leishmaniose Tegumentar (SINDERMANN et al., 2004; BHATTACHARYA et al., 2007). Desde 2016, a miltefosina é utilizada como tratamento padrão para leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil (Brasil, 2016).

Apresenta efeitos adversos importantes como nefrotoxicidade, teratogenicidade, e problemas gastrointestinais devido a sua administração por via oral. Também apresenta meia-vida prolongada, que acaba favorecendo a seleção de parasitos resistentes à droga (BHATTACHARYA et al., 2007).

Outro fármaco de segunda escolha é a paramomicina que é um antibiótico aminoglicosídeo, administrado por via intramuscular. A pentamidina que teve sua descoberta na década de 1920, também é utilizado, o seu uso pela primeira vez como tratamento de Leishmaniose visceral foi em 1940, por Kirt e MacDonald. Atualmente é usado como tratamento alternativo para leishmaniose quando o paciente é refratário aos antimoniais pentavalentes. Como mecanismos de ação pode interferir no transporte de aminoácidos, na competição com poliaminas pelos ácidos nucléicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto, assim interferindo na biossíntese de macromoléculas, como DNA, RNA, proteínas e diminuir o potencial da membrana mitocondrial (CROFT et al., 2006; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; SOUZA et al., 2016).

Diante das dificuldades enfrentadas pelos pacientes nos tratamentos preconizados, como o abandono ou a interrupção do mesmo, a resistência dos parasitos aos fármacos utilizados está aumentando e tem se observado em diversas regiões do mundo o aumento do número de casos de recidiva à doença (CROFT et al., 2006; VÉLEZ et al., 2009). Dessa forma, tem-se uma busca contínua por novos compostos que apresentem baixa toxicidade, a fim de desenvolver estratégias terapêuticas alternativas e de baixo custo para o tratamentos das leishmanioses. Os estudos têm se baseado em reposicionamento de fármacos, onde o principal objetivo é utilizar fármacos já comercializados para tratamento de outras doenças, ou em isolar substâncias de plantas e de microrganismos (SANTOS et al., 2008; GUIDO et al., 2010).

Devido aos vários efeitos adversos, aos custos elevados dos medicamentos e da limitação dos fármacos convencionais o reposicionamentos de fármacos apresenta-se como uma alternativa para a descoberta de novas terapias.

3.2 Reposicionamento de fármacos como alternativas de tratamento

Todas as terapias disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses apresentam limitações importantes, quer seja pelo custo ou pela toxicidade (CORRAL et al., 2012; WHO, 2024). Devido às dificuldades do tratamento a OMS incentiva a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, como: reposicionamento de fármacos, associação entre fármacos, rejuvenescimento farmacológico e o uso de produtos naturais (WHO, 2024).

Para as empresas farmacêuticas, o reposicionamento tem um valor comercial significativo, no momento que amplia o mercado de um composto podendo encontrar novos usos para compostos arquivados com um menor risco financeiro e em um menor tempo. Os benefícios do reposicionamento incluem: trabalhar em alvos já conhecidos, disponibilidade de materiais e dados (como em estudos de toxicologia a longo prazo) que podem ser usados e apresentados às autoridades reguladoras, isto resulta em um maior potencial da pesquisa e desenvolvimento em um menor tempo com melhor custo-benefício comparado a uma nova droga (EKINS et al., 2011). O fármaco miltefosina, uma droga utilizada inicialmente para tratamento contra câncer, representa um clássico exemplo de reposicionamento relacionado com as leishmanioses.

Assim, estratégia de reposicionamento tem surgido como uma ótima oportunidade para explorar o potencial da farmacopeia, devido a suas inúmeras vantagens que podem beneficiar os mais diversos setores, como públicos, privados bem como pacientes em todo o mundo. (PADHY, 2011).

O Oseltamivir (OSV) e Aciclovir (ACV) são antivirais, sendo o OSV o primeiro inibidor oral seletivo da neuraminidase disponível para a profilaxia e o tratamento da influenza A e B, sendo um pró-fármaco rapidamente hidrolisado

via esterases hepáticas a seu metabólito ativo, o carboxilato de oseltamivir. Isso inibe a enzima neuraminidase, que é expressa na superfície do vírus (ESPOSITO, 2015), caracterizando esse fármaco com uma importância significativa para tratamento de viroses. O OSV foi desenvolvido pela Gilead Sciences e inicialmente comercializado pela Hoffmann La Roche sob o nome comercial de Tamiflu, para as tais indicações terapêuticas: tratamento da gripe viral e prevenção da gripe de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS).

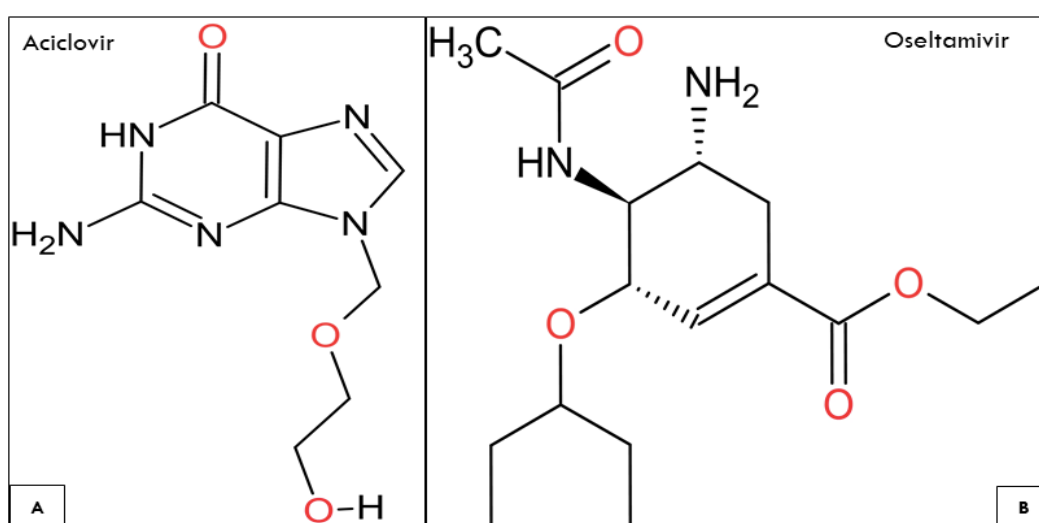
Os medicamentos antivirais são classificados conforme os seus alvos no mecanismo de replicação. Os que agem impedindo o reconhecimento de receptores e a endocitose são os inibidores da hemaglutinina; os que inibem a fusão do envelope viral na membrana celular são os bloqueadores do canal de prótons (M2); os que interrompem a produção de proteínas virais são inibidores das polimerases e os que impedem que os vírus recém-sintetizados possam infectar outras células são os inibidores da neuraminidase (LOREGIAN, *et al.*, 2014).

Os inibidores da neuraminidase (NA) agem interferindo na liberação das partículas virais que se encontram na superfície das células infectadas. Seu mecanismo de ação é baseado na competição com o substrato natural da NA, levando ao bloqueio do sítio ativo da enzima que, por consequência, impede as reações enzimáticas que liberam os vírus e provocam a disseminação da infecção no trato respiratório. (MOSCONA, 2005; NICOLSON *et al.*, 2016).

O Oseltamivir (Tamiflu®) é um pró-fármaco, absorvido no trato gastrointestinal e convertido na sua forma ativa (carboxilato de oseltamivir) no fígado. Sua distribuição se dá através da corrente sanguínea e atinge os locais alvos da infecção (mucosa nasal, pulmão e orelha média). É comercializado como uma cápsula, e administrado por via oral, possuindo uma boa biodisponibilidade. Durante a pandemia de 2009, pesquisas mostraram que esse fármaco se revelou muito eficaz, impedindo complicações e óbitos pelo vírus influenza A e desde 2011 foi disponibilizado pelo Ministério da Saúde um estoque desse antiviral para todos os estados brasileiros em caso de necessidades (SAMSON *et al.*, 2013).

O Aciclovir (ACV) é o pró-fármaco utilizado como tratamento de primeira escolha de infecções por HSV-1 e HSV-2, assim como outros análogos nucleosídeos. O ACV também apresenta atividade contra varicela zoster vírus, citomegalovírus e Epstein Barr vírus. Inicialmente, o ACV foi sintetizado na década de 1970 e revolucionou o desenvolvimento de fármacos no combate a infecções virais. Este fármaco é veiculado em formulações para administração ocular, tópica, oral e intravenosa (**Figura 5**) (KLYSIK et al., 2018; REOLON et al., 2019; SUSANTAKUMAR; GAUR; SHARMA, 2011).

Figura 5. Estrutura química dos pró-fármacos Aciclovir(A) e Oseltamir(B)



Fonte: Arquivo pessoal

O ACV possui ação seletiva na inibição da replicação viral e possui baixa toxicidade em células não infectadas do hospedeiro devido a um mecanismo de fosforilação sequencial do ACV, convertendo-o na forma ativa de aciclovir trifosfato (ou trifosfato de aciclovir), que ocorre apenas em células infectadas (LOREGIAN et al., 2001). A alta seletividade do ACV na inibição da replicação do DNA viral é decorrente da maior captação do princípio ativo pelas células infectadas, mecanismos de fosforilação por meio de uma timidina quinase viral e pela especificidade do aciclovir trifosfato pela DNA polimerase viral. A inibição da DNA polimerase viral pelo aciclovir trifosfato é 10 a 30 vezes mais potente do que a inibição da DNA polimerase humana (KLYSIK et al., 2018).

Como já mostrado, os tratamentos atuais para as leishmanioses possuem limitações importantes e são tóxicos aos pacientes, sendo assim, o reposicionamento de terapias existentes podem apresentar uma redução nos efeitos adversos e também diminuir os custos do tratamento.

3.3 Modelos animais alternativos

O *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), popularmente conhecido como larva-da-farinha, é um inseto holometábolo que passa pelos estádios de ovo, larva, pupa e besouro adulto (**Figura 6**), nos quais a morfologia e composição variam (Kröncke et al., 2023).

Figura 6. Formas larvais de *Tenebrio molitor*.



Formas larvais de *Tenebrio molitor*: larva, pupa e besouro adulto.

Fonte: Arquivo pessoal

A quantidade de estágios larvais também pode variar de 9 a 24, dependendo da influência de fatores como umidade, temperatura e composição do substrato (Kröncke et al., 2023). E o peso da larva de *T. molitor* vai aumentando conforme o avanço do estágio larval (Yu; He; Wang, 2021).

O ciclo de vida de *T. molitor* dura entre 280-630 dias, a depender das condições de produção. Inicia-se com a oviposição 400-500 ovos por cada fêmea, e estes variam de 1,7-1,8 mm de comprimento e 0,6-0,7 mm de largura, sendo seu período de incubação de entre uma semana (27 °C) a duas semanas

(25 °C). Após esse período, seguem para a fase larval, que dura entre 90 a 140 dias. Inicialmente as larvas apresentam coloração branca e medem 0,2 cm de comprimento, podendo atingir nesta fase 1 g de peso e 3 cm de comprimento, adquirindo então uma coloração amarela. Passam em seguida à fase de pupa, que apresenta 1 cm de comprimento, e pode durar de 6 (28 °C) a 18 dias (18 °C) (GHALY; ALKOAİK, 2009). Após 15 dias, chegam à fase adulta (besouros), adquirindo uma cor vermelha-acastanhada que aos poucos vai escurecendo até se tornar preta. A última fase pode durar de um a três meses. Diversos fatores ambientais podem influenciar o desenvolvimento de *T. molitor*, tais como temperatura, umidade, alimentação, stress e a presença de patógenos, sendo os principais a temperatura e a umidade relativa (SPANG, 2013).

No que diz respeito a aplicações, o *T. molitor* tem sido um modelo invertebrado popular para estudar virulência fúngica (Lozoya-Pérez et al., 2021). Isso porque o *T. molitor* é capaz de ingerir fungos produtores de micotoxinas e desenvolver respostas imunológicas humorais e celulares a infecções fúngicas e à ação de compostos antifúngicos (Canteri et al., 2018). Além disso, Brai et al. (2023) reportaram que o *T. molitor* é uma alternativa possível para avaliar a toxicidade preliminar de compostos. Isso porque, entre outros resultados, os autores reportaram que a dose letal mediana (DL50) de alguns fármacos administrados às larvas de *T. molitor* mostraram uma boa correlação quando comparada às de ratos e camundongos.

O uso de insetos como modelo experimental apresenta vantagens éticas, logísticas e econômicas em comparação ao uso de outros animais como roedores e coelhos (Trevijano Contador & Zaragoza, 2014). Além de não haver restrições éticas no uso de insetos, o custo de cultivo é menor, se comparado a roedores e outros vertebrados, não requerendo laboratórios sofisticados ou mão de obra especializada. O ciclo biológico é rápido, permitindo experimentos em larga escala em períodos curtos. O *T. molitor* apresenta certas vantagens diante de outros modelos alternativos, como a possibilidade de ser incubado a 37 °C, temperatura que para muitos patógenos é crítica para a expressão de fatores de virulência e ampla disponibilidade comercial (CANTERI DE SOUZA, et al., 2018; DE SOUZA et al., 2015).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antileishmania, citotóxico e parâmetros de ativação de macrófagos do Oseltamivir (OSV) e Aciclovir (ASV) contra formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, bem como avaliar sua atividade terapêutica em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Leishmania amazonensis*.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade antileishmania dos fármacos sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum* e *Leishmania brasiliensis*, utilizando o método colorimétrico da resazurina;

Determinar o potencial citotóxico dos fármacos sobre macrófagos murinos e atividade hemolítica sobre eritrócitos de carneiro;

Avaliar os parâmetros de ativação de macrófagos dos fármacos sobre a atividade lisossomal, capacidade fagocítica, síntese de óxido nítrico;

Determinar a toxicidade aguda e Dose Letal 50 (DL₅₀) sobre larvas de *Tenebrio molitor*;

Avaliar o efeito terapêutico *in vivo* dos antivirais no modelo de infecção experimental em larvas de *Tenebrio molitor*.

5 CAPÍTULO 1

Avaliação da atividade antileishmania, citotóxica e padrões de ativação de macrófagos do Oseltamivir e Aciclovir

Resumo

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento disponível atualmente apresenta alta toxicidade, elevado custo e resistência do parasito. Devido a isso, a procura por novos fármacos é de extrema importância e o reposicionamento de fármacos pode ser uma alternativa para a doença. Objetivou-se avaliar atividades antileishmania, citotóxica e parâmetros de ativação de macrófagos do oseltamivir (OSV) e aciclovir (ACV). As substâncias demonstraram potencial atividade antileishmania; os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) do OSV contra as diferentes espécies: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* foram: 252,321; 268,161; 29,207 e 143,859 µg/mL respectivamente e do ACV foram: 25,726; 45,552; 580,741 e 608,981 µg/mL, respectivamente. As concentrações citotóxicas médias (CC₅₀) do OSV e ACV foram 512,17 e 2568,75 µg/mL, respectivamente. OSV e ACV reduziram significativamente o percentual de macrófagos infectados, com índice de seletividade (IS) >20. Tanto o OSV e o ACV causaram aumento da capacidade fagocítica, contudo não exibiram aumento da atividade lisossomal e nem da indução significativa da síntese de óxido nítrico. Investigações adicionais são necessárias para a avaliação dessas substâncias no modelo de infecção experimental *in vivo*.

Palavras-chave: Antivirais. Antileishmania. Citotoxicidade. Imunomodulação.

Introdução

As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças de curso ou caráter crônicos e infecciosas causadas por um protozoário intracelular obrigatório que pertence a classe Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, transmitida aos hospedeiros definitivos durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Podem acometer pele, mucosa e vísceras, sendo o tipo de acometimento relacionado com a espécie do parasito responsável pela infecção e a resposta imune do hospedeiro infectado (LAINSON; SHAW, 2005; WHO, 2024).

As leishmanioses ocorrem em 92 países distribuídos em quatro, dos seis continentes. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e estão expostas a contrair a doença, com incidência anual de aproximadamente 1 milhão de novos casos de Leishmaniose Tegumentar e 90.000 de pessoas acometidas pela Leishmaniose Visceral, das quais cerca de 20.000 a 30.000 dos indivíduos doentes evoluem para o óbito (ALVAR et al., 2012; CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004; WHO, 2024).

O tratamento das leishmanioses é realizado com antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, miltefosina, estibogluconato de sódio, antimoniato de meglumina e pentamidina (Blanco e Nascimento-Júnior 2017; Kevric et al. 2015). Todas as terapias disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses apresentam limitações importantes, quer seja pelo custo ou pela toxicidade (CORRAL et al., 2012; WHO, 2022). Devido às dificuldades do tratamento a OMS incentiva a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, como: reposicionamento de fármacos, associação entre fármacos, rejuvenescimento farmacológico e o uso de produtos naturais (WHO, 2022).

O desenvolvimento de novos medicamentos demanda tempo e grandes investimentos financeiros e, tendo em vista essa limitação, o reposicionamento

de fármacos tem despertado interesse de pesquisadores, pois é uma estratégia que busca descobrir novas aplicações para um fármaco existente, que não foram previamente referenciadas e que atualmente não são prescritas ou investigadas (BUCKLE et al., 2013)

O Oseltamivir (OSV) é um antiviral, um inibidor oral seletivo da neuraminidase disponível para a profilaxia e o tratamento da influenza A e B, sendo um pró-fármaco rapidamente hidrolisado via esterases hepáticas a seu metabólito ativo, o carboxilato de oseltamivir. Isso inibe a enzima neuraminidase, que é expressa na superfície do vírus (ESPOSITO, 2015).

O aciclovir (ACV) possui ação seletiva na inibição da replicação viral e possui baixa toxicidade em células não infectadas do hospedeiro devido a um mecanismo de fosforilação sequencial, convertendo-o na forma ativa de aciclovir trifosfato (ou trifosfato de aciclovir), que ocorre apenas em células infectadas (LOREGIAN et al., 2001). A alta seletividade do ACV na inibição da replicação do DNA viral é decorrente da maior captação do princípio ativo pelas células infectadas, mecanismos de fosforilação por meio de uma timidina quinase viral e pela especificidade do aciclovir trifosfato pela DNA polimerase viral. A inibição da DNA polimerase viral pelo aciclovir trifosfato é 10 a 30 vezes mais potente do que a inibição da DNA polimerase humana (KLYSIK et al., 2018)

Como já mostrado, os tratamentos atuais para as leishmanioses possuem limitações importantes e alguns podem ser tóxicos aos pacientes, sendo assim, o reposicionamento de terapias existentes podem apresentar uma redução nos efeitos adversos e também diminuir os custos do tratamento, além de apresentar baixa toxicidade em células não infectadas.

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar atividades antileishmania, citotóxica e parâmetros de ativação de macrófagos do OSV e ACV, como uma nova possibilidade de reposicionamento de fármacos para terapia antileishmania.

Material e Métodos

Local de execução e aquisição dos fármacos.

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Piauí, no Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde – NPPM/CCS/UFPI e Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfofisiologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias (DMV/CCA/UFPI). Os antivirais foram adquiridos da SIGMA Aldrich Brasil.

Parasitas e células

Foram utilizados parasitos da espécie *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania infantum* (MHOM/5745), *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friedlin) e *Leishmania brasiliensis* (10CL566) mantidas no Laboratório de Atividade Antileishmania, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, cultivadas em meio Schneider's (Sigma, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma, EUA) e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg (Sigma, EUA) a 26 °C em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.).

Os macrófagos foram provenientes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, seguido da subsequente eutanásia, esses animais foram mergulhados em álcool 70%, onde a remoção dos macrófagos ocorreu na capela de fluxo laminar com os animais posicionados em decúbito dorsal presos a placa de cortiça, aplicando-se na região abdominal 6 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,4) a 4 °C, estéril. Logo após, realizou-se uma leve massagem na cavidade abdominal e por meio de agulha acoplada a seringa estéril foi feito a aspiração da solução PBS que havia sido injetada.

Toda a amostra retirada foi passada para um tubo cônico de poliestireno com capacidade de 50 mL, sob processo de centrifugação a 100 rpm, durante

10 min. Em seguida, foi lavado três vezes com PBS estéril sob temperatura de 4 °C. A avaliação da viabilidade celular, foi quantificado em Câmara de Neubauer, diluído em corante azul de Trypan (Sigma®).

Para o ensaio de atividade hemolítica, foi coletado sangue de carneiro procedente do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPI) localizado em Teresina, PI, Brasil. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal para apreciação e aprovado sob número nº **750/2022**.

Avaliação da atividade antileishmania contra formas promastigotas

Formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. brasiliensis* e *L. infantum* em fase logarítmica de crescimento foram distribuídas em placas de cultivo (1×10^6 por poço) já contendo o OSV e ACV em diluições seriadas, variando de 800 a 6,25µg/mL. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após esse período foi acrescentado 20 µL resazurina (1mM) na placa e incubada novamente por 6h. Após, a placa foi lida em Leitor de Elisa da marca (Biotek Elx800) a 550nm, para o acompanhamento do crescimento e da viabilidade das leishmanias. (ALVES et al., 2017)

Avaliação de citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos

Em placa de 96 poços foi adicionado cerca de 2×10^5 células por poço com meio RPMI (suplementado com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) e, em seguida, foi incubada a 37°C e 5% de CO_2 por 4 horas para adesão das células à placa. Após, lavagens para retirada das células que não aderiram, foi adicionado o OSV e o ACV diluído em DMSO para um volume final de 100µL para cada poço nas concentrações de 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL, em triplicata e incubadas por 48 horas. Após esse período, foi adicionado 10µL de MTT, diluído em PBS a uma concentração de 5mg/mL (10% do volume; isto é, 10µL para cada 100µL de poço) e incubado novamente por 4 horas em estufa 37°C com 5% de CO_2 . Por fim, o sobrenadante foi descartado e, após isso foi adicionado 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A

placa foi agitada por cerca de 30 minutos no agitador de Kline (modelo AK 0506), à temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Finalizou-se com a leitura a 550nm em leitora de placa. (ALVES et al., 2017)

Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro

Para a avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de carneiro, coletado com anticoagulante (EDTA). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida, foram adicionadas concentrações seriadas dos antivirais, atingindo oito faixas de concentrações [800 a 6,25 µg/mL], diluídas em volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 h a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 1000 G, por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100 % de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média (CH₅₀) considerando o controle positivo como 100 % de hemólise (LÖFGREN et al., 2008).

Investigação dos fármacos em macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*

Os macrófagos foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços numa concentração de 2×10^5 células/poço em 500 µL de RPMI suplementado (com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina), contendo lamínulas redondas estéreis de 13 mm. As placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 4 h para a adesão celular. Os macrófagos aderidos foram então incubados com um novo meio contendo formas promastigotas numa razão de 10 amastigotas para 1 macrófago a 5% de CO₂ e 37 °C, *overnight*. Passado esse período, o meio foi

subsequentemente aspirado para remoção dos parasitas não internalizados. A cultura infectada foi incubada as concentrações correspondentes a 126, 252 e 504 µg/mL (valores determinados após o teste de atividade antileishmania sobre as formas promastigotas do parasito) dos fármacos Oseltamivir e Aciclovir e da Anfotericina B na concentração de 0,2 µg/mL. Após este período, as lamínulas foram removidas e coradas utilizando o panótico rápido® (Laborclin- Brasil). Para cada tratamento, foram contados o número de macrófagos infectados (% de infecção) e a carga parasitária (número de amastigotas sobreviventes) percorrendo os campos das amostras até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando microscopia óptica (CARNEIRO et al., 2012).

Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos

Preparo de soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de DMSO. A solução de extração utilizada para avaliação da capacidade fagocítica e atividade lisossomal constitui-se de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS, já o fixador utilizado foi o de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% (v/v), cloreto de sódio 2% (p/v) e acetato de cálcio 1% (p/v) em água destilada (GRANDO et al., 2009).

Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram infectados por *L. amazonensis* e tratados com as substâncias Oseltamivir e Aciclovir, foram plaqueados e diluídos em meio RPMI suplementado (com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) na quantidade de 2×10^5 por poço em triplicata em placa de 96 poços e incubados, alcançando cinco faixas de concentrações finais [100 a 6,25 µg/mL]. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incubou-

se por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37 °C e adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais. Após 30 min em agitador de Kline a placa foi avaliada no Leitor de Elisa da marca Biotek (ELx800) a 550 nm (GRANDO et al., 2009).

Determinação da capacidade fagocítica

Macrófagos peritoneais foram infectados por *L. amazonensis* e tratados com as substâncias Oseltamivir e Aciclovir, foram plaqueados e diluídos em meio RPMI suplementado (com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) na quantidade de 2×10^5 /poço em placa de 96 poços e incubados, atingindo cinco faixas de concentrações finais [100 a 6,25 µg/mL]. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de zimosan corado e incubou-se por 30 min a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 100 µL de fixador de Baker para interromper o processo de fagocitose e, 30 min depois, a placa foi lavada com salina 0,9% a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de solução de extração e, após solubilização em agitador de Kline, a placa foi lida no Leitor de Elisa da marca Biotek (ELx800) a 550 nm (GRANDO et al., 2009).

Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

Macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* e tratados com os antivirais Oseltamivir e Aciclovir foram plaqueados e diluídos em meio RPMI suplementado (com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) na quantidade de 2×10^5 /poço em placa de 96 poços e incubados. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 100 µL de RPMI e incubou-se novamente as placas nas mesmas condições *Overnight*. Transcorrido 24 h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, os sobrenadantes foram transferidos do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em água Milli-Q® a concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM

diluídos em meio RPMI 1640. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1 % Sulfanilamida em H₃PO₄ 10 % (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1 % naftilenodiamino em água Milli-Q®) e procedeu-se a leitura das absorbâncias na leitora de placa a 550 nm (SOARES et al., 2007; GRANDO et al., 2009).

Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração inibitória médias (CI₅₀), concentração citotóxica média (CC₅₀) com limite de confiança de 95%, foram calculadas utilizando regressão de probitos. O índice de seletividade foi calculado dividindo a CC₅₀ pela CI₅₀. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

Resultados

Avaliação da atividade antileishmania contra diferentes formas promastigotas

Os fármacos OSV e ACV, demonstraram potencial antileishmania, apresentando ação dependente da concentração. Observou-se atividade contra todas as espécies de *Leishmania* testadas. O OSV para as formas promastigotas *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major* apresentou inibição do crescimento acima de 60% na concentração de 800 µg/mL com os valores de 78%, 70%, 75% e 83% respectivamente. Nas concentrações de 400 µg/mL e 200 µg/mL a inibição para as formas promastigotas *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram entre os valores de 50% e 45% e para as formas promastigotas *L. infantum* e *L. major* nessas mesmas concentrações apresentaram valores entre 50% a 70%. O ACV nas concentrações de 800 µg/mL e 400 µg/mL apresentou 100% de inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* e nas concentrações de 200 e 100 µg/mL essa inibição foi acima de 50%, sendo 90% e 88% respectivamente. Já para a forma promastigota *L. braziliensis* a inibição foi de 100% na concentração de 800 µg/mL e nas concentrações de 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL foi acima de 50%. No entanto, nas formas promastigotas de *L. infantum* e *L. major* na concentração de 800 µg/mL a inibição do crescimento foi um pouco acima de 50% apresentando os valores de 52% e 60% respectivamente. (**Figura 1**). Os valores obtidos de CI_{50} do OSV, ACV e Anf B foram de: 252,321; 25,726 e 1,72 respectivamente, (**Tabela 1**).

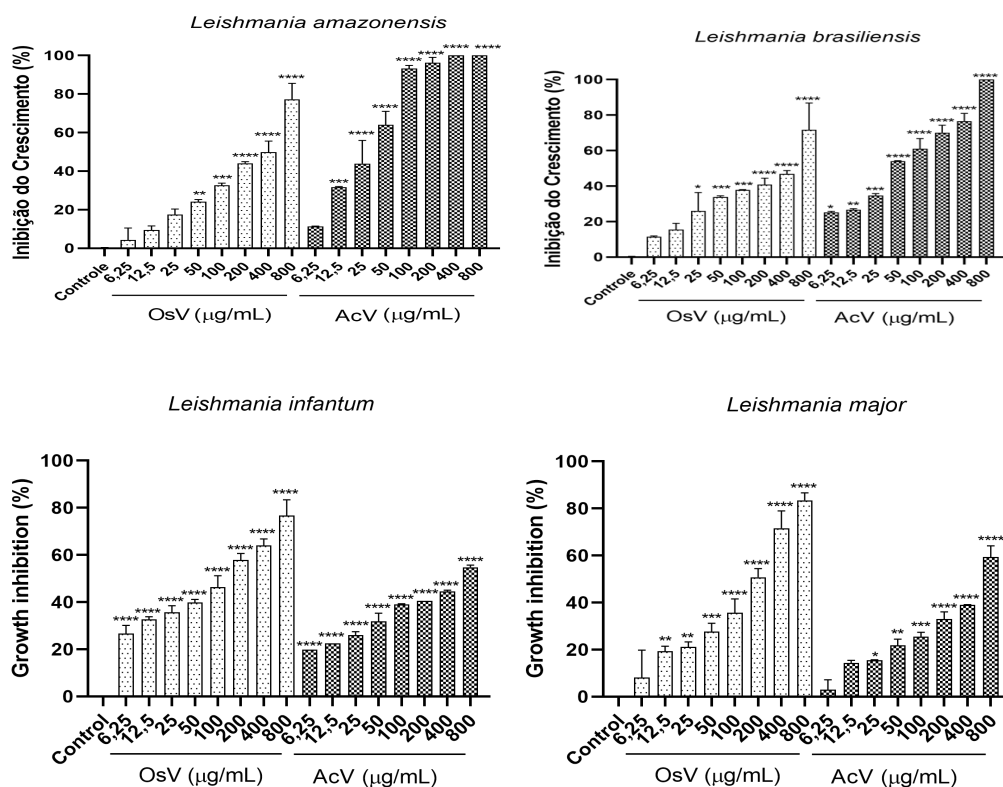


Figura 1. Representação gráfica da atividade antileishmania do Oseltamivir e do Aciclovir em diferentes espécies de *Leishmania*. As cepas foram incubadas por 48 horas na presença de antivirais e a atividade antileishmania foi avaliada pelo método da Resazurina. Significância estatística * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Tabela 1 Valores de concentração inibitória média de OSV, ACV e Anf B, nas formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

Fármacos	<i>L. amazonensis</i> Cl ₅₀ (μg/mL) ^a	<i>L. brasiliensis</i> Cl ₅₀ (μg/mL) ^a	<i>L. infantum</i> Cl ₅₀ (μg/mL) ^a	<i>Lmajor</i> Cl ₅₀ (μg/mL) ^a
Promastigotas				
Oseltamivir	252,321	268,161	29,207	143,859
Aciclovir	25,726	45,552	580,741	608,981
Anfotericina B	1,72	1,74	1,42	0,62

^a Concentração de inibição 50

Avaliação de citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos

Citotoxicidade em macrófagos

Na ação sobre os macrófagos, o OSV apresentou citotoxicidade significativa a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, com valor da CC_{50} de 512,172 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 2**), enquanto o ACV demonstrou uma redução significativa na viabilidade dos macrófagos a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, resultando num valor 2568,747 $\mu\text{g/mL}$ da CC_{50} . (**Figura 2**).

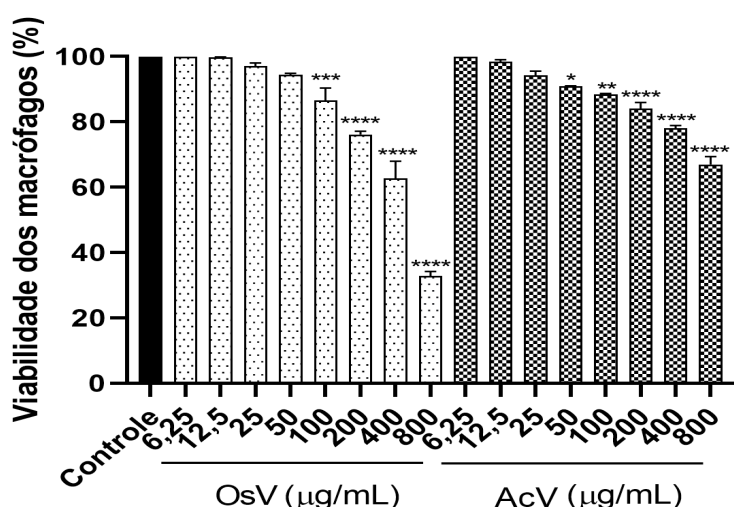


Figura 2. Representação gráfica do efeito citotóxico do Oseltamivir e do Aciclovir contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 h na presença de diferentes concentrações. A viabilidade dos macrófagos foi mensurada pelo sal tetrasólio (MTT). Resultados representam média $\pm$ E.P.M de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controle (C).

Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro

Outra forma de analisar a toxicidade in vitro dos compostos é avaliar a capacidade dos compostos em hemolisar hemácias. Na avaliação do efeito citotóxico das substâncias Oseltamivir e Aciclovir, foi observada citotoxicidade, no entanto houve redução na viabilidade celular tanto para o Oseltamivir como para o Aciclovir nas doses (6,25 a 800 $\mu\text{g/mL}$), sendo a maior na dose (800 $\mu\text{g/mL}$). Porém, não foi possível calcular a CH_{50} para nenhuma das substâncias analisadas (**Figura 3**).

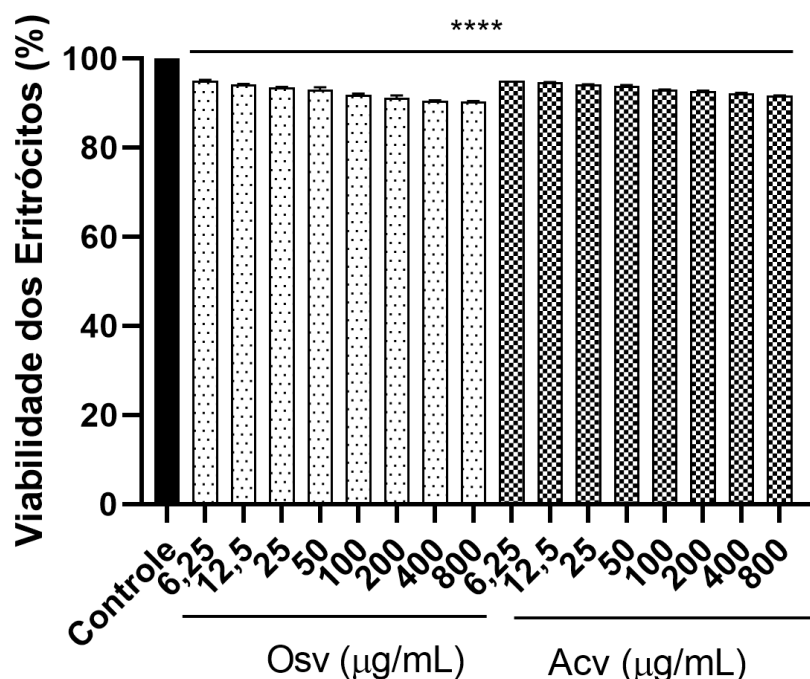


Figura 3. Representação gráfica da atividade hemolítica dos antivirais Osetamivir e Aciclovir. A atividade hemolítica foi avaliada através da incubação de solução de eritrócitos de carneiro a 5%, coletado com anticoagulante (EDTA) e com diferentes concentrações dos antivirais [800 a 6,25 µg/mL] a 37°C por 1 hora. A absorbância foi medida utilizando espectrofotômetro a 550 nm.

Efeitos sobre macrófagos infectados e determinação do Índice de sobrevivência de amastigotas internalizadas e Índice de Seletividade (IS)

O controle obteve 100% de células parasitadas, enquanto a Anf B reduziu esse número para aproximadamente 71%. A redução das células parasitadas tratadas com OSV e ACV foi dependente da concentração utilizada. As células parasitadas e tratadas com OSV apresentaram redução em torno de 58, 45 e 35% nas concentrações 126, 252 e 504 µg/mL, respectivamente. Já as células tratadas com o ACV apresentaram redução de aproximadamente 68, 60 e 58%, nas concentrações correspondentes a 12,5, 25 e 50 µg/mL, respectivamente (Figura 4.A).

Analisando-se a índice de sobrevivência das amastigotas internalizadas, observou-se que o controle obteve em média 14,0 amastigotas/macrófago. A Anf B reduziu essa quantidade de parasitos para aproximadamente 3,8 amastigotas/macrófago. Para o tratamento com OSV, a quantidade de amastigotas reduziu, de forma dependente da concentração, para 3, 2 e 1 amastigotas/macrófagos nas concentrações de 126, 252 e 504 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No tratamento com ACV, a quantidade de amastigotas/macrófago correspondentes a 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente foi de 5,2; 3,8 e 4,0 de amastigotas/macrófago, respectivamente (**Figura 4.B**).

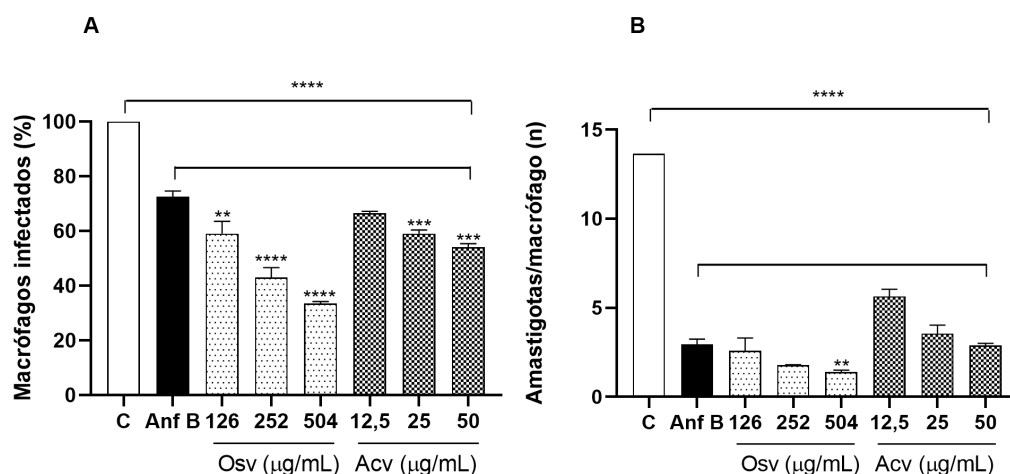


Figura 4. Efeitos de OSV e Anf B (como controle positivo), para avaliar o percentual de macrófagos infectados (A) e o índice de amastigotas internalizadas (B) no tratamento de macrófagos murinos infectados por *L. amazonensis*. As células foram tratadas durante 48 h de incubação com concentrações de 126; 252 e 504 $\mu\text{g/mL}$ de OSV e 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ACV. A Anf B foi utilizada na concentração correspondente a 2 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados representam média $\pm$ E.P.M em experimento realizados em triplicata * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $P < 0,001$

Na avaliação da atividade do Oseltamivir e Aciclovir sobre a forma amastigota intracelular, apresentaram CI_{50} de 5,436 e 6,845 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A Anf B apresentou CI_{50} de 0,20 $\mu\text{g/ml}$ sobre amastigotas internalizadas em macrófagos (**Tabela 2**). Oseltamivir e Aciclovir foram capazes

de reduzir o percentual de macrófagos parasitados por *L. amazonensis* como mostra a figura 5 com as células infectadas.

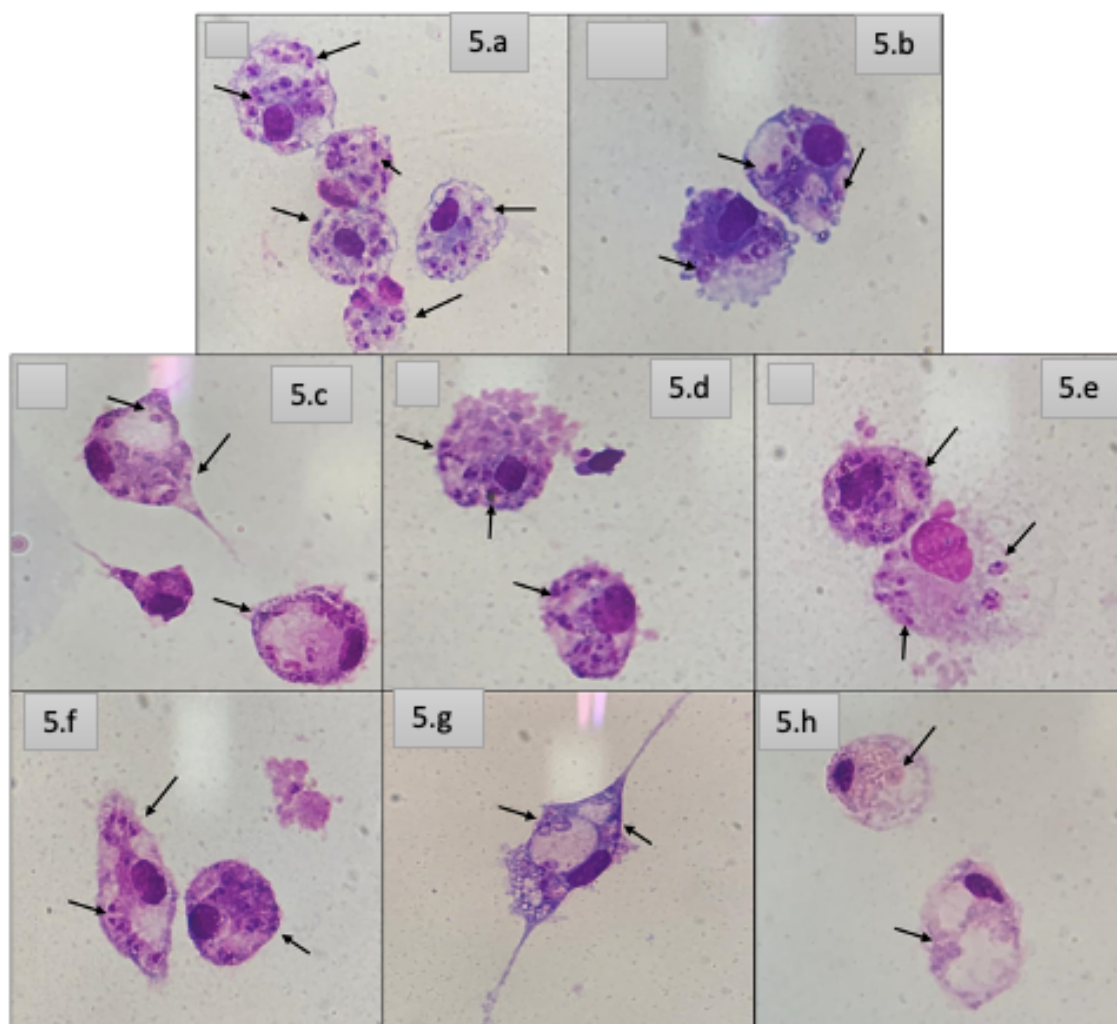


Figura 5. Macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Controle (5.a). Anf B foi utilizada como controle positivo (5.b). Para o tratamento com OSV foram utilizadas as concentrações de 126 (5.c); 252 (5.d) e 504 (5.e) µg/mL. O ACV foi utilizado nas concentrações de 12,5(5.f); 25 (5.g) e 50 (5.h) µg/mL. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Aumento 1000x

Para a determinação do índice de seletividade (IS) que representa o quanto o valor da toxicidade da substância é maior para o parasita do que o macrófago, foram utilizados os parâmetros de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e a atividade sobre a forma amastigota intracelular de

Leishmania amazonensis. O OSV e ACV demonstraram mais seletividade para as formas promastigotas de *L. amazonensis* do que para os macrófagos murinos. Os resultados obtidos para o OSV foi de 94,21 enquanto para o ACV foi de 375,27, ou seja, são mais seletivo para o protozoário do que para as células de mamíferos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito citotóxico sobre células de mamíferos e valores de índice de seletividade calculados para OSV e ACV.

Substâncias	Macrófagos	Amastigotas internalizadas	Índice de seletividade
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>
	CC ₅₀ µg/mL) ^a	(CI ₅₀ µg/mL) ^b	(IS)
Oseltamivir	512,17	5,436	94,21
Aciclovir	2568,75	6,845	375,27
Anfotericina B	8,75 ^c	0,20	43,75

^aConcentração citotóxica 50

^bConcentração inibitória 50

^cAlves et al. (2017)

Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos

Ativação da Capacidade Fagocítica e Atividade Lisossomal

Os parâmetros de ativação de macrófagos, tais como a capacidade de fagocitose e o aumento do volume lisossomal foram avaliados com base na retenção de de partículas de Zymozan e de vermelho neutro e pelos macrófagos. Na avaliação da capacidade de fagocitose, as substância testadas OSV e ACV tiveram uma indução significativa, sendo para o OSV nas concentrações de 6,25 e 12,5 (Figura 5.A), já o ACV essa indução foi na concentração de 6,25 (**Figura 6.A**). Com relação ao aumento do volume lisossomal dos macrófagos, tanto o OSV como o ACV não induziram significativamente (**Figura 6.B**).

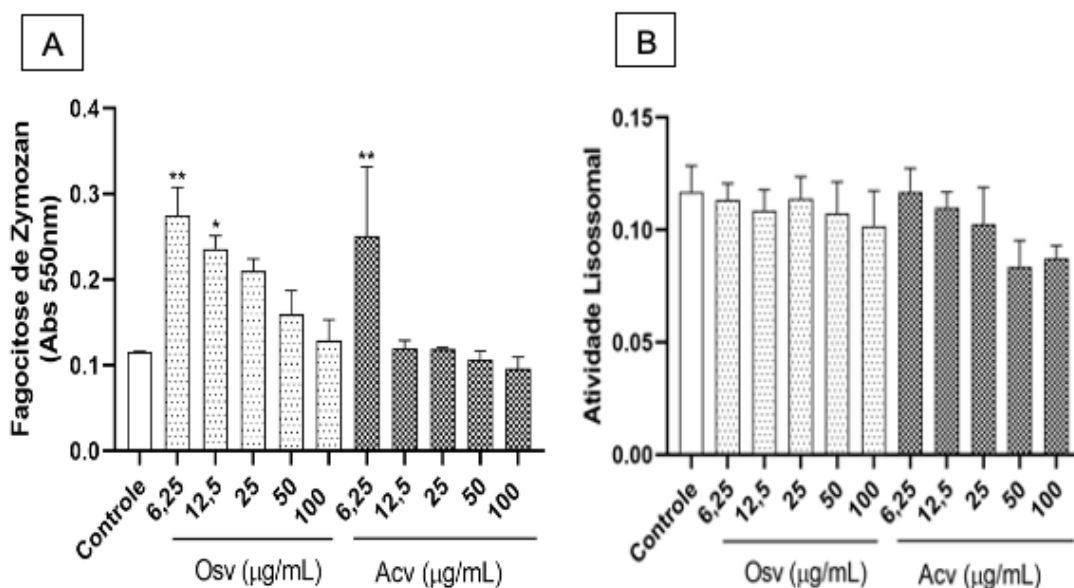


Figura 6. Ação do OSV e ACV sobre a atividade fagocítica (A), e atividade lisossomal (B). Macrófagos peritoneais murinos foram incubados com concentrações seriadas por 48 h. Capacidade fagocítica e volume lisossomal foram analisados por espectrofotometria pela quantificação aumentada pelo corante vermelho neutro, seguida de solubilização pela solução de extração. A fagocitose foi analisada pela incorporação de partículas de Zymozan ao vermelho neutro, solubilizado pela solução de extração. Resultados representam média $\pm$ E.P.M. de três experimentos realizado em triplicata, * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ vs. Controle.

Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO), um índice de ativação de macrófagos, foi quantificada pela análise das concentrações de nitrito através da incubação de macrófagos com as substâncias OSV e AC, Analisando o resultado, observou-se que nenhuma das substâncias demonstrou aumento significativo da síntese de nitrito, em todas as concentrações testadas (**Figura 7**).

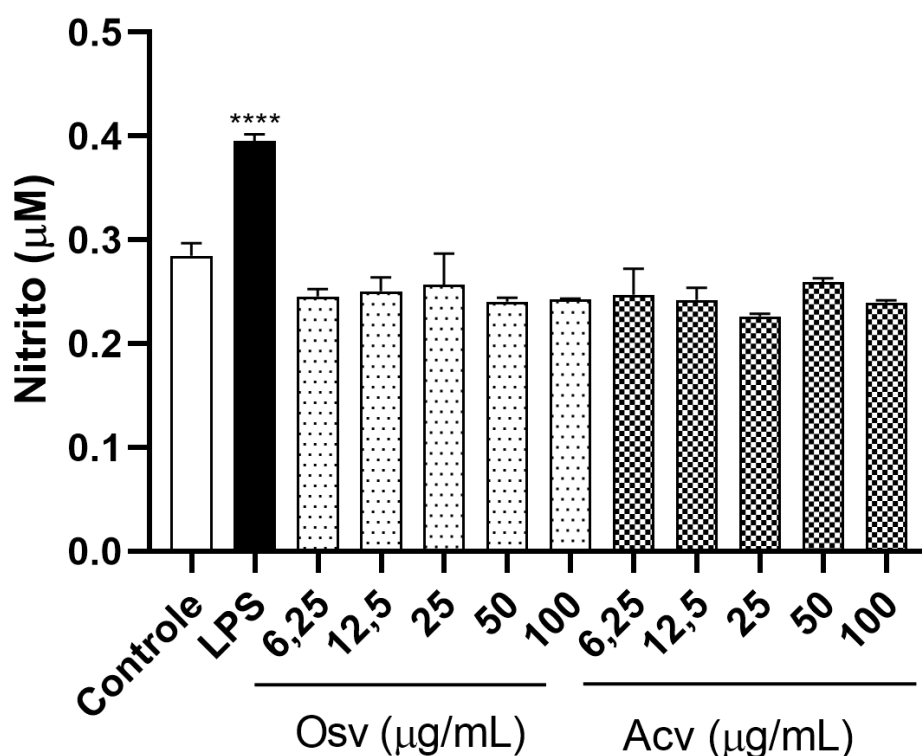


Figura 7. Produção de óxido nítrico, através da quantificação de nitrito de macrófagos peritoneais murinos tratados com OSV e ACV por 24 h. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi misturado em partes iguais com o reagente de Griess. LPS – lipopolissacarídeo bacteriano (2 µg/mL). * P < 0,05; ** P < 0,01; *** p < 0,001; ****P < 0,001

Discussão

Todas as terapias disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses apresentam limitações importantes, quer seja pelo custo ou pela toxicidade (CORRAL et al., 2012; WHO, 2024). Devido às dificuldades do tratamento a OMS incentiva a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, como: reposicionamento de fármacos, associação entre fármacos, rejuvenescimento farmacológico e o uso de produtos naturais (WHO, 2024).

O reposicionamento de fármacos consiste na busca de novos usos para fármacos aprovados (Andrews et al., 2014). Casos de reposicionamentos bem sucedidos para tratamento de Leishmanioses incluem a miltefosina, um fármaco

usado no tratamento de câncer (Croft et al., 1996), anfotericina B, antifúngico altamente utilizado, a pentamidina e o próprio antimônio trivalente, utilizado como agente emético desde a Antiguidade (Sundar et al., 2006). O reposicionamento tradicionalmente tem ocorrido por meio de estudos de triagem *in vitro*, no entanto, métodos de triagem computacional (*in silico*) também podem ser aplicáveis (Ekins et al., 2007).

Estudos anteriores destacaram a relevância do reposicionamento de fármacos para o tratamento contra leishmanioses. Rub et al. (2019) avaliaram a glibenclamida, um medicamento eficaz para redução de açúcar usado no tratamento de diabetes, quanto à sua atividade antileishmania contra *L. donovani*. Os resultados mostraram que a glibenclamida inibiu a viabilidade do parasita, sugerindo seu potencial uso como medicamento no tratamento da leishmaniose visceral. A ivermectina é um agente antiparasitário de amplo espectro comumente usado para o tratamento de infestação por piolhos, sarnas, oncocercose, estrongiloidíase e larva migrans cutânea (Omondi et al., 2018). A ivermectina (IVE) foi testada *in vitro* e *in vivo* contra espécies de *L. infantum*, estudos preliminares sugeriram que a IVE tem como alvo as mitocôndrias do parasita (Reis et al., 2020).

Os medicamentos antivirais são classificados conforme os seus alvos no mecanismo de replicação. Os que agem impedindo o reconhecimento de receptores e a endocitose são os inibidores da hemaglutinina; os que inibem a fusão do envelope viral na membrana celular são os bloqueadores do canal de prótons; os que interrompem a produção de proteínas virais são inibidores das polimerases e os que impedem que os vírus recém-sintetizados possam infectar outras células são os inibidores da neuraminidase (LOREGIAN, et al., 2014).

O oseltamivir é um antiviral muito utilizado no manejo da influenza e pertence à classe dos inibidores da neuraminidase, proteína da superfície viral da influenza A. Este medicamento atua bloqueando a função da enzima neuraminidase, uma proteína viral crucial para a liberação de novos vírus das células infectadas e para a disseminação da infecção, assim reduzindo a carga viral, limitando a propagação do vírus (Davies, 2010).

Duas principais enzimas virais estão envolvidas no processo de infecção: a hemaglutinina e neuraminidase. Ambas as enzimas atuam e reconhecem os resíduos dos ácidos siálicos presentes nas glicoproteínas das células a serem infectadas e induzem a fusão e incorporação do envelope viral da célula. O vírus libera o seu material genético, o RNA que é internalizado com algumas proteínas virais no núcleo, que promovem a duplicação RNA viral e produzem o RNA viral mensageiro (Wilson et al., 1981; Liu et al 1995). O reconhecimento de que as enzimas hemaglutinina e a neuraminidase são de fundamental importância para o sucesso da infecção abre a possibilidade de se interferir na atividade de uma ou de ambas do ciclo de vida do vírus, permitindo o sistema imune ser efetivo contra o vírus (Laver et al., 1999). Devido a esse conhecimento do ciclo de vida do vírus influenza que foi possível a aprovação para o uso do antiviral oseltamivir no tratamento da influenza nos Estados Unidos e Brasil em 1999 e 2000, respectivamente (Wilson et al., 2003).

O aciclovir possui ação seletiva na inibição da replicação viral e possui baixa toxicidade em células não infectadas do hospedeiro devido a um mecanismo de fosforilação sequencial do ACV, convertendo-o na forma ativa de aciclovir trifosfato (ou trifosfato de aciclovir), que ocorre apenas em células infectadas (LOREGIAN et al., 2001). A alta seletividade do ACV na inibição da replicação do DNA viral é decorrente da maior captação do princípio ativo pelas células infectadas, mecanismos de fosforilação por meio de uma timidina quinase viral e pela especificidade do aciclovir trifosfato pela DNA polimerase viral. A inibição da DNA polimerase viral pelo aciclovir trifosfato é 10 a 30 vezes mais potente do que a inibição da DNA polimerase humana (KLYSIK et al., 2018)

Neste estudo o OSV apresentou CI_{50} igual a 252,32 $\mu\text{g/mL}$ enquanto o ACV um valor igual a 25,726 $\mu\text{g/mL}$, dessa forma o ACV demonstrou maior inibição de crescimento para *L. amazonensis* por apresentar um menor valor de CI_{50} .

O OSV apresentou menor citotoxicidade em comparação ao ACV com concentrações citotóxicas médias (CC_{50}) de 512,17 $\mu\text{g/mL}$ e 2568,75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O índice de seletividade para o OSV e ACV apresentou valores de 2,02 µg/mL e 99,85 µg/mL, respectivamente. A determinação do índice de seletividade é feita através da razão entre a CC₅₀ em células de mamíferos e a CI₅₀ nos parasitos, este índice é um importante critério em *Drug Discovery* para selecionar compostos mais promissores contra os parasitos. Os antivirais OSV e ACV, sendo que o ACV apresentou um maior IS do que o OSV, indicando uma melhor relação entre eficácia contra o parasito e segurança para as células hospedeiras demonstraram mais seletividade para as formas promastigotas de *L. amazonensis* do que para os macrófagos murinos. Os índices de seletividade obtidos para o OSV foi de 94,21 enquanto para o ACV foi de 375,27, ou seja, são mais seletivo para o protozoário do que para as células de mamíferos.

Os ensaios toxicológicos *in vitro*, como atividade hemolítica e MTT, são testes preliminares bastante úteis na avaliação da citotoxicidade de compostos e definição da concentração a ser usada em fases posteriores no desenvolvimento de drogas (LUSTOSA et al., 2016). Com base nos ensaios realizados, OSV foi a substância que apresentou o maior potencial citotóxico sobre os macrófagos murinos, com CC₅₀ de 512,17 µg/mL e o ACV o menor, com CC₅₀ de 2568,75 µg/mL. No entanto, não foi possível determinar a CH50 para as amostras nas concentrações analisadas.

Amastigotas intracelulares apresentam relevância clínica, devido a isso são importantes para teste de novos fármacos, pois são encontradas no hospedeiro vertebrado. Para este estudo foram realizados ensaios experimentais com macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Este modelo experimental *in vitro* é o que melhor se adequa à infecção por *Leishmania spp.* em humanos (CARNEIRO et al., 2012), pois os macrófagos desempenham papel central na modulação da resposta imune e são os principais alvos desse parasita (TRINCHIERI, 1997; GORDON, 2003). Dessa forma, as substâncias que são capazes de reduzir o percentual de macrófagos parasitados e o índice de sobrevivência de amastigotas nos macrófagos são consideravelmente promissoras a serem testadas *in vivo* (Alves et al. 2017). Dos fármacos estudados tanto o OSV como o ACV apresentaram atividade antileishmania, sendo que o ACV apresentou maior atividade antileishmania

quando comparado ao OSV, atuando em quase 70% dos macrófagos infectados pelo parasito, na concentração de 12,5 µg/mL.

Sias são monossacarídeos geralmente presentes como resíduos terminais de glicoproteínas e glicolipídios, seja na superfície celular ou secretados (Brinkman-Van der Linder e Varki, 2000). São açúcares ácidos de nove átomos de carbono derivados da molécula básica de ácido neuramínico (Neu), ácido 5-amino-3,5-didesoxi-2-nonulosônico (Schauer et al., 2011).

Sialidases/Neuraminidases são glicosidases que catalisam a remoção de resíduos de Sia ligados α -glicosidicamente em glicoproteínas e glicolipídios (Miyagi e Yamaguchi, 2012).

Sias foram descritos em promastigotas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (Chatterjee et al., 2003; Chava et al., 2004; Ghoshal et al., 2010). Devido à sua posição em resíduos terminais de glicoconjugados, Sias participam da interação entre *Leishmania* e receptores de células hospedeiras (Karmaker et al., 2012).

Analisando as imagens realizadas por microscopia, observa-se que no grupo controle há uma maior concentração de amastigotas em volta do vacúolo parasitóforo, enquanto nos grupos tratados com OSV e ACV observou-se uma diminuição na quantidade dos parasitos, demonstrando assim uma redução da carga parasitária dentro dos macrófagos murinos, o que reforça o potencial antileishmania dessas substâncias.

A imunidade inata exerce um importante papel no controle de infecções, por meio de mecanismos de ação como fagocitose e atividade lisossomal, os quais propiciam ativação de antígenos e eliminação de patógenos (Harrison et al. 2003). Assim, os parâmetros de ativação de macrófagos acarretam em alterações conformacionais para aumentar o desempenho de suas funções, como a locomoção e a fagocitose (Petropolis et al. 2014).

Os compostos OSV e ACV tiveram uma indução significativa da capacidade fagocítica, as melhores concentrações para o OSV foram de 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL e o ACV na concentração de 6,25 µg/mL, esses resultados

indicam um potencial de ativação de mecanismos de defesa dos macrófagos favorecido pelo uso destes fármacos. O Zymosan induz estímulo das células de defesa a produzirem resposta, causando um aumento na produção de IFN e da capacidade fagocítica (Wei et al. 2011), observou-se um aumento nas substâncias em estudo. Com relação ao aumento do volume lisossomal dos macrófagos, tanto o OSV como o ACV não induziram significativamente. Os mesmos também não induziram produção de NO em macrófagos, sugerindo que não há ativação deste mediador pelas células hospedeiras para que os compostos exerçam um efeito letal no parasita.

Isso sugere que a ativação do lisossomo e a produção de NO pelos macrófagos infectados pode não ser a principal via de atuação imunomoduladora desses fármacos, podendo estar associada a outros mecanismos.

Siglecs são proteínas transmembranares do tipo 1 compostas de um domínio semelhante a Ig V-set amino-terminal, com números variáveis (1 a 16) de domínios semelhantes a Ig C2 (Crocker et al., 2007). O domínio V terminal é responsável pela ligação a Sias, que parece ser o único ligante para esses receptores (Angata et al., 2004; Crocker et al., 2007). Estudos demonstraram a importância da interação entre os macrófagos Siglecs 1 e 5 e *Leishmania* Sias na fagocitose do parasita e na sobrevivência intracelular (Karmakar et al., 2012; Roy e Mandal, 2016; Van Bockstal et al., 2020).

A interação mediada por Sias entre *Leishmania* e macrófagos *in vitro* geralmente resulta em resposta de citocina do tipo Th2 dominante (altos níveis de IL-10, IL-4 e TGF β) e menores níveis de ROS e NO nos macrófagos, resultando em maior sobrevivência e replicação de amastigotas intracelulares (Roy e Mandal, 2016). O comprometimento da interação Sias-Siglec pela remoção do parasita Sias ou redução/silenciamento de Siglec dos macrófagos resulta em uma diminuição na resposta Th2 e na carga parasitária (Roy e Mandal, 2016).

Um mecanismo de resistência primária à infecção por *Leishmania* é a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados (Lima-Júnior et al. 2013). No interior do fagolisossomo, o NO reage com $(O_2)^{-2}$, formando uma espécie reativa de oxigênio, o peroxinitrito. A partir daí forma-se o nitrato e nitrito como produto final, que atuam como agentes microbicidas (Bogdan; Rollinghoff 1998; Ueda-Nakamura et al. 2006).

Apesar de não ter apresentado indução significativa para a produção de NO, a diminuição de macrófagos infectados e o índice de amastigotas internalizadas podem ter ocorrido devido o aumento da capacidade fagocítica, que foi estimuladas pelas substâncias, já que no fagolisossomo são encontrados hidrolases ácidas e ocorre a maior parte da degradação do conteúdo envolvido.

Considerando-se que a seletividade é um fator importante na busca de um novo candidato a fármaco, as substâncias OSV e ACV apresentaram os valores de 94,21 e 375,27, respectivamente, demonstrando uma maior atividade contra as formas amastigotas do que quando comparado com as formas promastigotas extracelulares. ACV apresentou um maior destaque pela sua elevada seletividade.

Conclusão

As amostras reduziram a viabilidade celular das formas promastigotas, bem como a infecção de macrófagos. Os fármacos apresentaram eficácia na atividade antileishmania, contudo, o ACV apresentou o maior potencial antileishmania sobre as formas promastigotas e o OSV nas formas amastigotas com redução significativa do número de macrófagos infectados, e o índice de amastigotas internalizadas de *L. amazonensis*. Apresentaram baixa citotoxicidade, melhor resposta imunomoduladora, capacidade de ativar macrófagos por meio do aumento da capacidade fagocítica. Outra característica a ser considerada é a seletividade para os parasitas, sendo o ACV o que apresentou maior índice. Dessa forma os antivirais OSV e ACV são promissores para o desenvolvimento de mais estudos para a avaliação do potencial terapêutico das leishmanioses.

Referências

Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern. C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v.7, n.5, 2012.

Alves MMM, Brito LM, Souza AC et al (2017) Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 390: 893-903. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1387-y>

Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases *Int J Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2014; 244:95-111.

Blanco VR, Nascimento-Junior NM (2017) Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. *Rev Virtual Quim* 9 (3): 861-876. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170055>

Bogdan C, Rollinghoff M (1998) The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28: 121-134. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00169-0)

Brinkman-Van der Linden EC, Varki A. (2000). Novos aspectos das especificidades de ligação de Siglec, incluindo a significância da fucosilação e do epítipo sialil-Tn. *Lectinas da superfamília de imunoglobulinas de ligação ao ácido siálico. J. Biol. Chem.* 275 (12), 8625–8632.

Buckle, D. R. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC Recommendations 2013). **Pure Appl. Chem**, v. 85, n. 8, p; 1725–1758, 2013. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REC-12-11-23>

Carneiro, S. M. P., Carvalho, F. A. A., Santana, L. C. L. R., Sousa, A. P. L., Moita-Neto, J. M., Chaves, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts

and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biol. Res.** 45, p. 111-116, 2012.

Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Natures review/microbiology**, v.5, p. 873-882, 2007.

Chatterjee M., Chava AK, Kohla G., Pal S., Merling A., Hinderlich S., et al. (2003). Identificação e caracterização de sialoglicanos séricos adsorvidos em promastigotas de *Leishmania Donovanii*. *Glycobiology* 13 (5), 351–361.

Chava AK, Chatterjee M., Gerwig GJ, Kamerling JP, Mandal C. (2004). Identificação de ácidos siálicos em amastigotas de *Leishmania Donovanii*. *Biol. Chem.* 385 (1), 59–66.

Corral, M.J.; Moreno, I.; Toraño, A.; Domínguez, M.; Alunda, J.M. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 475–482, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.016>

Crocker PR, Paulson JC, Varki A. (2007). Siglecs e seus papéis no sistema imunológico. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (4), 255–266.

Croft SL, Snowdon D, Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 38:1041-7

Davies, B. E. “Pharmacokinetics of Oseltamivir: An Oral Antiviral for the Treatment and Prophylaxis of Influenza in Diverse Populations.” **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 65, no. Supplement 2, 9 Mar. 2010, pp. ii5–ii10, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq015>

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

Ekins S, Ecker GF, Chiba P, Swaan PW. Future directions for drug transporter modelling. *Xeno*. 2007; 37: 1152-70.

Esposito , S. et al. Oseltamivir For Influenza Infection In Children: Risks And Benefits, **Expert Review of Respiratory Medicine**, 2015.

Ghoshal A., Gerwig GJ, Kamerling JP, Mandal C. (2010). Ácidos siálicos em diferentes *Leishmania* Sp., sua correlação com a resistência ao óxido nítrico e respostas do hospedeiro. *Glycobiology* 20 (5), 553–566.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol** 2003; 3:23–35.

Grando, F. C. et al. Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 7, p. 599-605,2009.

Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA, Grinstein S (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23: 6494-6506. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6494-6506.2003>

Laing, R.; Gillan, V.; Devaney, E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends in Parasitology*, v.33 n.6 p.463-472, 2017.

Lainson, R.; Shaw J. J. New World Leishmaniasis. In Cox FEG, Wakelin D., Gillespie SH, Despommier DD. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, **Parasitology**, 10 th ed., ASM Press, London, p. 313-349, 2005.

Laver, W. G.; Bischofberger, N.; Webster, R. G.; *Scientific American* **1999**, 280, 78.

Lima-Junior D, Costa D, Carregaro V et al (2013) Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med* 19: 909-915. <https://doi.org/10.1038/nm.3221>

Liu, C.; Eichelberger, M. C.; Compans, R. W.; Air, G. M.; *J. Virol.* **1995**, 69, 1099.

Lofgren, S. E. *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 2, p. 197-202, 2008.

Loregian, A. *et al.* Separation methods for acyclovir and related antiviral compounds. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 764, n. 1–2, p. 289–311, nov. 2001.

Lustosa, A. K. M. F. Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí, 26p, 2012.

Karmakar S., Bhaumik SK, Paul J., Tripti De T. (2012). Sialoglicanos de superfície celular de *Leishmania Donovanii* regulam a suscetibilidade para invasão de macrófagos mediada por Siglec e sobrevivência de parasitas. *J. Mol. Biochem.* 1, 6–20.

Miyagi T., Yamaguchi K. (2012). Sialidases de mamíferos: papéis fisiológicos e patológicos nas funções celulares. *Glicobiologia* 22 (7), 880–896.

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH (2015) New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatol Clin* 33 (3): 579-593. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>

Klysik, K. *et al.* Acyclovir in the Treatment of Herpes Viruses – a Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, p. 1–18, 2018.

Petropolis DB, Rodrigues JCF, Viana NB, Pontes B, Pereira CFA, Silva-Filho FC (2014) *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. *PeerJ* 2: e317. <https://doi.org/10.7717/peerj.317>

Reis, T. A. R dos *et al.* Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania Infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 221, fev. 2021.

Roy S., Mandal C. (2016). Leishmania Donovanii utiliza ácidos siálicos para ligação e fagocitose em macrófagos por meio da utilização seletiva de Siglecs e prejudica o braço imunológico inato. *PloS Negl. Trop. Dis.* 10 (8).

Roy N, Chakraborty S, Paul Chowdhury B, Banerjee S, Halder K, Majumder S, Majumdar S, Sen PC (2014) Regulation of PKC mediated signaling by calcium during Visceral Leishmaniasis. *PLoS One* 9(10): e110843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110843>

Rub, A., Shaker, K., Kashif, M., et al., 2019. Repurposing glyburide as antileishmanial agent to fight against leishmaniasis. *Protein Pept. Lett.* 26, 371–376.

Schauer R., Srinivasan GV, Wipfler D., Kniep B., Schwartz-Albiez R. (2011). Ácidos siálicos O-acetilados e seu papel na defesa imunológica. *Adv. Exp. Med. Biol.* 705, 525–548.

Soares, D. C. et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitol Int**, v. 56, n. 2, p. 135-139, 2007.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med and Intern Health.* 2001; 6: 849-54.

Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). **Curr Opin Immunol**, 9, p.17–23, 1997.

Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA et al (2010) Anti-Leishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol Int** 55: 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.006>

Van Bockstal L., Bulte D., Van den Kerkhof M., Dirkx L., Mabilhe D., Hendrickx S., et al. (2020). Interferon alfa favorece infecção de macrófagos por espécies de *Leishmania* visceral por meio da regulação positiva da expressão de sialoadesina. *Frente. Immunol.* 11, 1113. 10.3389/fimmu.2020.

Wei WC, Su YH, Chen SS, Sheu JH, Yang NS (2011) GM-CSF plays a key role in zymosan- stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. *Cytokine* 55: 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.03.017>

Wilson, I. A; Skehel, J. J.; Wiley, D. C.; *Nature* **1981**, 289, 366.

Wilson, J.C.; vonItzstein,M.; *Curr. Drugs Targeted:Infect. Disord.* **2003**, 4,389.

World Health Organizaion (WHO). Leishmaniasis fact sheet. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis/>>, Acesso em 20/10/2024.

6. CAPÍTULO 2

Avaliação terapêutica do Oseltamivir e Aciclovir em larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *Leishmania amazonensis*

Resumo

As leishmanioses são zoonoses parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao grupo de doenças tropicais negligenciadas. Os tratamentos convencionais causam efeitos adversos graves, baixa tolerância, desenvolvimento de cepas resistentes, além de serem onerosos. Nesse sentido, o estudo com os antivirais Oseltamivir (OSV) e Aciclovir (ACV) como fármacos reposicionados constitui uma fonte de pesquisa promissora, uma vez que os mesmos possuem características como a inibição da neuraminidase, com potencial terapêutico. Neste trabalho, apresentamos as larvas de *Tenebrio molitor* como modelo alternativo in vivo no estudo antileishmania, sendo infectadas com *Leishmania amazonensis* e tratadas com os antivirais Oseltamivir e Aciclovir e Anfotericina B (Anf B) como controle. Os resultados demonstram a toxicidade dos antivirais na dose de 30 mg/Kg sobre as larvas de *T. molitor* que foram de 100% e DL50 de 2.582,552 e 9.401,247 para OSV e ACV respectivamente. Os antivirais na dose 30 mg/Kg reduziram a pigmentação, a mieloperoxidase (MPO) e o nitrito no tratamento das larvas infectadas. As células predominantes após a administração dos antivirais foram plasmatócitos e granulócitos e as alterações celulares foram mitose, plasmatócitos ativados e plasmatócitos binucleados. Houve redução da carga parasitária nas células infectadas após o tratamento com os antivirais na dose 40 mg/Kg comparadas com o controle que apresentou 4200 LDU, enquanto OSV, ACV e Anf B apresentaram 250; 700 e 900 LDU, respectivamente. Diante destes resultados sugere-se que os antivirais OSV e ACV apresentam características para possíveis drogas na terapêutica de leishmanioses.

Palavras-chave: Antivirais. Atividade antileishmania. Citotoxicidade. Modelo alternativo.

Introdução

As doenças tropicais negligenciadas, prevalentes em regiões tropicais e subtropicais, atingem mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo e estão presentes em cerca de 149 países. Afetam, principalmente, populações que vivem em regiões mais pobres, onde as condições de higiene, alimentação e saneamento básico são mais precárias, e que convivem com vetores infecciosos e animais domésticos (REIS et al., 2016).

As leishmanioses são um conjunto de doenças infectoparasitárias que podem causar sérios danos físicos, cognitivos e socioeconômicos à população e que, embora de grande relevância para a saúde pública, não recebem a devida atenção da indústria farmacêutica e órgãos públicos para o desenvolvimento de pesquisas que visem a descoberta de novos fármacos (SANTOS et al., 2017).

A doença exibe uma variedade de manifestações clínicas, sendo as duas principais a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), e esta, por sua vez, é dividida em quatro subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD) (Goto e Lindoso 2012).

O tratamento das leishmanioses é realizado com antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, miltefosina, estibogluconato de sódio, antimoniato de meglumina e pentamidina (Blanco e Nascimento-Júnior 2017; Kevric et al. 2015). No entanto, o uso desses fármacos requer longos períodos de administração, resultando em efeitos adversos graves, baixa tolerância e desenvolvimento de cepas resistentes ao tratamento, contribuindo para a ineficácia dos regimes terapêuticos, além de apresentarem custos elevados (Bapela et al. 2017; Souza- Silva et al. 2015).

Os fármacos usuais na clínica contra as leishmanioses possuem uma alta toxicidade e os parasitos já apresentam resistências, o que proporciona um quadro de urgência para identificar rapidamente novos fármacos. Uma alternativa para a busca desses fármacos é o reposicionamento de fármacos já usados contra outros protozoários, como o *Plasmodium* spp.; essa poderia ser uma estratégia

viável para acelerar a pesquisa no tratamento e prevenção da leishmaniose (EKINS et al., 2011).

O desenvolvimento de novos medicamentos demanda tempo e grandes investimentos financeiros e, tendo em vista essa limitação, o reposicionamento de fármacos tem despertado interesse de pesquisadores, pois é um estratégia que busca descobrir novas aplicações para um fármaco existente, que não foram previamente referenciadas e que atualmente não são prescritas ou investigadas (BUCKLE et al., 2013).

Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos consiste no reaproveitamento de um ingrediente farmacêutico ativo que já está no mercado para uma nova indicação. Essa estratégia apresenta muitas vantagens, incluindo ajudar a superar o desgaste no campo da descoberta de novos fármacos (PUSHPAKOM et al., 2018).

O Oseltamivir (OSV) e Aciclovir (ACV) são antivirais, sendo o OSV o primeiro inibidor oral seletivo da neuraminidase disponível para a profilaxia e o tratamento da influenza A e B, sendo um pró-fármaco rapidamente hidrolisado via esterases hepáticas a seu metabólito ativo, o carboxilato de oseltamivir. Isso inibe a enzima neuraminidase, que é expressa na superfície do vírus (ESPOSITO, 2015), caracterizando esse fármaco com uma importância significativa para tratamento de viroses. O OSV foi desenvolvido pela Gilead Sciences e inicialmente comercializado pela Hoffmann La Roche sob o nome comercial de Tamiflu, para as tais indicações terapêuticas: tratamento da gripe viral e prevenção da gripe de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS).

Animais vertebrados, como camundongos, são amplamente utilizados em pesquisas científicas e médicas básicas para estudos de patogenicidade microbiana, testes de substâncias de interesse farmacológico, produção de vacinas, avaliação da eficácia de antibióticos e no desenvolvimento de novas terapias. Nos últimos anos, os insetos surgiram como um potencial modelo in vivo para determinar a toxicidade. Os insetos são uma alternativa valiosa para avaliar preliminarmente a toxicidade in vivo e reduzir o número de roedores. De fato, os insetos são prolíficos, baratos e podem ser manipulados mais facilmente.

Além disso, seu uso é menos suscetível a preocupações éticas e não é regulamentado pela legislação nacional.

Com o objetivo de avaliar a atividade terapêutica dos fármacos Oseltamivir e Aciclovir usando larvas de *Tenebrio molitor* como modelo alternativo *in vivo* no estudo antileishmania, aqui analisamos a toxicidade, o diferencial hemocitário e suas alterações celulares e a carga parasitária desses fármacos em larvas de *T. molitor* infectadas com *Leishmania amazonensis*.

Material e Métodos

Local do estudo e considerações éticas

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (LAA/NPPM/UFPI) e Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfofisiologia Veterinária do centro de Ciências Agrárias (DMV/CCA/UFPI), Teresina, estado do Piauí, Brasil

Substâncias utilizadas

O Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%), foi adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de cultura Schneider's, soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos Penicilina e Estreptomicina foram adquiridos da Merk Sigma-Aldrich (Brasil). O antibiótico Anfotericina B (Anf B 90%) e o panótico rápido® foram adquiridos da Cristália (São Paulo, SP). As substâncias Oseltamivir (OSV) e Aciclovir (ACV), foram provenientes da SIGMA Aldrich Brasil. Essas substâncias foram diluídas em solução salina a uma concentração de 80 mg/mL para os experimentos.

Parasitas

As cepas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), utilizadas para avaliação da atividade antiLeishmania, foram provenientes do LAA/NPPM/UFPI. As formas promastigotas foram cultivadas em meio de Schneider's

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e incubadas em estufa demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 26 °C (Carneiro et al. 2012).

Invertebrados

As larvas de *Tenebrio molitor* utilizadas para avaliação da toxicidade aguda foram provenientes do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfofisiologia Veterinária, do Centro de Ciências Agrárias/UFPI, onde foram mantidas em caixas organizadoras de plástico com dimensões de 60 x 40 x 80 cm com água e ração *ad libidum*, em sala fechada com temperatura ambiente de 25°C ± 2°C. Foram selecionadas para o experimento as larvas com peso entre 100 e 200 mg, de cor clara e uniforme, sem sinais de melanização.

Avaliação da toxicidade aguda sobre larvas de *Tenebrio molitor*

Para avaliação da toxicidade aguda foram utilizadas 10 larvas de *T. molitor* para cada concentração testada, em triplicata. As substâncias testadas foram o Oseltamivir (OSV) e o Aciclovir (ACV), Ambos foram aplicados nas larvas no volume de 10 µL nas doses de 3; 30; 300 e 3000 mg/Kg com o auxílio de uma seringa Hamilton (701 N, manômetro 26, Capacidade de 100 µL) na hemocela, no segundo ou terceiro esternito visível acima das patas, na porção ventral. As larvas foram incubadas à temperatura ambiente em placas de petri contendo dieta de criação e o número de larvas mortas foi avaliado após 24h e 48h. Para estabelecer a morte das larvas, realizou-se a verificação visual de cada indivíduo, quanto à presença de melanização e/ou resposta a estímulos físicos após toque suave (De Souza et al. 2015).

Ensaio da Melanina em larvas de *Tenebrio molitor*

Para o ensaio de quantificação do teor de melanização as larvas foram homogeneizadas em 1,5 ml de solução salina. Coletou-se o homogenato e realizou-se a centrifugação desse homogenato a 14600 rpm, por 15 minutos. Posteriormente, foram coletados 100µL do sobrenadante dessa centrifugação e

adicionados em duplicata na microplaca. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro GloMax a 405nm, sendo obtidas as absorbâncias para cada amostra. Este ensaio foi realizado com base nos protocolos de AYRES, (2008) e GORTNER (1910) com adaptações.

Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em larvas de *Tenebrio molitor*

A medida de atividade da mieloperoxidase (MPO) foi realizada pelo método da velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na presença de H_2O_2 . Neste ensaio utilizou-se uma solução tampão fosfato de potássio 0,5% hexadeciltrimetilamônio (HTAB) de pH 6,0. Para a realização da leitura, adicionou-se 10 μ L do sobrenadante do homogenato, em microplaca e 200 μ L da solução de leitura (3 mL de tampão fosfato pH 6, 15 mL de peróxido de hidrogênio a 1%, 5 mg de o-dianisidina, e água destilada em q.s.p. 50mL de solução) em cada poço em duplicata. Foram realizadas duas leituras espectrofotométricas a 450 nm, para a análise da diferença de tempo, uma após 1 minuto da adição da solução e outra 2 minutos depois. Os resultados foram expressos em unidades de MPO por mg de tecido (BRADLEY et al., 1982).

Ensaio de Nitrito por método de Griess em larvas de *Tenebrio molitor*

A concentração de nitrito foi determinada pelo método de Griess como descrito por Green et al (1982). Utilizou-se o sobrenadante do homogenato de larvas de *T. molitor*, que foram desproteinizadas pela adição de solução de sulfato de zinco de acordo com o protocolo de Romitelli et al (2007). Num eppendorf foram adicionados 180 μ L de solução de Sulfato de Zinco ($ZnSO_4$) a 0,15 M, 3 μ L de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 10 M, e 300 μ L da amostra, incubou-se em gelo por 15 minutos e posteriormente foi centrifugado a 14.600 rpm por 10 minutos, e obteve o sobrenadante desproteinizado. Em seguida foram adicionados numa microplaca 100 μ L do sobrenadante desproteinizado em duplicata e 100 μ L do reagente de Griess em cada poço. Após 10 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro GloMax a 560 nm. A obtenção dos resultados foi através da comparação entre a curva de calibração e os valores de absorbância obtidos para a amostra. A curva de

calibração foi realizada pela leitura espectrofotométrica a 560 nm, em diluições seriadas (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 μ M) com solução de Nitrito de Sódio (NaNO_2) a 10 mM. Utilizou-se para o Branco 100 μ L de água destilada e 100 μ L de reagente de Griess.

Ensaio para avaliação de diferencial hemocitário, alterações celulares, plasmatócitos infectados e carga parasitária em larvas de *Tenebrio molitor*

A determinação do diferencial hemocitário, alterações celulares, plasmatócitos infectados e carga parasitária das larvas de *T. molitor*, utilizou-se um número de 10 por grupos, os mesmos foram dispostos em placas de Petri, separados e levados a temperatura de -20°C por 5 minutos, com a finalidade de anestesiá-las. As lâminas de microscopia foram identificadas e após 5 minutos as mesmas foram confeccionadas, para isso inseriu-se a agulha entre os anéis anteriores dorsais das larvas para a obtenção da hemolinfa. Foi feito um “imprint” da larva na lâmina e em seguida um esfregaço curto com auxílio da lamínula 24x50mm ou lâmina extensora. A lâmina secou em temperatura ambiente. A coloração escolhida foi o panótico rápido®. Após a coloração, a lâmina foi lavada em água corrente e seca em temperatura ambiente.

A carga parasitária foi avaliada por meio da contagem direta de parasitas internalizadas em plasmatócitos no esfregaço de hemolinfa, conforme descrito anteriormente e expresso em Unidades Leishman-Donovan (LDU) (Islamuddin et al., 2015). Isso foi calculado multiplicando o número de parasitas por 100 células hematocíticas pelo peso da larva em miligramas.

Análise estatística

As análises de sobrevivência foram determinadas por meio de teste de log-rank e as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier. O nível de significância nos ensaios realizados foi de $p < 0,05^*$ utilizando one way ANOVA e pós teste de Bonferroni. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

RESULTADOS

Avaliação da toxicidade aguda sobre larvas de *Tenebrio molitor*

Analizando os perfis de sobrevivência das larvas de *T. molitor* quando submetidas a administração de Oseltamivir e Aciclovir, observou-se que apresentaram ação dependente da dose (**Figura 1**). O resultado demonstrou, que após 48 h as taxas de sobrevivência das larvas frente ao OSV, foram aproximadamente 80% e 50%, nas doses de 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg, respectivamente, enquanto que as taxas de sobrevivência nas doses 3 mg/Kg e 30 mg/Kg foram de 100%, igualando-se ao grupo controle. Já o grupo DMSO apresentou taxa de sobrevivência igual a 20%. Para o grupo ACV nas doses de 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg apresentaram taxa de sobrevivência de 80% e 70% respectivamente, enquanto nas doses 3 mg/Kg e 30 mg/Kg apresentaram 100% de sobrevivência também ficando igual ao grupo controle. A Anfotericina B na dose de 3 mg/Kg apresentou 100% de sobrevivência das larvas, já para a dose de 30 mg/Kg essa taxa foi de 80% enquanto que para as doses de 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg tiveram respectivamente 60% e 40% de sobrevivência, vale ressaltar que todas as larvas mortas apresentaram coloração escura, caracterizando a toxicidade da substância. Os valores da DL₅₀ para as substâncias Oseltamivir, Aciclovir e Anfotericina B foram: 2.582,522 ; 9.401,247 e 912,237 mg/Kg, respectivamente, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Valores de DL₅₀ para as substâncias Oseltamivir (OSV), Aciclovir (ACV) e Anfotericina B (Anf B).

Substância	DL ₅₀
Oseltamivir (OSV)	2.582,522 mg/Kg
Aciclovir (ACV)	9.401,247 mg/Kg
Anfotericina B (Anf B)	912,237 mg/Kg

Fonte: Arquivo pessoal

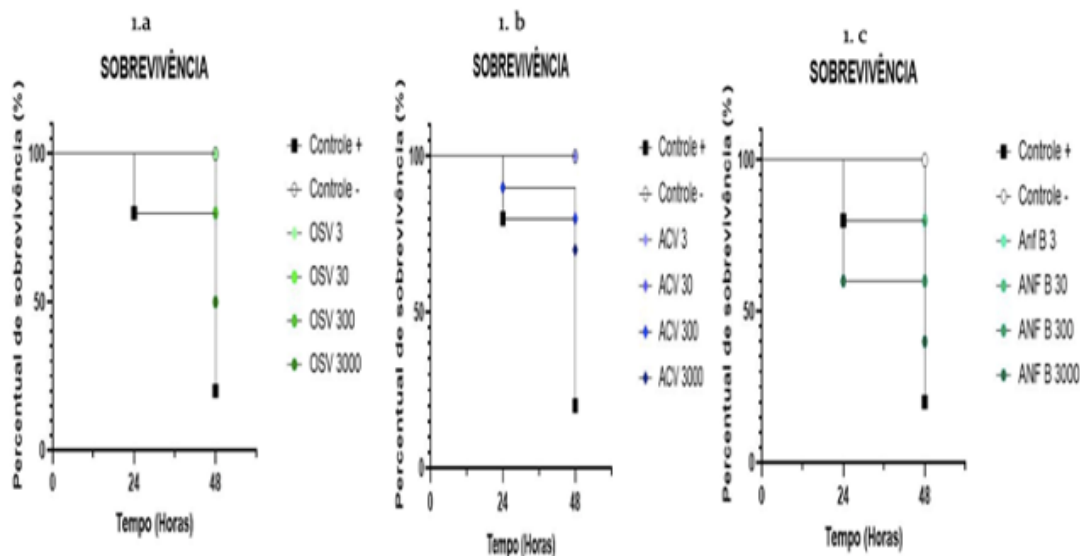


Figura. 1 Percentual de sobrevivência das larvas *T. molitor* exposta ao OSV e ACV. As larvas foram incubadas por 48 h na presença de diferentes doses. As figuras: 1^a refere-se ao Oseltamivir; 1.b refere-se ao Aciclovir e 1.c a Anfotericina B. A viabilidade das larvas foi mensurada realizando-se a verificação visual de cada indivíduo, quanto à presença de melanização e/ou resposta a estímulos físicos após toque suave. A solução salina foi utilizada como controle negativo e o DMSO foi utilizado como controle positivo. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados em triplicata.

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia

Após a infecção das larvas de *T. molitor* com *Leishmania amazonensis*, foram realizados os tratamentos com as substâncias Oseltamivir e Aciclovir na dose de 30 mg/Kg e Anfotericina B na dose de 30 mg/Kg (**Figura 2 e 3**). Observou-se que para os grupos controle (infectado com *L. amazonensis*) e o grupo infectado e tratado com Anfotericina B tiveram taxa de sobrevivência de 28,58%. Para os grupos tratados com Oseltamivir e Aciclovir a taxa de sobrevivência foram de 71,43% e 92,86% respectivamente.

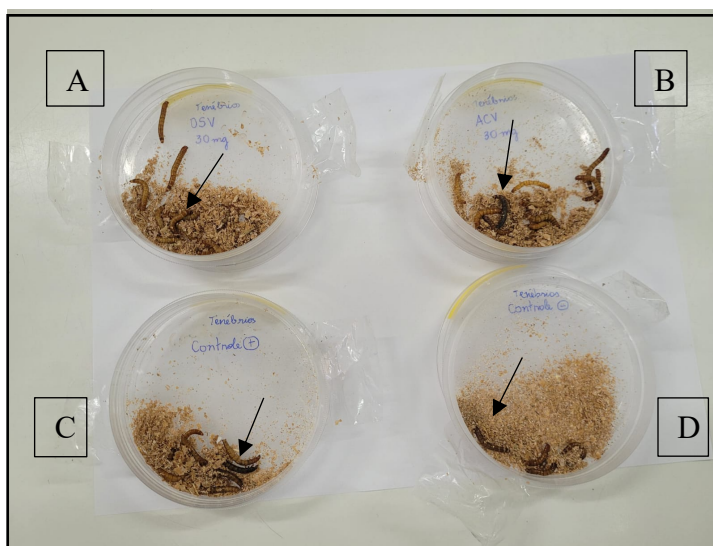


Figura 2. Viabilidade das larvas de *T. molitor*. Para o tratamento foram utilizados dose de 30 mg/Kg para OSV (A) e ACV (B). Controle positivo utilizou-se DMSO a 100% (C) e controle negativo apenas solução salina (D). As setas apontam larvas mortas apresentando encolhimento do corpo e melanização característica de mortalidade larval.

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), 2024.

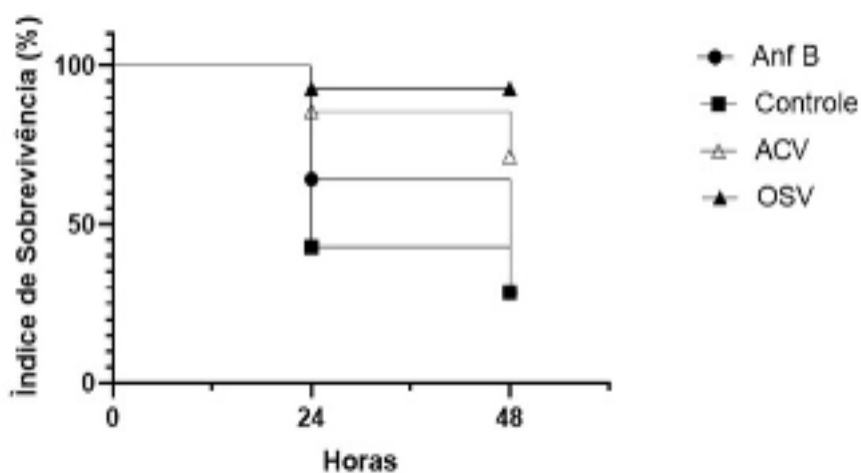


Figura 3. Percentual de sobrevivência da larva *T. molitor* exposta ao OSV e ACV após infecção com *Leishmania amazonensis*. As larvas foram incubadas por 48 h na presença de diferentes doses. A viabilidade das larvas foi mensurada realizando-se a verificação visual de cada indivíduo, quanto à presença de melanização e/ou resposta a estímulos físicos após toque suave. A solução salina foi utilizada como controle negativo e o DMSO foi utilizado como controle positivo. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados em triplicata.

Ensaio da melanina em larvas de *Tenebrio molitor*

Analizando os níveis de melanina presentes nas larvas de *T. molitor* após a administração das substâncias Oseltamivir, Aciclovir e Anfotericina B nas doses 3,0 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg, observou-se que o grupo controle, as substâncias OSV e AnfB na dose 30 mg/Kg e ACV na dose 3 mg/Kg apresentaram um nível de melanização em torno de 1,7 de absorvância. Já os grupos OSV na dose 300 mg/Kg e ACV na dose 30mg/Kg foram equivalentes, apresentando um nível aproximadamente a 1,9. Os grupos ACV na dose 3000 mg/Kg e Anf.B na dose 30 mg/Kg apresentaram seus níveis 2,4 e 2,9 respectivamente e o grupo DMSO apresentou o nível em torno de 2,8. Observou-se ainda que entre os grupos, o ACV na dose 3000 mg/Kg e o DMSO apresentaram significância (**Figura 4**).

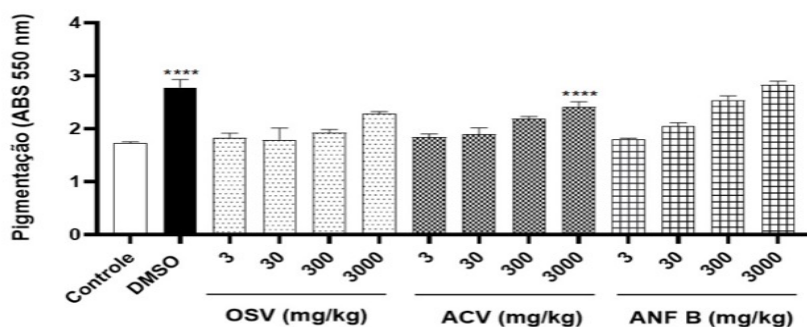
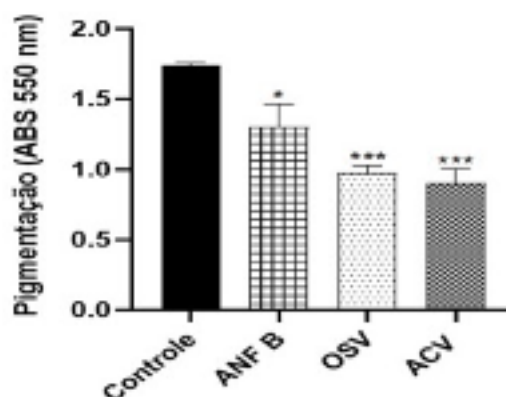


Figura 4. Níveis de melanização de larvas *T. molitor* expostas as substâncias OSV, ACV, Anf B nas doses 3 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg. As larvas foram incubadas por 48 h. A solução salina foi utilizada como controle negativo e o DMSO foi utilizado como controle positivo. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (****) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,05$.

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), 2024.

A análise dos resultados para os grupos de larvas de *T. molitor*, após infecção com *Leishmania amazonensis* e tratamento com as substâncias OSV, ACV e AnfB na dose de 30 mg/Kg, observou-se uma redução de pigmentação de melanina nas larvas infectadas e tratadas com os antivirais OSV e ACV

comparada com o grupo controle. O grupo Aciclovir demonstrou significância ($P < 0,05$) (**Figura 5**).



Leishmania amazonensis (+)

Figura 5. Níveis de melanização de larvas *T. molitor* após infecção com *Leishmania amazonensis* e tratadas as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg. As larvas foram incubadas por 48 h. A solução salina foi utilizada como controle negativo. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (***) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,05$.

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL) 2024.

Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em larvas de *Tenebrio molitor*

Para o ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase com larvas após a administração das substâncias OSV, ACV e Anf B, nas doses 3 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg, observou-se que o Oseltamivir em todas as concentrações apresentou produção de mieloperoxidase menor que o controle, no entanto, na dose de 3000 mg/Kg a produção de enzima foi maior apresentando 130 U/mg, ficando abaixo do nível do grupo DMSO que foi de 280 U/mg. Já para o grupo do Aciclovir, observou-se que em todas as doses também apresentaram produção de mieloperoxidase, sendo ainda menores que o nível da produção do grupo controle (150 U/mg) e DMSO (280 U/mg), embora a dose do Aciclovir de 3 mg/Kg tenha apresentado uma produção da enzima de 110 U/mg (**Figura 6**).

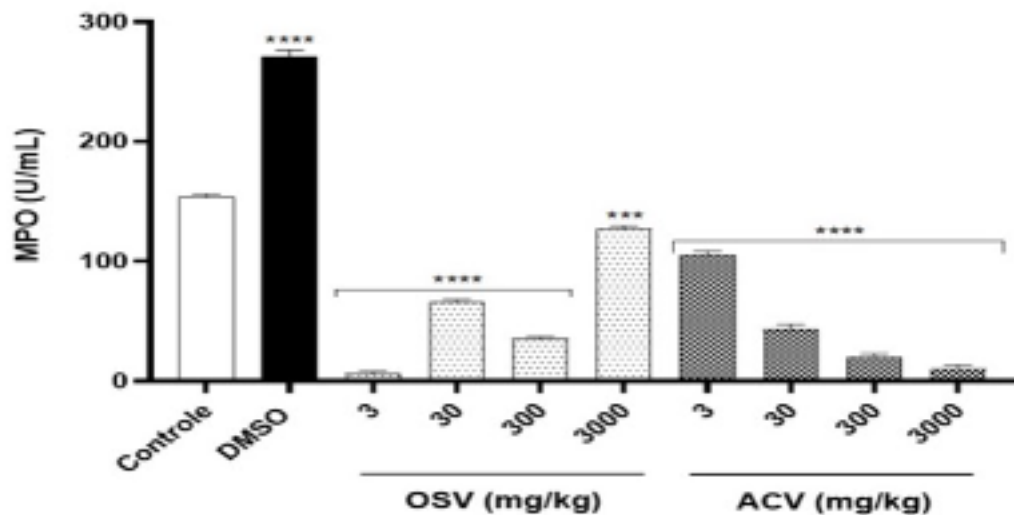
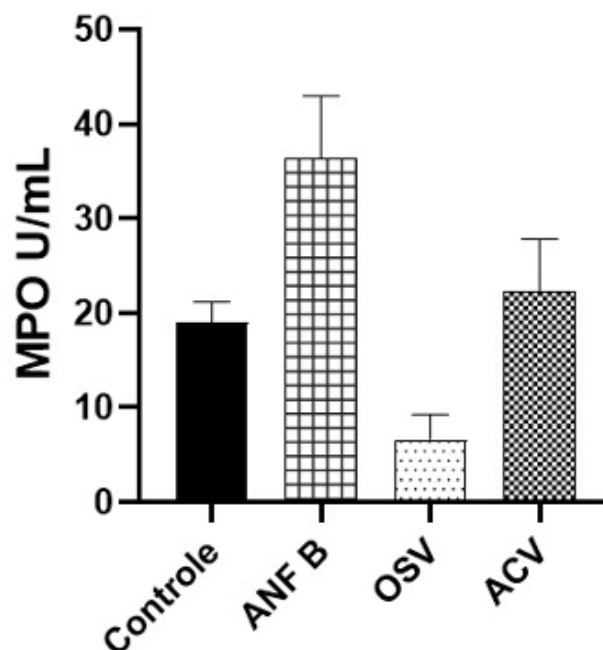


Figura 6. Atividade da enzima mieloperoxidase em larvas *T. molitor* expostas as substâncias OSV, ACV, Anf B nas doses 3 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg. As larvas foram incubadas por 48 h. A solução salina foi utilizada como controle negativo e o DMSO foi utilizado como controle positivo. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (*) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,05$. (****).

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL) 2024.

Quando analisou-se a produção da enzima mieloperoxidase com larvas *T. molitor* após a infecção com *Leishmania amazonensis* e administração das substâncias OSV, ACV e Anf B na dose 30 mg/Kg, observou-se que o Oseltamivir reduziu a produção de mieloperoxidase aproximadamente 6 U/mL, seguido do controle com 22 U/mL, já o Aciclovir apresentou valor de 22 U/mL para a produção da enzima mieloperoxidase e a Anfotericina B 35 U/mL, sendo o maior valor entre as substâncias. (**Figura 7**)



Leishmania amazonensis (+)

Figura 7. Atividade da enzima mieloperoxidase em larvas *T. molitor* após infecção com *Leishmania amazonensis* e tratamento com as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg . As larvas foram incubadas por 48 h. A solução salina foi utilizada como controle negativo. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (*) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,05$. (****).

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), 2024.

Ensaio de Nitrito pelo método de Griess em larvas de *Tenebrio molitor*

De acordo com os dados demonstrados na figura 8, todas as doses do Oseltamivir e do Aciclovir que foram testadas (3, 30, 300 e 3000 mg/Kg) não demonstraram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle, uma vez que somente o controle positivo (DMSO) apresentou um valor relativamente alto (cerca de 2,4 mmol/mL).

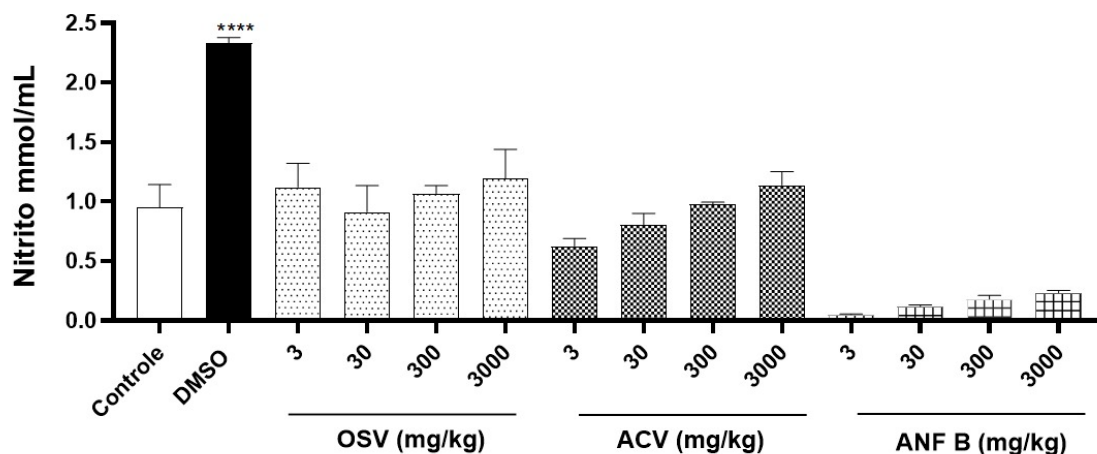
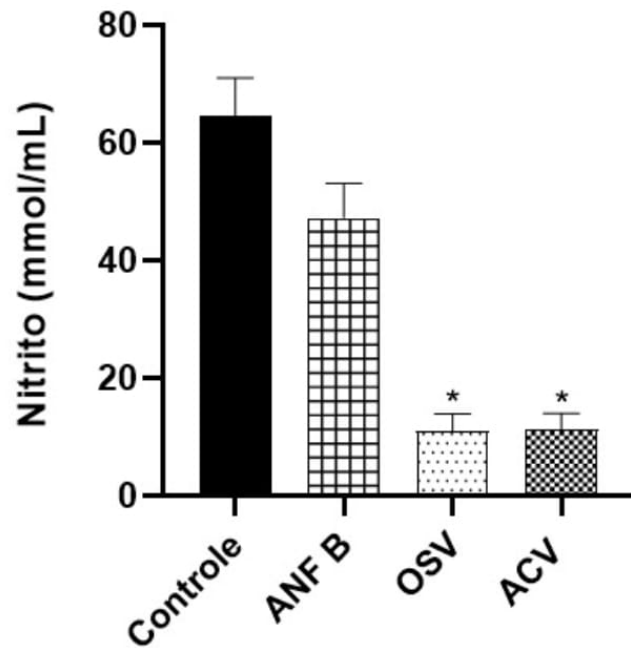


Figura 8. Concentração de nitrito em larvas *T. molitor* expostas as substâncias OSV, ACV, Anf B nas doses 3 mg/Kg; 30 mg/Kg; 300 mg/Kg e 3000 mg/Kg. As larvas foram incubadas por 48 h. A solução salina foi utilizada como controle negativo e o DMSO foi utilizado como controle positivo. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (*) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,05$. (***)

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), 2024.

Quando analisou-se a produção de nitrito das larvas infectadas por *L. amazonensis* e tratadas com OSV, ACV e Anf B, observou-se uma redução do nitrito em relação ao grupo de larvas infectadas e não tratadas, sendo significativa ($P < 0,05$) nas larvas que receberam a dose de tratamento de 30mg/Kg de OSV e ACV.



Leishmania amazonensis (+)

Figura 9. Concentração de nitrito em larvas *T. molitor* após infecção com *Leishmania amazonensis* e tratamento com as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg . As larvas foram incubadas por 48 h. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (*) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,5$.

Fonte: Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL), 2024.

Ensaio para avaliação de diferencial hemocitário, alterações celulares, plasmatócitos infectados e amastigotas sobrevivente em larvas de *Tenebrio molitor*

Diferencial hemocitário

Para a análise da morfologia celular das larvas de *Tenebrio molitor* foram observados quatro tipos celulares bem definidos: Pro-hemócitos, Granulócitos, Plasmatócitos e Oenocitóides (**Figura 10**). Observou-se uma variação nos números encontrados para tais células, cujos valores apresentados para Pro-hemócitos nas células foram baixos em torno de 1, no entanto, os valores para Granulócitos, Plasmatócitos e Oenocitóides foram 50, 47 e 2, respectivamente.

Com a administração das substâncias OSV, ACV e Anf B, observou-se que os valores de Pro-hemócitos e Oenocitoides permaneceram baixos em torno de 1. Granulócitos e Plasmatócitos demonstraram valores iguais de 51 para OSV e ACV, sendo um pouco acima quando comparados à células normais. A Anf B apresentou valores de Granulócitos e Plasmatócitos em torno de 57 e 47, respectivamente.

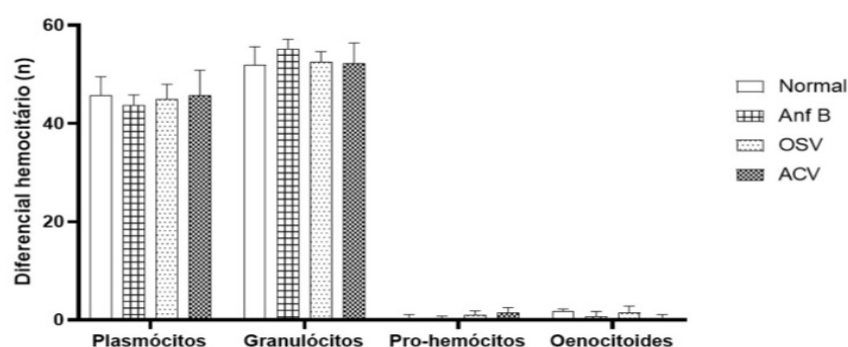
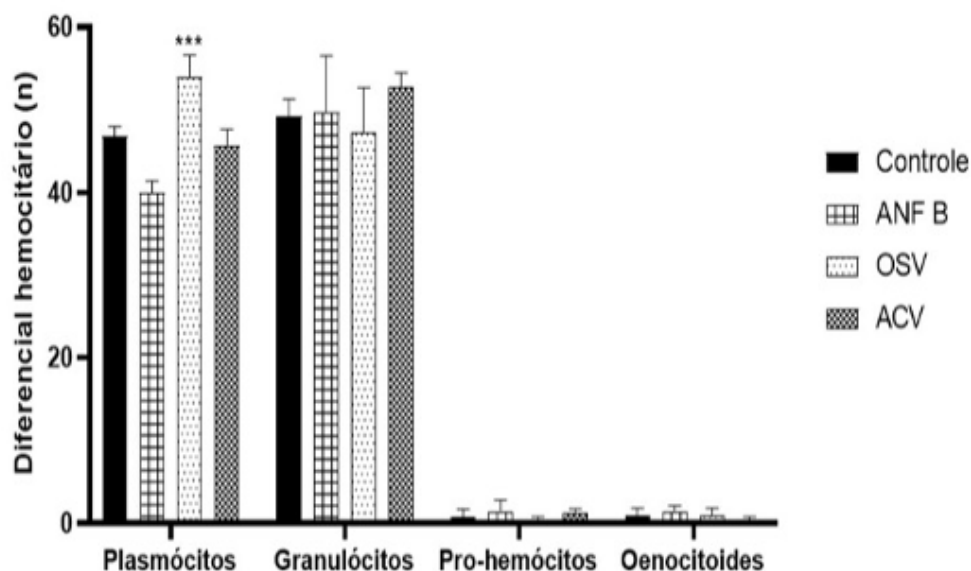


Figura 10. Diferencial hemocitário em larvas *T. molitor* por grupos experimentais com e sem administração das substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg . As larvas foram incubadas por 48 h. Foi retirado hemolinfa das larvas feito um “imprint” seguida de esfregaço, finalizando com a leitura em microscópio.

Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA), UFPI, 2024.

Quando analisou-se a figura 11, observou-se que após a infecção das larvas com *Leishmania amazonensis* seguido do tratamento com as substâncias OSV, ACV e Anf B, não houve variação dos valores com relação aos tipos celulares Pro-hemócitos e Oenocitoides para as substâncias e para o controle. Os valores encontrados para os tipos celulares Granulócitos e Plasmatócitos para o controle foram de 48 e 46 respectivamente. Para as substâncias OSV, ACV e Anf B, observou-se que os valores de Pro-hemócitos e Oenocitoides permaneceram iguais em torno de 1, no entanto, Granulócitos e Plasmatócitos para o OSV os valores encontrados foram de 46 e 52, respectivamente, sendo significativa ($p < 0,05$) nas larvas que receberam a dose de tratamento de 30mg/Kg de OSV. Para o ACV os tipos celulares Granulócito e Plasmatócito

demonstraram valores de 52 e 45, respectivamente. A Anf B apresentou valores de Granulócitos e Plasmatócitos em torno de 48 e 51, respectivamente.



Leishmania amazonensis (+)

Figura 11. Diferencial hemocitário em larvas *T. molitor* por grupos experimentais após infecção com *Leishmania amazonensis* seguida de tratamento com as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg. As larvas foram incubadas por 48 h. Foi retirado hemolinfa das larvas feito um “imprint” seguida de esfregaço, finalizando com a leitura em microscópio. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (*) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,5$. (***) – diferença significativa com o grupo Controle, $p < 0,05$.

Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA), UFPI, 2024.

Alterações celulares

Dentre as alterações celulares encontradas nas larvas de *T. molitor* com e sem tratamento com as substâncias OSV, ACV e Anf B na dose de 30 mg/Kg foram observadas mitose, plasmatócito ativado (PI) e plasmatócito binucleado (PI Bi) como mostra a figura 13. Observou-se uma variação nos números encontrados para essas alterações, cujos valores apresentados para mitose, (PI)

e (PI Bi) nas células normais foram baixos, entre 0,1 e 0,2. Para o OSV os valores encontrados para mitose, (PI) e (PI Bi) foram 1,7, 0,3 e 0,3, respectivamente. Os valores encontrados para o ACV para mitose, (PI) foram 2,5 e 0,5 respectivamente. O ACV não apresentou (PI Bi), no entanto, a Anf B apresentou os seguintes valores 2,6 e 1,2 para mitose (PI), e assim como o OSV e ACV o valor para (PI Bi) foi baixo sendo 0,1. Dentre as alterações observadas a mitose apresentou significância nas substância OSV e anf B comparadas ao controle (**Figura 12**).

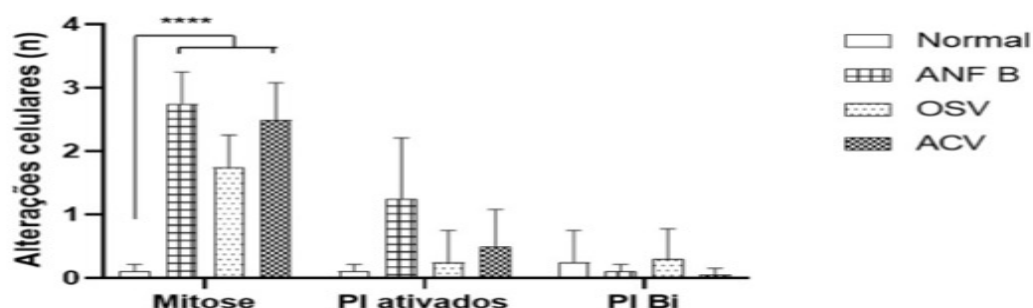
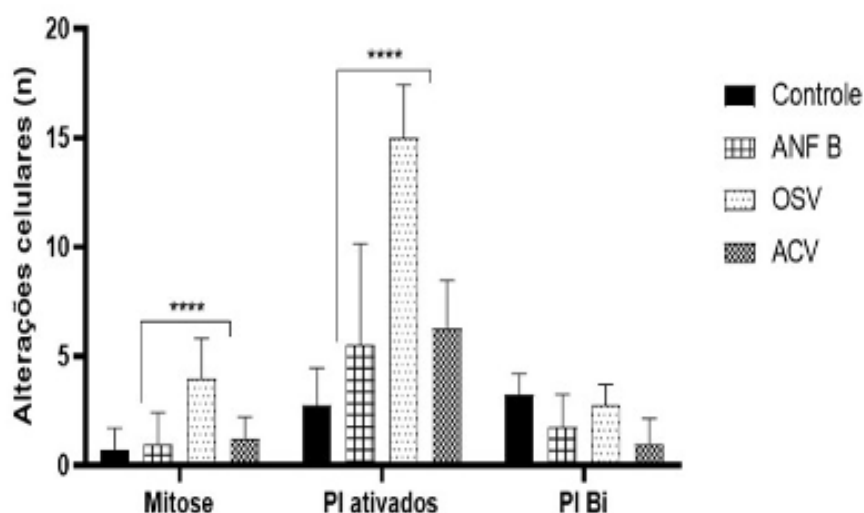


Figura 12. Alterações celulares em larvas *T. molitor* por grupos experimentais com e sem administração das substâncias OSV, ACV e Anf B na dose 30 mg/KG. Foram encontradas mitose, plasmátócito ativado (PI) e plasmátócito binucleado (PI Bi). após infecção com *Leishmania amazonensis* seguida de tratamento com as substâncias OSV, ACV, Anf B na dose 30 mg/Kg. As larvas foram incubadas por 48 h. Foi retirado hemolinfa das larvas feito um “imprint” seguida de esfregaço, finalizando com a leitura em microscópio. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (****) – diferença significativa com o grupo Normal, $p < 0,05$.

Fonte: Laboratório de Atividade Anti-leishmania (LAA), UFPA, 2004.

As alterações celulares encontradas em larvas de *T. molitor* infectadas com *Leishmania amazonensis* e tratadas com as substâncias OSV, ACV e Anf B na dose de 30 mg/Kg, foram mitose, plasmátócito ativado (PI) e plasmátócito binucleado (PI Bi) como mostra a figuras 14. Observou-se que o grupo controle apresentou valores 3 e 4 para (PI) e (PI Bi), já o valor para mitose foi de 0,5. Para o OSV os valores encontrados para mitose, (PI) e (PI Bi) foram 4, 15 e 3,

respectivamente. Os valores encontrados para o ACV para mitose, (PI) e (PI Bi) foram 2, e 7 e 0,6, respectivamente. A Anf B apresentou os seguintes valores 0,6, 6 e 2, para mitose, (PI) e (PI Bi), respectivamente. Das alterações observadas a mitose apresentou significância nas substâncias OSV e anf B comparadas ao controle e entre OSV e controle para (PI) (**Figura 13**)



Leishmania amazonensis (+)

Figura 13. Alterações celulares analisadas em larvas de *T. molitor* por grupos experimentais após infecção com *Leishmania amazonensis* e tratadas com as substâncias OSV, ACV e Anf B na dose de 30 mg/Kg. Foram encontradas mitose, plasmátócito ativado (PI) e plasmátócito binucleado (PI Bi). As larvas foram incubadas por 48 h. Foi retirado hemolinfa das larvas feito um “imprint” seguida de esfregaço, finalizando com a leitura em microscópio. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (****) – diferença significativa com o grupo Normal, $p < 0,05$.

Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA), UFPI, 2024.

Carga parasitária

Para determinar a eficácia do tratamento *in vivo*, determinou-se a carga parasitária dos grupos infectados utilizando o cálculo de índice LDU (Figura 15). A carga parasitária foi avaliada através da contagem direta de formas amastigotas internalizadas em plasmátócitos no esfregaço de hemolinfa. Para

estimar o número total de parasitas por larva, foi adaptada a fórmula de Stauber (Stauber, 1958) para cálculo das unidades de *Leishmania* por larva de *Tenebrio molitor*, onde o número de amastigotas por 100 células hematocíticas foi multiplicado pelo peso da larva em miligramas. Verificou-se que após o tratamento com as substâncias OSV, ACV e Anf B, os resultados apresentaram redução da carga parasitária, sendo o OSV a substância com a menor carga parasitária em torno de 250 LDU comparado com o grupo controle que apresentou 4200 LDU. O ACV demonstrou carga parasitária igual a 700 LDU e a Anf B 900 LDU, conforme figura 14. Todas as substâncias apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

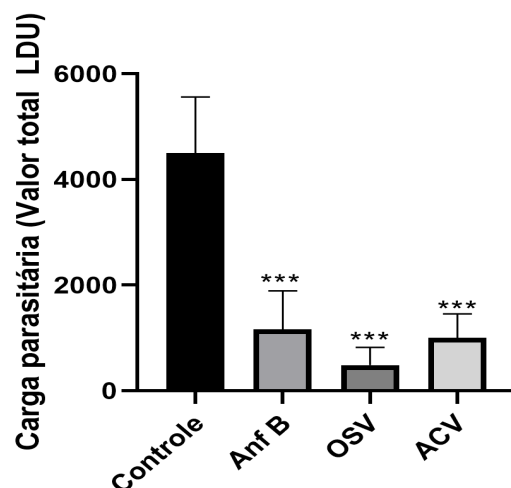


Figura 14. Quantificação da carga parasitária utilizando o índice LDU, analisada em larvas de *T. molitor* por grupos experimentais após infecção com *Leishmania amazonensis* e tratadas com as substâncias OSV, ACV e Anf B na dose de 30 mg/Kg. As larvas foram incubadas por 48 h. Foi retirado hemolinfa das larvas feito um “imprint” seguida de esfregaço, finalizando com a leitura em microscópio. Resultados representam média $\pm$ E.P.M dos tratamentos realizados. (***) – diferença significativa com o grupo Normal, $p < 0,05$.

Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA), UFPI, 2024.

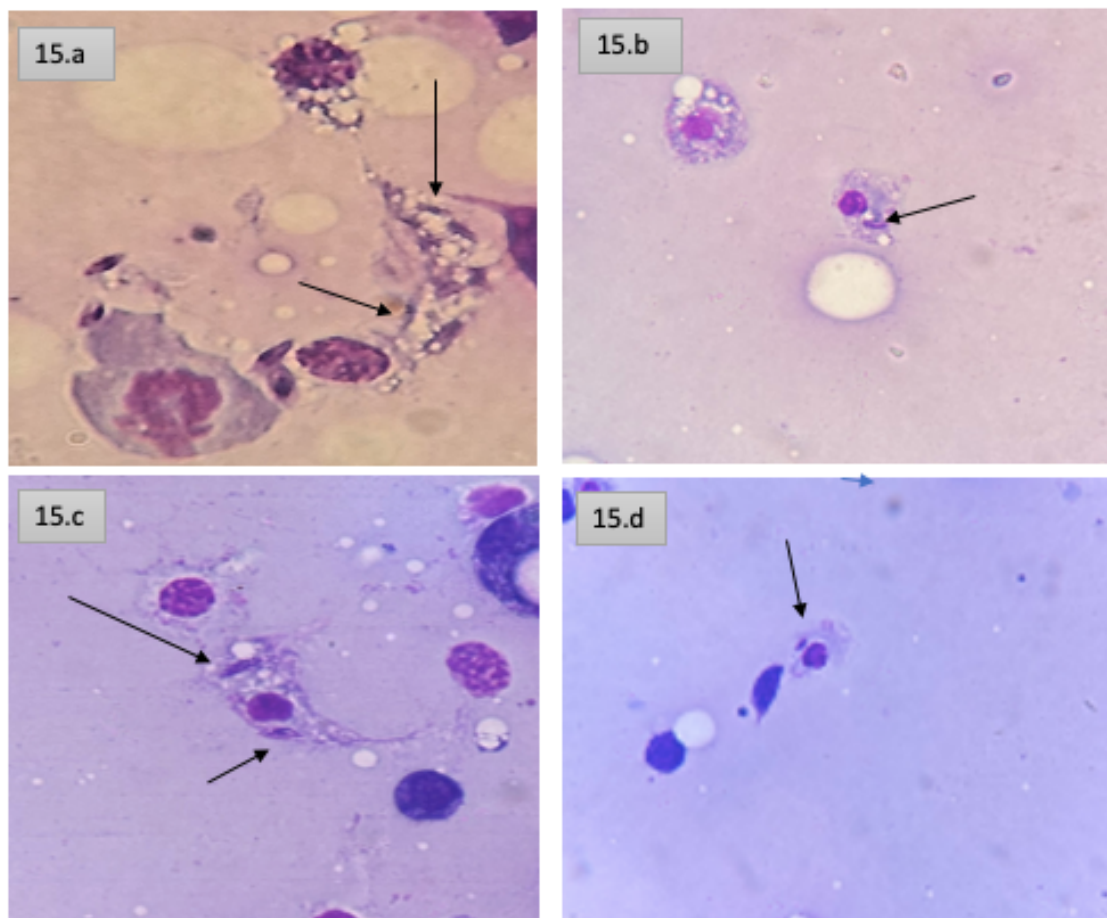


Figura 15. Micrografias de luz de esfregaços de hemolinfa de *T. molitor* com infecção com *L. amazonensis*, corados por Panótico. Carga parasitária analisadas no grupo controle (sem tratamento) (15.a), grupo tratado com OSV (15.b), grupo tratado com ACV (15.c) e grupo tratado com Anf B (15.d). As setas indicam a quantidade de amastigotas nos plasmatócitos. Aumento 1000x.

Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA), UFPI, 2024.

Discussão

O uso de larvas de *T. molitor* para a comercialização e consumo animal e humano tem crescido nos últimos tempos, devido à sua composição nutricional, facilidade de manuseio e criação, e ciclo de vida curto (Han et al., 2010). Além disso, perante o conflito ético e aspectos sociais, busca-se priorizar cada vez mais o uso de modelos alternativos em pesquisa experimental, como o *T. molitor*, tendo em vista que em insetos o sistema imune inato é evolutivamente conservado (Canteri et al., 2018). Devido a essas características, tem-se aumentado o interesse pelo uso desse inseto como modelo alternativo para estudos *in vivo* para avaliação de diversas atividades como antimicrobiana (Morey et al., 2016), toxicidade (Van Der Valk e Meijden, 2014) inseticida (Wang et al. 2015) e de patogenicidade (McGonigle et al., 2016).

Uma vantagem importante do uso desse modelo experimental é representada pela baixa quantidade de materiais necessários para a análise, devido o peso corporal do *T. molitor* ser menor que o de camundongos e ratos.

Os estudos toxicológicos têm como objetivo principal uma previsão dos possíveis efeitos adversos que determinada substância pode provocar quando da exposição humana ou animal, seja ela candidata a um medicamento, praguicida, agente químico industrial, dentre outros (Koeter 1993; Stokes 2002; Meyer 2003).

Alguns estudos já avaliaram o uso de antivirais determinando sua dose letal DL50, dentre eles o Aciclovir, no entanto, o presente estudo é pioneiro na avaliação dos antivirais OSV e ACV contra *Leishmania amazonensis*. Neste contexto, foi realizado o ensaio *in vivo* utilizando-se como organismo modelo o *T. molitor*, sendo determinados os perfis de sobrevivência nas formas larvais do inseto, através da atividade toxicológica, antioxidante tais como melanização, mieloperoxidase, nitrito, bem como o diferencial hemocitário, suas alterações celulares e carga parasitária.

Neste estudo o resultado da toxicidade para o OSV e ACV foram menores comparados a Anf B e ao controle. Segundo a classificação da *Organisation for*

Economic Co-operation and Development (OECD, 2002), tanto o OSV como o ACV integram a classe 5 por apresentarem valor nesta faixa (DL50 2000-5000 mg/Kg), indicando como substâncias com baixa toxicidade.

Estes resultados corroboram com o trabalho de Brai et al (2023) que utilizou larvas de *T. molitor* analisado um painel de 20 medicamentos disponíveis no mercado, incluindo antivirais, antibióticos e os medicamentos representativos de diversas classes farmacêuticas, dentre eles o aciclovir que não se mostrou tóxico, devido a DL50 ter demonstrado valor >2000 mg/kg. Os resultados estão de acordo comparados com Tecker et. al (2006) que relataram uma dose maior que 650 mg/kg em ratos. Nimesulida e paracetamol mostraram ser mais tóxicos para *T. molitor* do que para camundongos e ratos, a causa da maior toxicidade pode ser devido à ausência de mecanismos de controle de temperatura.

Pesquisas recentes com larvas de *T.molitor* apontam que o estresse causado por algumas substâncias ativa a enzima profenoloxidase que resulta na enzima fenoloxidase responsável pela melanização, além de produzir metabólitos como fenóis, quinonas e espécies reativas de oxigênio (EROS) que ajudam a combater organismos invasores, no entanto, traz efeitos deletérios para o hospedeiro. Dessa forma, a produção de melanização cuticular pode ser diretamente relacionada com algum tipo de fator estressor, seja resposta a infecção, trauma físico ou efeito citotóxico. (VIGNERON et al., 2019).

A primeira linha de defesa dos insetos contra a ação de patógenos é representada pela cutícula e pelo mesêntero que formam uma barreira bastante eficiente contra a invasão dos patógenos (GALLO et al., 2002). Quando essa falha, reações imunológicas começam a ser desencadeadas (FERNANDES, 2010), bem como um conjunto de diferentes hemócitos (LAVINE; STRAND, 2002).

Estudos relacionados com a atividade antimicrobiana avaliam a sobrevivência das larvas infectadas após a inoculação do composto a ser estudado. Também podem ser avaliados os mecanismos relacionados à imunidade inata do inseto (produção de espécies reativas e peptídeos antimicrobianos, fagocitose, etc, (De Sousa et al., 2015). *T. molitor* é susceptível

a patógenos como *Escherichia coli* (Seo et al., 2016) e *Staphylococcus aureus* (McGonigle et al., 2016), que são capazes de persistir dentro do inseto infectado, e provocar alterações em tecidos, hemolinfa, e fagócitos. O sistema imune deste inseto já possui algumas vias de sinalização conhecidas, como a via Toll, a cascata profenoloxidase e a via de autofagia (Seo et al., 2016). Estas características têm favorecido o uso deste inseto como modelo alternativo de infecção para estudos de patogenicidade, e de atividade antimicrobiana e antivirulência *in vivo* (McGonigle et al., 2016).

As peroxidases são um grupo de enzimas que oxidam uma grande variedade de substratos utilizando o peróxido de hidrogênio e estão presentes em mamíferos, bactérias, fungos e plantas (PASSARDI et al., 2005). Dentre as peroxidases humanas, destaca-se a mieloperoxidase (MPO), presente principalmente em grânulos de neutrófilos. Esta enzima é a única capaz de gerar ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidante necessário no combate de patógenos invasores, em quantidades relevantes (VLASOVA, 2018).

Estudos apontam que a enzima de MPO quando bem expressa no organismo é considerada uma atribuição patológica a artifícios biológicos extracelulares de neutrófilos, conhecidos como NETs (do inglês neutrophil extracellular traps) (DAVIES; HAWKINS, 2020).

Níveis elevados de MPO foram encontrados em diversas doenças inflamatórias, como na artrite reumatoide, sua presença nas cartilagens inflamadas já foi estudada como uma possível causa da doença através do estresse oxidativo, mas atualmente prevalece o entendimento de que a MPO está associada à progressão da doença no decorrer do tempo (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018).

Dessa forma, os resultados obtidos neste ensaio podem ser um indicativo de que os fármacos em estudo, apresentam características satisfatórias em relação a proteção contra o dano oxidativo nas células e tecidos de invertebrados e vertebrados, uma vez que, na literatura científica, já se tem bem estabelecido que em situações nas quais ocorrem aumento do estado inflamatório e intensa produção de espécies reativas de oxigênio, a atividade da MPO pode estar

aumentada, funcionando como um biomarcador do estresse oxidativo presente naquele organismo (KOCH *et al.*, 2021).

No presente estudo as substâncias OSV e ACV reduziram a produção de mieloperoxidase nas células de *T. molitor* infectadas com *L. amazonensis*, indicando que essas características são satisfatórias em relação a proteção contra o dano oxidativo nas células.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre que desempenha importantes funções fisiológicas no organismo saudável, entretanto, em situações estressantes, o seu aumento está intimamente relacionado com o surgimento de espécies reativas de nitrogênio (RNS), dentre elas o mais abundante é o peroxinitrito (ONOO-), que apresenta alta atividade citotóxica. Além disso, a própria decomposição do ONOO- produz $\bullet\text{NO}_2$, que também é um forte oxidante. Sendo assim, a determinação desse radical ajuda na avaliação do estresse oxidativo, porém devido à sua meia-vida fisiológica curta, a análise do NO é realizada indiretamente, por meio da determinação do seu metabólito mais estável, o nitrito (NO^{2-}) (Pérez-Torres *et al.*, 2020).

Estudos científicos afirmam que maiores concentrações de nitrito em amostras biológicas podem estar relacionadas a maior formação de NO, e, então, associados a maior formação de substâncias oxidantes (peroxinitrito), que estão associadas ao estresse (Bryan; Grisham, 2007).

A avaliação do aumento de nitrito é, geralmente, reportado na literatura como associado a processos que desencadeiam condições patológicas que geram estresse oxidativo, com isso a liberação de radicais livres como, o óxido nítrico (NO), que é responsável por originar danos na célula (ARAUJO *et al.*, 2020).

Dessa forma, com os baixos valores encontrados neste estudo, para as substâncias OSV e ACV, sugere-se que as mesmas, não contribuíram para a produção de substâncias oxidantes, através do aumento na formação de NO, portanto, não levando ao estresse oxidativo.

Os insetos dependem de barreiras físicas, como a cutícula, bem como de respostas imunes celulares e humorais para neutralizar parasitas e patógenos em seus ambientes naturais (Schulenburg et al., 2009). As defesas celulares envolvem hemócitos, que desempenham um papel crucial na eliminação de patógenos por fagocitose, formação de nódulos, encapsulamento e reações citotóxicas (Lavine et al., 2002)

Segundo Urbański et al.(2018) , Estudo fornece uma descrição abrangente da ultraestrutura dos hemócitos em adultos de *T. molitor* . Os resultados destacaram quatro tipos morfológicos de hemócitos circulantes que chamamos de pro-hemócitos, plasmatócitos, células granulares e oenocitoides de acordo com um estudo anterior realizado usando microscopia eletrônica de varredura e fluorescência. Células granulares, plasmatócitos e oenocitoides foram indicados como os principais tipos de células envolvidas na fagocitose em adultos e larvas (Giulianini et al., 2003).

Pró-hemócitos são células bem caracterizadas, pequenas e esféricas ou ovais que contem um núcleo bastante volumoso, ocupando quase todo o citoplasma e com região com grande quantidade de heterocromatina (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008). São consideradas as células-tronco que embrionicamente dão origem aos outros tipos e não estão envolvidos na fagocitose (KLOWDEN, 2008; LAVINE; STRAND, 2002).

Plasmatócitos são maiores, pleiomórficas, podendo ser ameboides, esféricos, ovais ou alongados, sendo esta última a forma predominante (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008). É possível observar prolongamentos citoplasmáticos nessas células (CUNHA, 2007). O núcleo se apresenta volumoso com poucas áreas heterocromáticas e o citoplasma grande contendo numerosas vesículas (CUNHA, 2007). São geralmente entre os mais abundantes dos hemócitos e são frequentemente envolvidos na fagocitose, na formação de cápsulas e nódulos (KLOWDEN, 2008).

As células granulares são os principais hemócitos circulantes PO-positivos de *T. molitor* , conforme observado em estudos anteriores (Ling et al., 2005). Tais células podem estar envolvidas na cascata de melanização ou em

processos de agregação, como encapsulamento e nodulação de patógenos (Vommaro et al., 2021).

Oenocitóides são células imóveis, de fácil identificação por serem os maiores hemócitos e apresentam morfologia esférica ou ovoide, bastante uniforme, núcleo central e pequeno em relação ao tamanho da célula e um grande e complexo citoplasma (CUNHA, 2007; KLOWDEN, 2008). Os oenocitóides carregam uma das fenoloxidasas que são responsáveis pelo escurecimento da hemolinfa (síntese de melanina), tal fenoloxidase é sintetizada no citoplasma dessas células e são liberados no plasma quando estas sofrem lise celular (RIBEIRO; BREHÉLIN, 2006).

A classificação dos hemócitos ainda é um tópico controverso e as limitações para realizar uma análise comparativa entre o baixo número de espécies até agora descritas são em parte devido às diferenças de métodos de investigação além da variabilidade específica da espécie (Siddiqui et al., 2012).

Como resultado, os pró-hemócitos são apenas células menos diferenciadas, como observado em nossas análises ultraestruturais, em vez de células-tronco multipotentes, coerentemente com estudos anteriores (Cavaliere et al., 2019). A conversão de hemócitos circulantes já diferenciados em outro tipo de célula foi observada *in vitro* em plasmatócitos de *T. molitor* (Gupta, 1966).

Os oenocitoides devem ter menor potencial para se transformar em outro tipo, as diferenças morfológicas observadas entre e dentro das populações celulares de *T. molitor* podem estar intimamente relacionadas à variação da função celular durante seu ciclo de vida (Vommaro et al., 2021).

A evidência de células circulantes mitóticas sugere que a proliferação de hemócitos ocorre para substituir hemócitos apoptóticos e necróticos e não apenas como uma resposta após infecção, como observado em *D. melanogaster* (King et al., 2013).

No presente estudo, durante a análise da morfologia celular das larvas de *Tenebrio molitor* foram observados quatro tipos celulares bem definidos: Pro-hemócitos, Granulócitos, Plasmatócitos e Oenocitóides. Observou-se que com

as substâncias OSV, ACV e Anf B tiveram o mesmo percentual de plasmatócitos, no entanto, os granulócitos tiveram percentual maior para a Anf B. Contudo, após a infecção e tratamento, observou-se que a presença de plasmatócitos foi maior para o OSV e granulócitos para ACV.

Como células granulares, plasmatócitos e oenocitoides foram indicados como os principais tipos de células envolvidas na fagocitose, Assim, pode-se pensar que elas possam estar envolvidas na melanização ou em processos que possam combater patógenos. Além disso, foi observado a vacúolos em grande quantidade nos plasmatócitos, onde foi indicado em estudos anteriores que tais células estão relacionadas a capacidade de internalizar organismos estranhos em um fagossomo.

Observou-se ainda no ensaio com as substâncias OSV, ACV e Anf B sem infecção alterações celulares presentes, como mitose, plasmatócitos ativados e plasmatócitos binucleados, sendo que todas apresentaram significância. Contudo, após a infecção com *L. amazonensis*, o OSV apresentou as maiores alterações incluindo mitose, plasmatócitos ativados e plasmatócitos binucleados. Os plasmatócitos infectados foram analisados e percebeu-se que o OSV apresentou o menor índice, seguido do ACV e Anf B, quando comparado com o grupo controle, neste caso o OSV parece atuar melhor contra o patógeno. Assim, percebe-se que os resultados encontrados corroboram com os estudos descritos anteriormente.

Com o objetivo de avaliar os efeitos terapêuticos in vivo das substâncias OSV, ACV e Anf B contra *L. amazonensis*, *T. molitor* foram infectados experimentalmente e tratados. A hemolinfa foi coletada e analisada a carga parasitária pela técnica LDU. Os resultados mostraram redução quando comparados ao grupo controle e a Anf B. Apresentaram valores significativos na ordem 250 LDU para o OSV, 700 LDU para o ACV, 900 LDU para a Anf B e 4200 LDU para o controle.

Conclusão

Os fármacos OSV e ACV apresentaram baixa citotoxicidade, foram capazes de reduzir a melanização, o perfil da mieloperoxidase e do nitrito em larvas de *T. molitor* com e sem infecção por *L. amazonensis*, além de aumentar células do tipo plasmatócitos e granulócitos, bem como aumentou o processo de mitose e ativação de plasmatócitos. O OSV e o ACV foram capazes de reduzir a carga parasitária das formas amastigotas internalizadas.

Referências

Ayres, Janelle S.; Schneider, David S. A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, p. e305, 2008. doi:10.1371/journal.pbio.0060305

Araujo, Victor Hugo Sousa et al. The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 602, p. 125070 Oct. 2020, doi: 10.1016/j.colsurfa.2020.125070.

Blanco VR, Nascimento-Junior NM (2017) Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Rev Virtual Quim** 9 (3): 861-876. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170055>

Bradley, P. P.; Priebat, D. A.; Christensen, R. D.; Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

Bryan, N. S.; Grisham, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med**. 2007 Sep 1;43(5):645-57. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026.

Buckle, D. R. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC Recommendations 2013). **Pure Appl. Chem**, v. 85, n. 8, p; 1725–1758, 2013. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REC-12-11-23>

Canteri SP, Caloni CC, Wilson D, Almeida SR (2018) An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. *J Fungi* 4(4): 125. <https://doi.org/10.3390/jof4040125>

Carneiro SM, Carvalho FA, Santana LC, Sousa AP, Neto JM, Chaves MH (2012) The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.) *Biol Res* 45:111-116. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000200002>

Cavaliere F., Brandmayr P., Giulianini PG, Vommaro ML, Giglio A. Harpalus (Pseudoophonus) rufipes como um modelo para estudar estratégias de defesa imunológica celular e humoral em espécies de coleópteros. *Invertebr. Surviv. J.* 2019;16:92–104.

Cunha, F. M. Aspectos imunológicos e morfologia do canal alimentar de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). 2007. 44f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Davies, Michael J.; Hawkins, Clare L. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. **Antioxidants Redox Signaling**, v. 32, n. 13, p. 957-981, 2020 doi: 10.1089/ars.2020.8030.

De Souza PC, Morey AT, Marcondes G et al (2015) *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **J Microbiol Methods** 118: 182-6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.004>

Ekins, S., Williams, A. J., Krasowski, M. D., & Freundlich, J. S. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discovery Today*, v. 16, n. 7, p. 298-310, 2011.

Esposito, S. et al. Oseltamivir For Influenza Infection In Children: Risks And Benefits, **Expert Review of Respiratory Medicine**, 2015.

Fernandes, E. G. Estudos dos parâmetros biológicos envolvendo fungos entomopatogênicos e *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): imunologia, interação patógenos-hospedeiro, fisiologia e controle biológico. 2010. 122f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Baptista, G. C.; Berti Filho, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramim, J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto, C. Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. p.920.

Giulianini PG, Bertolo F., Battistella S., Amirante GA Ultraestrutura dos hemócitos de larvas de *Cetonichema aeruginosa* (Coleoptera, Scarabaeidae): Envolvimento de granulócitos e oenocitóides na fagocitose in vivo. *Célula de tecido*. 2003;35:243–251. doi: 10.1016/S0040-8166(03)00037-5.

Goto H, Lindoso JAL (2010) Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther** 8(4) 419-433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

Gortner, Ross Aiken. The origin of the brown pigment in the integuments of the larva of *Tenebrio molitor*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 365-370, 1910.

Green, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x.

Gupta AP, Sutherland DJ Transformações in vitro do plasmatócito de inseto em alguns insetos. **J. Insect Physiol.** 1966;12:1369–1375. doi: 10.1016/0022-1910(66)90151-X.

Han SR, Lee BS, Jung KJ et al (2016) Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. **Regul Toxicol Pharm** 77: 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.006>

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH (2015) New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. **Dermatol Clin** 33 (3): 579-593. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>

Khan, M. A.; Philip, L. M.; Cheung, G.; Vadakepeedika, S.; Grasemann, H.; Sweezey, N.; Palaniyar, N. Regulating NETosis: Increasing pH Promotes NADPH Oxidase-Dependent NETosis. *Front. Med*, v. 5, n. 19, p. 1-15. 2018. DOI: 10.3389/fmed.2018.00019.

KOCH, M. S. *et al.* Aspectos gerais da mieloperoxidase e seu envolvimento em doenças: uma breve revisão / general aspects of myeloperoxidase and its involvement in diseases. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 28677-28691, 2021.

Koeter HB (1993) Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of in vitro studies. **Reprod Toxicol** 7: 117-123, [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(93\)90077-K](https://doi.org/10.1016/0890-6238(93)90077-K)

Klowden, M. J. Circulatory systems. In: **Physiological systems in insects**. San Diego, California: Academic Press, 2008. p.357-401.

Lavine, M. D.; Strand, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295-1309, 2002.

McGonigle JE, Purves J, Rolff J (2016) Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. **Dev Comp Immunol** 59: 34-38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.002>

Meyer O (2003) Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicol Lett** 140: 21-30. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00492-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00492-7)

Morey AT, de Souza FC, Santos JP et al (2016) Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. **Curr Pharm Biotechnol** 17(4): 365-375. <https://doi.org/10.2174/1389201017666151223123712>

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>.

Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidases have more functions than a swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 255–265. 2005. DOI: 10.1007/s00299-005-0972-6

Pérez-Torres I, Manzano-Pech L, Rubio-Ruíz ME, Soto ME, Guarner-Lans V. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders. *Molecules*. 2020 May 31;25(11):2555. doi: 10.3390/molecules25112555. PMID: 32486343; PMCID: PMC7321091.

Pushpakom, S.; et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, 2018.

Reis, A. C. S. M; Borges, D. P. L.; D'avila, V. G. F. C.; Barbosa, M. S.; Ternes, Y. M. F.; Santiago, S. B.; Santos, R. S. O cenário de políticas públicas do brasil diante do quadro das doenças negligenciadas. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**. v.3, n. 01, ISSN: 2447 9330, 2016.

Ribeiro, C.; Brehélin, M. Insect haemocytes: what type of cell is that?. **Journal of Insect Physiology**, v.52, p.417-429, 2006.

Romitelli, Federica et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1-2, p.

257-267, 2007. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.02.003.

Saeedi BJ, Hunter-Chang S., Luo L., Li K., Liu KH, Robinson BS Estresse oxidativo media danos a órgãos terminais em um novo modelo de toxicidade por acetaminofeno em *Drosophila*. Sci. Rep. 2022;12:19309. doi: 10.1038/s41598-022-21156-w.

Santos, C. S.; Gomes, A. M. T.; Souza, F. S.; Marques, S. C.; Lobo, M.P.; Oliveira, D. C. Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. Escola Anna Nery, v. 21, n. 1, Fev 2017.

Schulenburg H., Kurtz J., Moret Y., Siva-Jothy MT Introdução. Imunologia ecológica. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2009;364:3–14. doi: 10.1098/rstb.2008.0249.

Seo GW, Jo YH, Seong JH, Park KB, Patnaik BB, Tindwa H, Han YS. The Silencing of a 14-3-3 ϵ Homolog in *Tenebrio molitor* Leads to Increased Antimicrobial Activity in Hemocyte and Reduces Larval Survivability. Genes, 7(8), 53, 2016.

Stauber, L.A. (1958). Leishmaniasis in the hamster. In: Cole, W.H. (Ed.), Some Physiological Aspects and Consequence of Parasitism. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, p. 77–90.

Stokes WS (2002) Humane endpoint for laboratory animals used in regulatory testing. ILAR J 43: 31-38. https://doi.org/10.1093/ilar.43.Suppl_1.S31

Techer WE, Jr., Macklim AW, Szot RJ, Johnston RE, Elion GB, de Miranda P., Szczech GM Estudos de toxicologia pré-clínica com aciclovir: testes agudos e subcrônicos. Fundam. **Appl. Toxicol.** 1983;3:573–578. doi: 10.1016/S0272-0590(83)80107-9.

Urbański A., Adamski Z., Rosiński G. Alterações no desenvolvimento da morfologia dos hemócitos em resposta ao *Staphylococcus aureus* e às esferas

de látex no besouro *Tenebrio molitor* L. **Micron**. 2018;104:8–20. doi: 10.1016/j.micron.2017.10.005.

Vagaggini, C.; Pasqualini, C.; Simoni, S.; Francardi, V.; Dreassi, E. *Tenebrio molitor* as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. **Int. L.MOL. Sci** Pag.01-11,2023.

Van Der Valk T, Van Der Meijden A (2014) Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon** 88: 38-43.

Vignerot A, Jehan C, Rigaud T, Moret Y. Immune Defenses of a Beneficial Pest: The Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor*. **Front Physiol**. 2019 Mar 12;10:138. doi: 10.3389/fphys.2019.00138. PMID: 30914960; PMCID: PMC6422893.

Vlasova, I. I. Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control. **Molecules**, v. 23, n. 2561, p. 1-27. 2018. DOI: 10.3390/molecules23102561

Vommaro, M.L.; Kurtz, J.; Giglio, A. Morphological Characterisation of Haemocytes in the Mealworm Beetle *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionida), **Insects**,2021.

Wang X, Hao Q, Chen Y, Jiang S, Yang Q, Li Q (2015) The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J Insect Sci** 15 (1): 116. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev093>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados encontrados, conclui-se que:

- A substância ACV apresentou o maior poder de inibição de crescimento sobre as formas promastigotas *L. amazonensis*;
- A citotoxicidade das substâncias estudo OSV e ACV sobre macrófagos murinos é dependente da concentração, sendo o OSV a melhor substância por ter apresentado maior redução da viabilidade celular;
- As substâncias OSV e ACV, não apresentaram citotoxicidade para hemácia de carneiro nas concentrações analisadas, no período de 1 h de incubação, não sendo detectável o valor estando a CH_{50} ;
- As substâncias OSV e ACV reduziram estatisticamente a infecção dos macrófagos, porém com o OSV apresentando maior redução; As substâncias OSV e ACV foram capazes de promover um aumento significativo da capacidade fagocítica, sendo o OSV o que apresentou melhor ação de ativação de macrófagos;
- Nos ensaios *in vivo* as substâncias OSV e ACV apresentaram baixa citotoxicidade, foram capazes de reduzir a melanização, o perfil da mieloperoxidase e do nitrito em larvas de *T. molitor* com e sem infecção por *L. amazonensis* além de aumentar células do tipo plasmatócitos, granulócitos;
- O OSV e ACV aumentaram o processo de mitose e ativação de plasmatócitos, e foram capazes de reduzir a carga parasitária das formas amastigotas internalizadas.

Sabe-se que o tratamento das leishmanioses apresenta limitações nas terapias existentes e em novas opções de terapias, levando isso em consideração, a possibilidade de reposicionamento de fármacos é uma alternativa para o tratamento dessa doença e diante dos resultados encontrados neste estudo, as substâncias OSV e ACV apresentam-se promissoras para novos estudos de ensaios pré-clínicos e clínicos para o tratamento das Leishmanioses, especialmente da Leishmaniose Cutânea.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Akhtardanesh, B. *et al.* Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: serological and molecular study. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 54, n. 1, p. 96-102, 2017.

Alizadeh, B. H. *et al.* Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 341, n. 12, p. 787-93, Dec 2008.

Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern. C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v.7, n.5, 2012.

Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, Nov 2000.

Assis, L. H. C. *et al.* Cell cycle, telomeres, and telomerase in *Leishmania* spp.: What do we know so far? *Cells* (Basel, Switzerland), v. 10, n. 11, p. 3195, 2021.

Balasegaram, M. *et al.* Liposomal amphotericin B as a treatment for human Leishmaniasis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, 2012.

Barrett, M.P.; Croft, S.L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**. v. 104, n. 1, p. 175-196, dez 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bmb/lds031>>

Bates, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**. n. 37, ed. 10, p. 1097 – 106, ago 2007.

Batista; J. F. *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia*. v. 29, n. 4, 2020.

Benitez, N.A. *et al.* Spatial and simultaneous seroepidemiology of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dog owners and their dogs from randomly selected

households in a major city of southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.154, p.47-53, 2018.

Bhattacharya, S.K., Sinha, P.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Jha, T.K., Pandey, K., Das, V.R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V.P., Ranjan, A., Verma, R.B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N.K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Journal Infectious Diseases**, v.196, n.4, p.591-8, 2007. <https://doi.org/10.1086/519690>

Borghi, S.M. *et al.* *Leishmania* infection: painful or painless? **Parasitology research**, v. 116, p. 465-475, 2017.

Brai, A. *et al.* *Tenebrio molitor* as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2296, 24 jan. 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 189, 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico]. 3a. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740p.

Brasil. Nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Brasília: 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários.

Canteri DE Souza, P., et al. "An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*", **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 12 nov. 2018. DOI: 10.3390/jof4040125.

Chong, C.R; Sullivan, D.J. Jr; New uses for old drugs. **Nature**. Aug 9.2007 448:645. PubMed: 17687303, 2007.

Coffman, R.L. et al. IFN-g regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. **J. Immunol.**, v.140, p.1022-1027, 1988.

Coffman, R.L; Carty, J. A. T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by IFN-g. **J. Immunol.**, v.136, p.949-954, 1986.

Corral, M.J.; Moreno, I.; Toraño, A.; Domínguez, M.; Alunda, J.M. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 475–482, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.016>

Croft, S. L.; Coombs, G. H. Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

Davies, B. E. "Pharmacokinetics of Oseltamivir: An Oral Antiviral for the Treatment and Prophylaxis of Influenza in Diverse Populations." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 65, no. Supplement 2, 9 Mar. 2010, pp. ii5–ii10, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq015>

Depaquit, J. et al. Arthropod-borne viruses transmitted by *Phlebotomine* sandflies in Europe: a review. **Eurosurveillance**. v. 15, ed. 10, p. 19507, 2010. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19507>>

De Souza, P. C., et al. "*Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections", **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, 1 nov. 2015. DOI: 10.1016/J.MIMET.2015.10.004.

Ekins, S., Williams, A. J., Krasowski, M. D., & Freundlich, J. S. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7, p. 298-310, 2011.

Esposito, S. et al. Oseltamivir For Influenza Infection In Children: Risks And Benefits, **Expert Review of Respiratory Medicine**, 2015.

Garnier, T.; Croft, S.L. Topical treatment for Cutaneous Leishmaniasis. Current opinion in investigational drugs, 2002.

Ghaly, A. E.; Alkokaik, F. N. The yellow mealworm as a novel source of protein. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.4, p. 319-331, 2009.

Ghorbani, M.; Farhodi, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Des Devel Ther.** 12:25–40.2018.

Guido, Rafael V. C. et al. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. Estud. av., São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81-98. 2010.

Harhay, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 403-9, Sep 2011.

Hartley, M.-A. et al. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 99, jan. 2012.

Hartley MA, Drexler S, Ronet C, Beverley SM, Fasel N (2014) The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. **Trends Parasitol** 30(8):412–422.

Lainson, R.; Shaw, J.J. New World Leishmaniasis—the neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London: Arnold; 2005. p. 313–49.

Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Kayser, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n.2, p. 151-162, 2005.

Llindoso, J. A., Costa, J. M., Queiroz, I. T., & Goto, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, n. 1, p. 69–77, 2012.

Lima, G.S.; castro-pinto, D.B.; Machado. G.C.; Maciel, M.A.M.; Echevarria, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, p.1133–1137, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.08.012>

Loregian, A. et al. Separation methods for acyclovir and related antiviral compounds. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 764, n. 1–2, p. 289–311, nov. 2001.

Lozoya-Pérez, N. E. et al. *Tenebrio molitor* as an Alternative Model to Analyze the *Sporothrix* Species Virulence. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2059–2072, jun. 2021.

Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-45, set 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>>

Kato, K. C., Morais-Teixeira, E., Reis, P. G., Silva-Barcellos, N. M., Salaün, P., Campos, P. P. Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481– 488, 2014.

Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, p. 604-15, jul 2011. Disponível em: <[doi:10.1038/nrmicro2608](https://doi.org/10.1038/nrmicro2608)>

Klysik, K. et al. Acyclovir in the Treatment of Herpes Viruses – a Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1–18, 2018.

Kröncke, N. et al. Analysis of the Composition of Different Instars of *Tenebrio molitor* Larvae using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy for Prediction of Amino and Fatty Acid Content. **Insects**, v. 14, n. 4, p. 310–310, 23 mar. 2023.

Marlow, M. A. et al. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: New endemic areas in the southern frontier. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56177, 2013.

Maia-Elkhoury, A. N. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde**, v. 24, n. 12, p.2941-2947, 2008.

Maroli, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 27, n. 2, p. 123–47, ago 2013. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>

MARTINS CP, et al. Monitoramento epidemiológico como Instrumento de apoio à gestão de saúde: análise das notificações de leishmaniose visceral em Sobral, Ceará. *Rev. Adm. Saúde*–2018; 18(72).

McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Q J Med**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2013.

Meyerhoff, A. U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 42-48, 1998. <https://doi.org/10.1086/515085>

Moreira, D. et al. Leishmania infantum modulates host macrophage mitochondrial metabolism by hijacking the SIRT1-AMPK axis. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004684, 2015.

Moscona, A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *The new england vírus of medicine*, v. 353, n. 13, p. 1363–73, 2005.

Nicolson, C. *et al.* The ability of a non-egg adapted (cell-like) A(H1N1)pdm09 virus to egg-adapt at HA loci other than 222 and 223 and its effect on the yield of viral protein. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 166761, 2016.

Padhy, B.M; Gupta, Y.K; Drug re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **J Postgrad Med**; 57: 153-60, 2011.

Pushpakom, S.; et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, 2018.

Ready, P.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**. v. 6, p. 147-54, maio 2014.

Real, F. et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**. v. 20, ed. 6, p. 567-581, dez 2013. Disponível em: <<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1093/dnares/dst031>>

Reolon, J. B. et al. Co-encapsulation of acyclovir and curcumin into microparticles improves the physicochemical characteristics and potentiates in vitro antiviral action: Influence of the polymeric composition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 131, n. September 2018, p. 167–176, 2019.

Ribeiro, T.G.; Chávez-Fumagalli, M.G.; Valadares, D.G.; Franca, J.R.; Lage, P.S.; Duarte, M.C.; Andrade, P.H.R.; Martins, V.T.; Costa, L.E.; Arruda, A.L.A.; Faraco, A.A.G; Coelho, E.A.F.; Castilho, F.O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**. v. 143 p. 60–68, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.004>

Rocha, L.G.; Almeida, J.R.G.S.; Macedo, R.O.; Barbosa-Filho, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p. 514– 535, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.006>

Samson, M. et al. **Influenza vírus resistance to neuraminidase inhibitors**. N. 3, 2013.

Santos, D. O. et al. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1–10. 2008.

Schmidt, G.; Roberts, L.; Janovy, L. **Foundations of Parasitology**. 8. ed. [s.l.] McGraw-Hill Higher Education, 2012.

Sindermann, H.; Croft, S.L.; Engel, K.R.; Bommer, W.; Eibl, H.J.; Unger, C.; Engel, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, p. 173-180, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00430-003-0201-2>

Souza, C. *et al.* Análise da informação sobre a leishmaniose visceral disponível em portais brasileiros da rede mundial de computadores – Internet. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 352-357, 2008.

Souza, M. A., Almeida, T. M., Castro, M. C., Oliveira-Mendes, A. P., Almeida, A. F., Oliveira, B. C. American tegumentary leishmaniasis: mRNA expression for Th1 and Treg mediators are predominant in patients with recent active disease. **Immunobiology**, v. 221, n. 1, p. 253–259, 2016.

Spang, B. Insects as food: assessing the food conversion efficiency of the mealworm (*Tenebrio molitor*). Environmental study master thesis: The Evergreen State College, 2013.

Steverding, D. The history of Leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

Sundar, S.; Chakravarty, J. Uma atualização sobre farmacoterapia para leishmaniose. Opinião de Especialista em Farmacoterapia. 2014.

Susantakumar, P.; Gaur, A.; Sharma, P. Comparative pharmacokinetics, safety and tolerability evaluation of acyclovir 800 mg tablet in healthy indian adult volunteers under fasting and non-fasting conditions. **Journal of Bioequivalence and Bioavailability**, v. 3, n. 6, p. 128–138, 2011.

Teles, G. Da C.; Fonseca, F. R.; Gonçalves, M. J. F. American tegumentary leishmaniasis in the Brazilian Amazon from 2010 to 2014. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, 2019.

Thakur, L.; Singh, K. K.; Shanker, V.; Negi, A.; Jain, A.; Matlashewski, G.; Jain, M. Atypical leishmaniasis: a global perspective with emphasis on the Indian subcontinent. **PLoS Negl Trop Diseases**, v. 12, n. 9, 2018.

Trevijano-Contador, N., Zaragoza, O. "Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens". **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 454–456, 15 maio 2014. DOI: 10.4161/viru.28775.

Uliana, S.R.B. et al. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**. 145, 464-480. 2018.

Vélez, I.D et al. Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. 2009.

Vincent Rajkumar, S. The high cost of prescription drugs: causes and solutions, **Blood Cancer Journal**. v. 10, n. 6, 2020.

Wilson, R. Blood-fed *Lutzomyia longipalpis* sandfly. **PLoS Pathogens Issue Image**, v. 5, n. 8, 2009.

World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. World Health Organization Geneva, v. 92, p. 557–572, 2017

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis. 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>>. Acesso em: 13 de out 2024.

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis. Number of cases of visceral Leishmaniasis reported: 2023. 2022a. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/Leishmaniasis/Leishmaniasis.html>. Acesso em: 13 de out 2024.

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis. Number of cases of cutaneous Leishmaniasis reported: 2023. 2022b. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/Leishmaniasis/Leishmaniasis.html>. Acesso em: 13 de out 2024.

World Health Organization - WHO. Integrating neglected tropical diseases in global health and development: Fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2022.

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis Fact Sheet. Disponível em: .
Acesso em: 1 abr. 2024.

Yu, X.; HE, Q.; Wang, D. Dynamic Analysis of Major Components in the Different Developmental Stages of *Tenebrio molitor*. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 20 set. 2021.

Zulfiqar, B.; Shelper, T.B.; Avery, V.M. Leishmaniasis drug discovery: recente progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**. v. 22, n. 10, p. 1516-31, out 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>>

9 ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da atividade antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e antioxidante do Oseltamivir e Aciclovir**", registrada sob o nº 750/2022, sob a responsabilidade do Prof. Dr. MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES do Departamento de Morfofisiologia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/12/2022**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	16/01/2023 a 31/12/2026
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo isogênico/Balb/c Ovino/Carneiro
Nº de Animais	94 1
Peso/ Idade	20 a 22 g/1 mês 80 kg/ 2 anos
Sexo	89 Fêmeas e 5 Machos
Origem	Os camundongos serão provenientes do Biotério central do Centro de Ciências Agrárias (CCA). O Carneiro será proveniente do Biotério central do Centro de Ciências Agrárias (CCA).
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Camundongos: Serão mantidos no Biotério do Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais (NPPM). Carneiro: Será mantido no Biotério do Centro de Ciências Agrárias (CCA).
Grau de Invasividade	1

Teresina, 09 de Janeiro de 2023.

Profa. Dra. Veruska Cavalcanti Barros
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - CMPP/UFPI