



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

VICTÓRIA HANNAH ARAÚJO DE ALMEIDA PASSOS

**USO DE FORMULAÇÃO TÓPICA NANOESTRUTURADA DE OSELTAMIVIR NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM CAMUNDONGOS
BALB/c INFECTADOS COM *Leishmania major***

TERESINA – PI
2024

VICTÓRIA HANNAH ARAÚJO DE ALMEIDA PASSOS

**USO DE FORMULAÇÃO TÓPICA NANOESTRUTURADA DE OSELTAMIVIR NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM CAMUNDONGOS
BALB/c INFECTADOS COM *Leishmania major***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em exame de defesa e obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves

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

- P289u Passos, Victória Hannah Araújo de Almeida.
 Uso de formulação tópica nanoestruturada de oseltamivir no tratamento da leishmaniose tegumentar em camundongos BALB/C infectados com *Leishmania major*. / Victória Hannah Araújo de Almeida Passos. -- 2025.
 65 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2025.
 “Orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves.”
1. Antiviral. 2. Leishmaniose. 3. Microemulsão. 4. Reposicionamento de fármaco. I. Alves, Michel Muálem de Moraes. II. Título.

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL
Campus Universitário “Ministro Petrônio Portella” – Bairro Ininga
CEP 64049-550 – Teresina-PI e-mail: ppgtair@ufpi.edu.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado de **Victória Hannah de Almeida Passos**, Aos quatorze dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e cinco, às 09:30 horas, reuniu-se, a Banca Examinadora da Defesa de Mestrado composta pelos Professores doutores; Michel Muálem de Moraes Alves –Universidade Federal do Piauí, Presidente; Francisco de Assis Leite Souza – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Examinador; Luanna Soares de Melo Evangelista –Universidade Federal do Piauí, Examinadora; perante a qual **Victória Hannah de Almeida Passos**, discente regularmente matriculada no Curso de Mestrado em Ciências, área Medicina Veterinária, do Programa de Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional – PPGTAIR, da Universidade Federal do Piauí, defendeu, para preenchimento do requisito de mestre, sua Dissertação intitulada “USO DE FORMULAÇÃO TÓPICA NANOESTRUTURADA DE OSELTAMIVIR NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *Leishmania major*” A defesa da referida dissertação ocorreu das 09:30 às 12 horas, tendo a mestranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo determinado para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a mestranda APROVADA (Aprovado/Reprovado).


Eu, **Michel Muálem de Moraes Alves**, que presidi a Banca de Defesa da Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Teresina-PI, 14 de março de 2025.

Documento assinado digitalmente
 MICHEL MUALEM DE MORAES ALVES
Data: 17/03/2025 20:36:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves
Universidade Federal do Piauí
(Presidente)

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO DE ASSIS LEITE SOUZA
Data: 18/03/2025 23:20:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco
(Examinador)

Documento assinado digitalmente
 LUANNA SOARES DE MELO EVANGELISTA
Data: 19/03/2025 17:04:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Luanna Soares de Melo Evangelista
Universidade Federal do Piauí
(Examinadora)

Dedico esta Dissertação a minha avó Nelze dos Passos Almeida (*in memoriam*), que durante toda a sua vida distribuiu amor por todos os lugares onde esteve.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pela força, sabedoria e paciência que me concedeu ao longo desta jornada. Sem a Sua orientação e bênçãos, não teria sido capaz de enfrentar os desafios, superar as dificuldades e chegar até aqui. Agradeço pela oportunidade de realizar este trabalho e pela fé que sempre me guiou, mantendo-me focada e determinada. Sou eternamente grata por Sua presença constante em minha vida.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de muitas pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a sua realização, é a prova de que o esforço coletivo movimenta a ciência. A cada um, minha mais profunda gratidão.

Agradeço ao meu orientador, Michel Muálem, pela orientação excepcional, paciência e confiança ao longo de todo o processo de pesquisa. Sua sabedoria, comprometimento e dedicação foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse. Sua visão crítica e estimulante foi o farol que guiou meus passos nesta jornada acadêmica. Sua orientação foi essencial para que esse trabalho ganhasse forma e profundidade. Agradeço também pela confiança e pela liberdade para explorar minhas ideias, sempre com a segurança de que seu olhar atento ajudaria a aprimorá-las.

Agradeço também ao professor Fernando Aécio pelas valiosas contribuições, pela atenção e pelos comentários construtivos que enriqueceram minha reflexão e aprimoraram este estudo. Sou imensamente grata pelos comentários perspicazes e momentos de descontração.

Aos meus familiares, especialmente meus pais e irmãs, Genivaldo, Nanci, Raissa e Sarah, minha gratidão infinita pelo amor incondicional, pelo apoio constante e pela compreensão, especialmente nos momentos de dificuldade. Sem todo esse incentivo, esta conquista não teria sido possível. Posso dizer com certeza que vocês sempre foram o alicerce da minha trajetória, me ensinaram o valor do esforço, da disciplina e da persistência, muito obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando eu duvidava das minhas próprias forças. A vocês, minha fonte inesgotável de amor e apoio.

Aos meus amigos e colegas de pesquisa do Laboratório Bioleish, em especial Pastora e Paulline, agradeço pela companhia nas horas de dúvida e pela troca constante de ideias que enriqueceram minha jornada acadêmica, mas acima disso, pelos conselhos, cuidado e acolhimento, com vocês me senti constantemente amparada. Aos meus amigos da vida, que viveram comigo essa jornada intensa, Rafael e Amanda, jamais serei suficientemente grata por todo o amparo, vocês representam uma extensão da minha família, são aqueles que sempre estiveram presentes, nas horas de alegria e também nos momentos de insegurança, quando o

cansaço ameaçava tomar conta. Vocês foram a minha base de sustentação emocional, aqueles com quem pude compartilhar dúvidas, medos e, principalmente, vitórias.

Agradeço aos meus pupilos, Vinicius e Carol, que, com imenso empenho e dedicação, estiveram disponíveis dia e noite durante 21 dias consecutivos para auxiliar nas etapas cruciais do tratamento experimental. Sou imensamente grata por poder contar com futuros profissionais tão comprometidos e apaixonados pela ciência.

Gostaria de agradecer ao Professor André Luís e aos Doutores Gláucia Lais e Matheus Oliveira, que, com generosidade e dedicação, abriram as portas do LADERMO e LIMAV, e me auxiliaram em todos os passos da formulação da microemulsão, que foi base para este trabalho. O apoio técnico e científico de todos foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço também ao técnico Guerra, que não apenas me ajudou com as lâminas do histopatológico, mas também teve a paciência de me ensinar cada passo dessa etapa crucial para a pesquisa. Além disso, sou grata pelas conversas e pela amizade que, ao longo dessa jornada, se formou.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR), pela oportunidade de fazer parte do meio acadêmico e científico. Agradeço profundamente aos professores e colegas de pesquisa que contribuíram para o meu desenvolvimento intelectual e profissional durante toda a minha trajetória acadêmica. A interação com todos no programa foi fundamental para o aprimoramento deste trabalho e para a minha formação.

Agradeço também à CAPES pelo fomento no mestrado, que foi essencial para o andamento deste estudo. O apoio financeiro e institucional permitiu que eu me dedicasse integralmente à pesquisa e que alcançasse os resultados aqui apresentados. Sem seu suporte este trabalho não teria sido possível.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, seja com palavras de encorajamento, com ajuda prática ou apoio emocional.

A todos vocês, meu mais sincero e profundo agradecimento.

“Existem muitas hipóteses na ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, estando entre as cinco doenças negligenciadas mais importantes. Estudos recentes indicam que a gravidade das leishmanioses em diferentes espécies pode ser influenciada pela presença do Leishmania RNA Virus (LRV 1 e LRV 2). Ambos os vírus de RNA aumentam a replicação do parasita, sua patologia e a gravidade das lesões. Os medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses são limitados, onerosos, de administração parenteral, com duração relativamente longa e relatos de resistência parasitária. A pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos podem levar décadas; nesse contexto, o reposicionamento de fármacos se apresenta como uma opção para reduzir tempo e custos financeiros, pois consiste em explorar uma nova atividade farmacológica para uma substância já utilizada. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial terapêutico in vivo do antiviral Oseltamivir (OSV) em microemulsão de uso tópico para o tratamento da leishmaniose tegumentar cutânea em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*, tanto como monoterapia quanto em combinação com a Anfotericina B convencional. As formulações foram preparadas e testadas quanto às características estruturais e organolépticas, além da cinética de liberação. Os camundongos BALB/c (CEUA/UFPI 750/2022) foram infectados na região da base da cauda com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. major*. Após 40 dias, os animais foram divididos em cinco grupos (n = 8): controle (tratado com microemulsão vazia), Anf B 3%, OSV 0,5%, OSV 1%, e OSV 1% + Anf B 1,5%. Os animais foram tratados duas vezes ao dia, por 21 dias consecutivos, com 50 µL da formulação tópica, e foram avaliados clinicamente quanto ao peso e ao tamanho das lesões. A eutanásia para coleta de material biológico e ensaios *ex vivo* foi realizada ao final do tratamento. A carga parasitária foi avaliada utilizando a técnica de diluição limitante e, após 5 dias de cultura, foi observada a presença ou ausência das formas promastigotas. O sangue coletado foi utilizado para ensaios de hematócrito e bioquímicos. Os tamanhos médios das lesões dos grupos ao final do tratamento foram 6,85 mm, 4,52 mm, 4,40 mm, 5,05 mm e 4,82 mm para os grupos Controle, Anf B 3%, OSV 0,5%, OSV 1% e OSV 1% + Anf B 1,5%, respectivamente. Quanto à carga parasitária nos camundongos, observou-se uma redução significativa nos parasitas recuperados do local da lesão, especialmente nos grupos Anf B 3%, OSV 0,5%, OSV 1% e OSV 1% + Anf B 1,5%, quando analisados em escala logarítmica, com respectivos percentuais de 70%, 76,5%, 72,5% e 70%. O grupo tratado com Anf B 3% exibiu toxicidade, conforme indicado pelo aumento nos níveis das enzimas bioquímicas correspondentes às funções renal e hepática, ao contrário dos grupos tratados com Oseltamivir, tanto como monoterapia quanto em combinação com Anfotericina B, que apresentaram níveis normais de enzimas séricas. Todos os grupos de tratamento mostraram redução no hematócrito; no entanto, os grupos tratados com Oseltamivir demonstraram uma diminuição menos pronunciada. Todos os grupos mantiveram o peso corporal dentro dos intervalos normais. No exame histopatológico, os grupos de Oseltamivir apresentaram menores graus de alterações histopatológicas. Os grupos tratados com Oseltamivir, tanto como monoterapia quanto em combinação com Anfotericina B, mostraram resultados terapêuticos semelhantes ao grupo tratado com anfotericina B convencional. Em contraste com a Anfotericina B, esses grupos não apresentaram qualquer toxicidade. Portanto, o uso de Oseltamivir, tanto como monoterapia quanto em combinação com Anfotericina B, é promissor para o tratamento da leishmaniose tegumentar cutânea.

Palavras-chave: Leishmaniose; antiviral; reposicionamento de fármaco, microemulsão.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, and they are among the five most important neglected diseases. Recent studies indicate that the severity of leishmaniasis in different species may be influenced by the presence of Leishmania RNA Virus (LRV 1 and LRV 2). Both RNA viruses increase parasite replication, pathology, and the severity of lesions. The medications used in the treatment of leishmaniasis are limited, costly, require parenteral administration, have relatively long treatment durations, and there are reports of parasitic resistance. Research and development of new drugs can take decades. In this context, drug repositioning appears as an option to reduce time and financial costs, as it involves exploring new pharmacological activities for substances already in use. The aim of this study was to investigate the *in vivo* therapeutic potential of the antiviral Oseltamivir (OSV) in topical microemulsion for the treatment of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice infected with *Leishmania major*, both as monotherapy and in combination with conventional Amphotericin B (Amf B). The formulations were prepared and tested for structural and organoleptic characteristics, as well as release kinetics. BALB/c mice (CEUA/UFPI 750/2022) were infected at the tail base with 1×10^6 metacyclic promastigotes of *L. major*. After 40 days, the animals were divided into five groups (n = 8): control (treated with empty microemulsion), Amf B 3%, OSV 0.5%, OSV 1%, and OSV 1% + Amf B 1.5%. The animals were treated twice a day for 21 consecutive days with 50 μ l of the topical formulation, and were clinically evaluated for weight and lesion size. Euthanasia for biological material collection and *ex vivo* assays was performed at the end of the treatment. The parasitic load was evaluated using the limiting dilution technique, and after 5 days of culture, the presence or absence of promastigote forms was observed. The collected blood was used for hematocrit and biochemical assays. The average lesion sizes of the groups at the end of the treatment were 6.85 mm, 4.52 mm, 4.40 mm, 5.05 mm, and 4.82 mm for the Control, Amf B 3%, OSV 0.5%, OSV 1%, and OSV 1% + Amf B 1.5% groups, respectively. Regarding the parasitic load in the mice, a significant reduction in parasites recovered from the lesion site was observed, especially in the Amf B 3%, OSV 0.5%, OSV 1%, and OSV 1% + Amf B 1.5% groups, when analyzed on a logarithmic scale, with respective percentages of 70%, 76.5%, 72.5%, and 70%. The group treated with Amf B 3% exhibited toxicity, as indicated by increased levels of biochemical enzymes corresponding to renal and hepatic functions. In contrast, the groups treated with Oseltamivir, both as monotherapy and in combination with Amphotericin B, showed normal serum enzyme levels. All treatment groups showed a reduction in hematocrit; however, the groups treated with Oseltamivir demonstrated a less pronounced decrease. All groups maintained total body weight within normal ranges. Histopathological examination revealed that the Oseltamivir-treated groups had less severe histopathological alterations. The groups treated with Oseltamivir, both as monotherapy and in combination with Amphotericin B, showed therapeutic results similar to the group treated with conventional Amphotericin B. In contrast to Amphotericin B, these groups did not show any toxicity. Therefore, the use of Oseltamivir, both as monotherapy and in combination with Amphotericin B, is promising for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; antiviral; drug repositioning; microemulsion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Leishmaniose cutânea disseminada.....	19
Figura 2. Casos de LC por Unidade Federativa em 2022.....	20
Figura 3. Distribuição dos casos de LC nas regiões do Brasil de 2013 a 2022.....	21
Figura 4. Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i>	22
Figura 5. Ciclo biológico da leishmaniose.....	24
Figura 6. Relação das enzimas arginase e óxido nítrico sintase e seus efeitos na <i>Leishmania</i>	26
Figura 7. Etapas do processo de produção e distribuição de novos fármacos.....	29
Figura 8. Fórmula molecular do Oseltamivir.....	31
Figura 9. Mecanismo de ação do Oseltamivir pela inibição da neuraminidase.....	31
Figura 10. Vias de permeação cutânea de fármacos através do estrato córneo.....	33
Figura 11. Estruturas das microemulsões.....	34
Figura 12. Locais de execução do trabalho.....	36
Figura 13. Espalhabilidade antes e depois do ciclo gelo-degelo.....	44
Figura 14. Perfis de liberação <i>in vitro</i> das formulações.....	45
Figura 15. Avaliação do tamanho lesional dos camundongos BALB/c infectados por <i>L. major</i> e tratados com formulações tópicas.....	46
Figura 16. Aspecto das lesões leishmanióticas ao final do tratamento.....	47
Figura 17. Avaliação da carga parasitária de camundongos BALB/c após o tratamento.....	48
Figura 18. Fotomicrografias das lesões cutâneas leishmanióticas de camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i> e submetidos a tratamentos tópicos distintos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das formulações enquanto microemulsões.....	42
Tabela 2. Caracterização e estabilidade preliminar das formulações.....	43
Tabela 3. Avaliação da toxicidade do tratamento dos camundongos infectados por <i>L. major</i> ...	48
Tabela 4. Avaliação dos níveis de comprometimento tecidual mediante os diferentes tratamentos tópicos instituídos aos camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ANF B	Anfotericina B
ATP	Adenosina trifosfato
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
GTP	Guanosina trifosfato
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN-γ	Interferon gama
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LRV	Leishmania RNA vírus
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MA	Antimoniato de meglumina
ME	Microemulsão
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSV	Oseltamivir
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação em cadeia polimerase
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SIGLECS	Lectinas Semelhantes à Imunoglobulina de Ligação ao Ácido Siálico
SIA_s	Sinalização de Moléculas Associadas ao Sistema Imunológico
SSG	Solução de Antimoniato de N-metilglucamina
SVSA	Sistema de Vigilância de Saúde Animal
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TLR3	Receptor Toll-like 3
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	“World Health Organization” - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 As leishmanioses	19
3.1.1 Epidemiologia.....	20
3.1.2 Agente etiológico.....	22
3.1.3 Ciclo biológico	22
3.1.4 Virulência	24
3.1.5 Tratamentos convencionais	27
3.2 Reposicionamento de fármacos	28
3.2.1 Antivirais	29
3.2.2 Oseltamivir	30
3.3 Formas farmacêuticas tópicas	32
3.3.1 Nanotecnologia.....	33
3.3.2 Microemulsões	34
4 METODOLOGIA	36
4.1 Local de execução e aquisição de substâncias	36
4.2 Preparo e caracterização das formulações	37
4.3 Cinética de liberação <i>in vitro</i> das formulações	38
4.4 Parasitas e animais utilizados	38
4.5 Infecção dos animais e grupos de tratamento	39
4.6 Tratamento e avaliação clínica	39
4.7 Avaliação de carga parasitária	40
4.8 Análises laboratoriais	40
4.9 Análise histopatológica	41
4.10 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Caracterização das formulações	42
5.2 Cinética de liberação <i>in vitro</i> das formulações	42
5.3 Avaliação clínica	45
5.4 Avaliação de carga parasitária	47

5.5 Análises laboratoriais	48
5.6 Análise histopatológica	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58