



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAROLINA JACOB RODRIGUES

**SECREÇÃO/EXCREÇÃO LARVAL DE DÍPTEROS DA
ESPÉCIE *LUCILIA CUPRINA* INDUZ MORTE EM FORMAS
PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA
AMAZONENSIS***

Londrina
2020

ANA CAROLINA JACOB RODRIGUES

**SECREÇÃO/EXCREÇÃO LARVAL DE DíPTEROS DA
ESPÉCIE *LUCILIA CUPRINA* INDUZ MORTE EM FORMAS
PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA
AMAZONENSIS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Wander R. Pavanelli

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R696s Rodrigues, Ana Carolina Jacob.
Secreção/excreção larval de dípteros da espécie *Lucília cuprina* induz morte em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* / Ana Carolina Jacob Rodrigues. - Londrina, 2020.
60 f. : il.

Orientador: Wander R. Pavanelli.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose - Tese. 2. Terapia Larval - Tese. 3. Calliphoridae - Tese. 4. Apoptose-Like - Tese. I. Pavanelli, Wander R. . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

ANA CAROLINA JACOB RODRIGUES

**SECREÇÃO/EXCREÇÃO LARVAL DE DíPTEROS DA
ESPÉCIE *LUCILIA CUPRINA* INDUZ MORTE EM FORMAS
PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA
AMAZONENSIS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wander R. Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Danielle Lazzarin Bidoia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me amparado e me guiado até chegar aqui, por ser meu melhor amigo e agüentar minhas lamúrias e lamentações e nunca, nunca ter me abandonado nem mesmo em momentos onde minha fé estava fraca.

Ao prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli, por ter me acolhido no laboratório e apostado em mim mesmo quando eu não sabia muita coisa, pelos puxões de orelha que me tornaram uma pessoa mais madura e responsável, e que ainda tem muito o que aprender.

A prof^a. Dra Ivete Conchon-Costa, pelo apoio e incentivo e por transmitir todo seu conhecimento em pesquisa e me ensinar muito sobre Leishmaniose.

A prof^a Dra. Idessania Nazareth Costa, por anos atrás me inspirar a seguir carreira como parasitologista e por me acolher tão bem no laboratório.

A prof^a Dra. Milena Menegazzo Miranda-Sapla e ao Romeo, por terem alegrado os dias no laboratório, por ter me ensinado coisas valiosas como pesquisadora e ser humano e pela amizade.

A prof^a Dra. Danielle Lazarin Bidoia por estar sempre disposta e presente para auxiliar em todos os momentos da reta final dessa produção.

Aos meus amigos de laboratório: Amanda Carloto, Manoela Gonçalves, Virgínia Concato, Fernanda Tomiotto- Pelissier, Tatiane Fagundes, Mariana Detoni, Taylon Silva, Ana Flávia Ganazzi, Raquel Sanfelice, Elaine Siqueira, Alex Alves por serem mais que colegas de trabalho, por serem amigos, parceiros, por me apoiarem nos momentos mais difíceis da minha vida e nunca me deixarem desistir ou duvidar de mim mesmo, por compartilharem momentos únicos de alegria, diversão e até as marmitas.

Em especial agradeço a Bruna Bortoleti, por ser como uma irmã, por estar ao meu lado em todos os momentos dentro e fora do laboratório, por ser luz e por fazer todos os meus dias felizes simplesmente por saber que eu não estou sozinha.

Aos alunos de Iniciação científica do laboratório por sempre se mostrarem dispostos a nos ajudar nas tarefas do laboratório.

Aos técnicos Jesus Vargas (Zui) e Pedro Sebastião, por todo o suporte e atenção que tiveram comigo, e por me auxiliarem no início dos experimentos.

A todos os docentes do programa de Patologia Experimental.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia.

Aos técnicos da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), por contribuírem com a beleza do trabalho.

A Capes e CNPQ pela bolsa concedida e pela contribuição com a nossa pesquisa.

A banca examinadora prof^a. Dra. Danielle Lazarin e prof^a. Dra. Lucy Yamauchi, por dedicarem seu tempo a leitura do meu trabalho para contribuição e melhoria do mesmo.

A minha mãe Maria Inês Jacob, pai Rogério Camargo Rodrigues e avós Anerci e Odacyr Rodrigues que fizeram o possível e o impossível para que meu sonho se tornasse realidade. Por me apoiarem em momentos de angústia, e compartilharem os momentos de felicidade, e principalmente, por acreditarem em mim.

Aos meus tios Márcia Jacob e Genilson Rodrigues e a todos os familiares que dividiram comigo as vitórias, que estiveram do meu lado sempre, mesmo que a distância.

A minha família londrinense Fernanda Rasquel, Ana Laura Oliva e Maria Paula Gonçalves, por dividirem comigo não só o lar, mas a vida também e me fazerem sentir sortuda por ter pessoas tão iluminadas ao meu lado.

Aos meus colegas de sala pela parceria de sempre e por terem tornado “fácil” passar pelo temido período de disciplinas da Patologia, obrigada por cuidarem de mim quando eu não conhecia nada.

Aos meus amigos Nayara Anitelli, Daniele Munhoz, Ana Carolina Andrade, Laís Rocha, Laura Marquioli, João Ferreira, Vitor Hugo Garcia, Jéssica Belotti, Fernanda Moraes, Bruna Almeida, Raphael Moura, Maria Paula Gonçalves, Débora Moreno, Gabriela Pascon, Fábio Luis, Marcele Kaczanoski que mesmo espalhados cada um em um canto do mundo sempre se fizeram presentes e foram essenciais pra que hoje eu estivesse aqui.

A todos os citados e prováveis esquecidos, mas não menos importantes, deixo o meu muito obrigada.

“ Não fui eu que lhe ordenei?
Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se
desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará
com você por onde você andar”

Josué 1:9

RODRIGUES, Ana Carolina Jacob. **Secreção/excreção larval de dipteros da espécie *Lucilia cuprina* induz morte em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis***. 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2020.

RESUMO

Larvas de moscas da família Calliphoridae são estudadas desde a antiguidade por seu poder de desbridamento de feridas e cicatrização. Excreção/Secreção (ES) larval é uma substância extraída de glândulas salivares e intestinais de larvas que apresenta atividade microbicida. O estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de ES larval de *Lucilia cuprina* frente à formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Foram utilizadas concentrações de 0,8-75 µg/mL para avaliação da atividade anti-promastigota por contagem em câmara de Neubauer. Nos experimentos posteriores com promastigotas foram utilizados os valores de IC50 (2 µg/mL) e 2xIC50 (4 µg/mL). Foi avaliada a morfologia do parasito por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), e para determinar o mecanismo de morte do parasito, foram realizados testes fluorimétricos através da sonda Diacetato de 2', 7'- diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA), Tetrametilrodamina, etil ester (TMRE), Vermelho do Nilo, Anexina V e Iodeto de Propídio (IP), e em formas amastigotas foi realizado ensaio fagocítico e mensuração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) total e Óxido Nítrico (ON). ES larval foi capaz de inibir a viabilidade de *L. amazonensis* em todas as concentrações e induziu alteração da morfologia do parasito, sendo observado retração do corpo celular, flagelo duplo, formação de bolhas na membrana e extravasamento de conteúdo intracelular. Levou ao aumento na produção de ERO, despolarização da membrana mitocondrial, formação de corpos lipídicos citoplasmáticos e exposição de fosfatidilserina indicando uma possível morte por apoptose-like. Em amastigotas o tratamento com ES larval reduziu a porcentagem de infecção em células de linhagem macrófaga J774A.1 em todas as concentrações, aumentando a produção de ERO, indicando uma possível morte por estresse oxidativo.

Palavras-chave: Leishmaniose. Terapia Larval. Calliphoridae. Mecanismo de morte. Apoptose-Like.

RODRIGUES, Ana Carolina Jacob. **Larval secretion / Excretion of dipters of the species *Lucilia cuprina* induces death in promastigot and amastigot forms of *Leishmania amazonensis*.** 2020. 58 p. Dissertation (Master in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina 2020.

ABSTRACT

Bowfly larvae of the Calliphoridae family have been studied since antiquity for their power to debride wounds and heal. Larval secretion/excretion is a substance extracted from salivary and intestinal glands of larvae that has microbicidal activity. The study aimed to evaluate the efficacy of *Lucilia cuprina* larval es against the *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. Concentrations of 0.8-75 µg/ml were used to assess direct anti-promastigote activity by counting in a neubauer chamber. In subsequent experiments, the ic₅₀ (2 µg / ml) and 2x_{ic50} (4 µg / ml) values were used. The parasite morphology was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM), and to determine the parasite's death mechanism, fluorimetric tests were performed using a 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE), Nile Red, Annexin V and PI, and in amastigote forms a phagocytic test and measurement of total ROS and NO was performed. Es larval was able to inhibit the viability of *L. amazonensis* at all concentrations and induced changes in the parasite's morphology, retraction of the cell body, double flagellum, formation of bubbles in the membrane and extravasation of intracellular content. It led to an increase in the ROS production, depolarization of the mitochondrial membrane, formation of cytoplasmic lipid droplets and exposure of phosphatidilserin, indicating a possible death by apoptosis-like. In amastigotes, treatment with ES larval reduced the percentage of infection and amastigotes/macrophage number in cells of lineage J774A.1 in all concentrations, increasing the ROS production , indicating a possible death from direct damage oxidative.

Keywords: Leishmaniasis. Larval Therapy. Calliphoridae. Death Mechanism. Apoptose-Like

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.....16

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Figura 1 Atividade de ES larval sobre promastigotas de *L. amazonenses*...44

Figura 2 Danos morfológicos e ultraestruturais em promastigotas de *L. amazonenses*.....45

Figura 3 Mecanismos de morte induzidos por ES larval em promastigotas de *L. amazonensis*48

Figura 4 Tratamento com ES larval de *Lucilia cuprina* induz autofagia e apoptose like em formas promastigotas de *L. amazonenses*.....51

Figura 5 Citotoxicidade em linhagens celulares J774A.1 e VERO e eritrócitos ovinos53

Figura 6 Atividade de ES larval sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*55

Figura 7 Tratamento com ES larval aumenta produção de TNF- α e ERRO em macrófagos infectados58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LC	Leishmaniose Cutânea
WHO	do inglês World Health Organization
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificações
LCM	Leishmaniose cutaneomucosa
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LV	Leishmaniose visceral
LPG	Lipofosfoglicano
PCR	do inglês Polymerase chain reaction
qPCR	do inglês Polymerase chain reaction quantitative real time
DNA	do inglês Deoxyribonucleic acid
kDNA	Deoxyribonucleic acid kinetoplast
APCs	Células apresentadoras de antígeno
CD	Células Dendríticas
iNOS	NO sintase induzível
IFN	Intérferon
IL	Interleucina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ERO	Espécies reativas de oxigênio
CXCL10	CXC quimiocina 10
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
AmB	Anfotericina B
L- Amb	Anfotericina B lipossomal
Sb	Antimônio
TL	Terapia Larval
ES	Excreção/Secreção
AMPs	Peptídeos antimicrobianos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEISHMANIOSE	13
1.2	AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	14
1.3	INTERAÇÃO PARASITO- HOSPEDEIRO	16
1.4	DIAGNÓSTICO	19
1.5	TRATAMENTO	20
1.6	EXCREÇÃO/SECREÇÃO LARVAL.....	22
1.7	PRINCIPAIS COMPONENTES DESCRITOS DE ES LARVAL	24
2	OBJETIVOS	
2.1	OBJETIVOS GERAIS	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	27
	CONCLUSÃO	56
	REFERENCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença transmitida por insetos vetores flebotomíneos, causada por protozoários intracelulares de mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (CDC, 2019). As manifestações clínicas decorrentes da leishmaniose variam de acordo com a espécie do parasito, abrangendo desde lesões cutâneas auto curáveis até doenças viscerais letais, e isto é determinado pela biologia do parasito em conjunto com o sistema imune do hospedeiro (LABONY ET AL., 2014).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais frequente de leishmaniose, e tem como características a formação de lesões ulcerosas únicas ou múltiplas, indolores, localizadas na derme, geralmente com epiderme ulcerada, tipicamente caracterizadas por bordas elevadas, contornos regulares e fundo granuloso com presença ou não de exsudato purulento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017), que podem causar a incapacidade de indivíduos infectados. Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorre nas Américas, Oriente Médio e Ásia. O Brasil está entre os seis países de maior incidência de casos de LC relatados no ano de 2017. Estima-se que essa forma de leishmaniose acometa de 600.000 a 1 milhão de novos casos no mundo todos os anos (WHO, 2019).

Nas Américas, a forma cutânea é denominada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), na qual apresentam manifestações que variam desde a formação de úlcera única a formas disseminadas na pele, podendo ou não acometer mucosas. A LTA é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das seis doenças infecciosas de maior importância quando se trata de saúde pública, pelo alto índice de casos e magnitude e pelo reflexo econômico e social, por ser considerada uma doença ocupacional, com alto índice de morbidade e com relatos em todas as regiões brasileiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Outra forma de manifestação da doença é a Leishmaniose Cutânea mucosa (LCM), que geralmente é secundária à Leishmaniose cutânea, tem sintomatologia grave, podendo levar a destruição parcial ou completa de membranas mucosas da garganta, boca e nariz. O Brasil está entre os 4 países que juntos concentram 90% dos casos dessa forma da doença (WHO, 2019).

1 A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), é uma manifestação clínica de
2 LTA, normalmente causada por parasitos da espécie *L. amazonensis*, tem como
3 característica lesões não ulceradas espalhadas pelo corpo, com grande número de
4 amastigotas que se multiplicam descontroladamente, assumindo a evolução de
5 caráter crônico e progressivo que persiste por toda a vida do paciente. Apesar de
6 geralmente não causar dor, a LCD é uma doença desfigurante e de impacto
7 socioeconômico, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, CHRISTENSEN et al., 2019).

8 Outra manifestação clínica e potencialmente grave é a Leishmaniose
9 Visceral (LV), também conhecida como calazar, que em cerca de 95% dos casos é
10 fatal se não tratada. Tem como principais características em humanos: febre,
11 emagrecimento, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia. A doença é endêmica
12 em países do velho mundo e nas Américas. Estima-se que entre 50.000 e 90.000
13 novos casos de LV ocorram no mundo anualmente, no entanto, apenas 25 a 45%
14 são notificados a OMS (WHO, 2019).

15 A Leishmaniose dérmica pós-calazar é uma complicação da LV em áreas onde a
16 *Leishmania donovani* é endêmica. Tem por característica erupção macular,
17 maculopapular e nodular hipopigmentada, geralmente em pacientes que se
18 recuperaram da LV. A doença pode ter cura espontânea em alguns casos, no
19 entanto, é considerada de grande importância na transmissão da doença em
20 períodos interepidêmicos, servindo como reservatório de parasitos em pacientes
21 com cura clínica e não parasitológica. (WHO, 2019).

22 23 **1.2 Agente etiológico e ciclo biológico**

24 Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos ao seres humanos
25 pela picada do inseto flebotômico fêmea pertencentes à ordem díptera, família
26 Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo),
27 *Lutzomya* (Novo Mundo), conhecido popularmente como mosquito-palha. As
28 principais espécies caracterizadas como transmissoras da LT no Brasil são: *L.*
29 *flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei*, *L. Migonei*,
30 embora outras espécies têm aparecido em áreas endêmicas, ainda são necessários
31 estudos que comprovem a efetividade destes flebotômicos como transmissores de
32 Leishmaniose (WHO, 2019).

1 Os parasitos causadores da LTA são divididos em dois subgêneros,
2 baseados na diferença no local de desenvolvimento e fixação das promastigotas
3 no intestino dos vetores, sendo elas *Leishmania* e *Viannia* (LEISON et al., 1987).
4 As três principais espécies causadoras da LTA no Brasil são: *L. amazonensis*
5 (*Leishmania*) – amplamente distribuída pelas regiões brasileiras, *L. guyanensis*
6 (*Viannia*) – limitada à Região Norte do Brasil, *L. braziliensis* (*Viannia*) – distribuída
7 por todo o território brasileiro e também descrita como principal agente etiológico
8 da América Latina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Apesar de cada espécie
9 apresentar suas particularidades, o ciclo de vida (**Figura 1**) é semelhante entre elas
10 (SCOTT, 2006).

11 No intestino dos insetos vetores, as formas conhecidas como
12 promastigotas (corpo alongado, presença de flagelo) passam pela metacicloênese,
13 processo no qual saem de uma forma replicativa e não infectantes (promastigotas
14 procíclicas), se diferenciando em formas infectantes, denominadas então de
15 promastigotas metacíclicas. As formas promastigotas procíclicas ficam presas na
16 parede do tubo digestivo do inseto vetor até sofrerem mudanças bioquímicas em sua
17 superfície, e perderem a capacidade de adesão ao epitélio, migrando assim para o
18 aparato bucal onde serão transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto
19 sanguíneo. As alterações que ocorrem na superfície do parasito durante a
20 metacicloênese, como mudança na conformação bioquímica do lipofosfoglicano
21 (LPG), superexpressão da protease Gp63, conferem aumento da infectividade,
22 alterações na expressão gênica do parasito e maior resistência à lise pelo
23 complemento (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2017, DA SILVA et al., 2015).

24 Após a inoculação do parasito na derme do hospedeiro humano, células do
25 sistema imune migram para o local da infecção onde reconhecem o parasito por
26 moléculas expressas em sua superfície, como lipofosfoglicanos (LPG) e Gp63, uma
27 metaloproteinase presente em grande quantidade em *Leishmania spp*, iniciando
28 então o processo de fagocitose, onde o parasito é internalizado formando vacúolos
29 parasitóforos. Após a internalização do parasito ocorre a fusão do lisossoma
30 formando o fagolisossoma, e devido à alta acidez nesse ambiente as formas
31 promastigotas se diferenciam então em formas amastigotas, que se proliferam
32 dentro da célula hospedeira até sua ruptura e liberação do parasito para infecção de

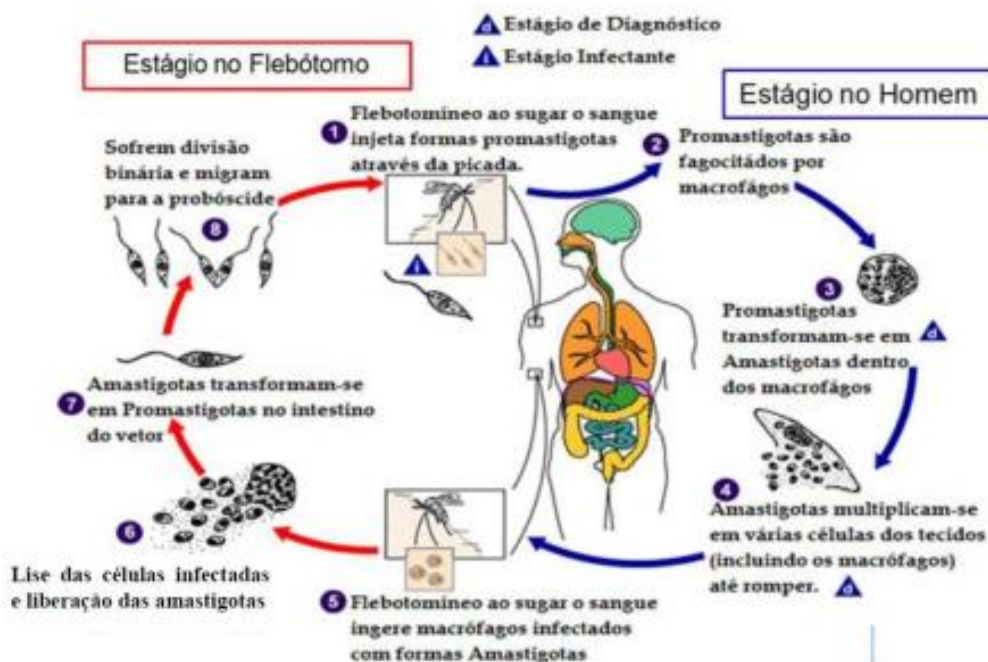
1 novas células ou para recomeçar o ciclo em outro flebotomíneo.(RAVICHANDRAN;
2 LORENZ, 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

3

4

Figura 1: Ciclo Biológico de *Leishmania* spp.

5



6

7 **Fonte:** Center for Disease Control and Prevention, 2019 (adaptado). A leishmaniose é
8 transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. Elas injetam promastigotas de sua
9 probóscide durante o repasto sanguíneo (1). As formas promastigotas que atingem a ferida são
10 fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas (2). As promastigotas se
11 transformam em amastigotas (3), que se multiplicam por divisão simples e infectam outras
12 células fagocíticas (4). Parasita, hospedeiro e outros fatores afetam se a infecção se torna
13 sintomática e se resulta em leishmaniose cutânea ou visceral. Flebotomíneos são infectadas
14 pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo (5). E as amastigotas se
15 transformam em promastigotas (6), desenvolvem-se no intestino (7) e migram para a
16 probóscide para reiniciar o ciclo de infecção (8).

17

18 1.3 Interação parasito-hospedeiro e resposta imune na LTA

19 A resposta imune contra *Leishmania* spp. envolve tanto características
20 intrínsecas do sistema imune do hospedeiro, como as diferentes
21 particularidades das espécies de *Leishmania*. As infecções experimentais em
22 camundongos também exibem um amplo espectro de apresentações, como a

1 suscetibilidade à infecção em camundongos BALB/c e a resistência em
2 camundongos C57BL/6, dependendo da cepa utilizada. A suscetibilidade à
3 infecção causada por *L. major* em camundongos BALB/c é caracterizada pelo
4 desenvolvimento de uma doença grave, visceralizante e geralmente fatal,
5 baseada na ativação preferencial da sub-população Th2, com produção de
6 Interleucina (IL)- 4, IL-5, IL-10 e IL-13, o que gera incapacidade do controle
7 parasitário (KANE; MOSSER, 2015).

8 A resposta imunológica observada em pacientes com leishmaniose
9 varia de indivíduos com resposta imune celular intensa, com envolvimento de
10 células T e altos níveis de interferon- γ (IFN γ), a pacientes com baixa resposta
11 celular e elevadas quantidades de anticorpos. Em geral, pacientes com potente
12 resposta celular tem baixa carga parasitária na lesão, já aqueles com resposta
13 humoral proeminente não conseguem controlar a proliferação dos parasitos.
14 Portanto, pacientes deficientes em respostas de células T apresentam um
15 quadro sintomatológico mais grave, podendo apresentar a forma cutânea
16 difusa da doença, e no outro extremo, pacientes que possuem atividade
17 exacerbada de células T podem apresentar danos por exacerbação da
18 inflamação. Sendo assim, é necessário o equilíbrio entre resposta imunológica
19 do tipo celular e humoral para a recuperação de pacientes com LTA (SCOTT,
20 NOVAIS, 2016).

21 As células TCD4⁺ podem ser caracterizadas em duas sub-
22 populações, Th1 e Th2, de acordo com as citocinas que produzem após
23 estimulação antigênica. As células com perfil Th1 produzem IFN- γ e
24 comumente são associadas a respostas efetivas contra patógenos
25 intracelulares, já as com perfil Th2 produzem interleucina (IL) 4, IL-5 e IL-10,
26 que no caso de infecções por *Leishmania* ssp leva ao agravamento do quadro
27 sintomatológico e falta de resposta efetiva contra o parasito. O que já está bem
28 estabelecido é que, para o controle da infecção, é necessária a predominância
29 da resposta imune celular Th1, envolvendo linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e citocinas
30 como IL-12, IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (MASPI; ABDOLI;
31 GHAFARIFAR, 2016).

32 Com relação às células da imunidade inata, os neutrófilos são as
33 primeiras células recrutadas para o local da infecção. Promastigotas de *L.*

1 *amazonensis* podem ser mortas de maneira direta por redes lançadas por
2 neutrófilos, conhecidas como NETs e por fagocitose. No entanto, *Leishmania*
3 spp., possui mecanismos capazes de corromper a função protetora dos
4 neutrófilos, transformando-os em “cavalos de Tróia”, onde neutrófilos
5 apoptóticos tardios, são fagocitados por macrófagos e Células dendríticas
6 (CDs), facilitando a disseminação do parasito e aumentando a persistência da
7 infecção, com conseqüente diminuição de resposta TH1. As próximas células a
8 serem recrutadas são os macrófagos, principais células hospedeiras de
9 *Leishmania* spp, e fundamentais para determinar o sucesso ou fracasso da
10 infecção. Isto ocorre pois, ao passo que macrófagos podem ser ativados e
11 produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) eliminando o
12 parasito, também podem se tornar susceptíveis à proliferação de formas
13 amastigotas (GONÇALVES et al., 2011, TOMIOTTO-PELISIER et al., 2018).

14 A resposta imune inata é importante para determinar a ativação da
15 imunidade adaptativa e evolução da infecção por *Leishmania* spp. Espécies de
16 *Leishmania* são utilizadas em modelos experimentais para identificar fatores
17 que induzem a diferenciação em padrões de resposta Th1, comumente
18 associado à resistência a doença e Th2 relacionado à suscetibilidade em
19 infecções causadas por *L. major*. No entanto em infecções por *L. amazonensis*,
20 o parasito pode anular a diferenciação de CDs, reduzindo a expressão de
21 citocinas e moléculas co-estimulatórias, e conseqüente deficiência no priming
22 de resposta Th1, favorecendo o desenvolvimento de lesões progressivas e
23 mais graves em camundongos considerados resistentes a outras cepas, como
24 *L. major* (CARVALHO et al., 2012; SCOTT, NOVAIS, 2016).

25 Neste sentido, macrófagos podem ser classificados de acordo com seu
26 fenótipo em M1, aqueles classicamente ativados, ou M2, alternativamente
27 ativados. O subtipo M1 é pró-inflamatório e exibe características microbidas,
28 como alta taxa de fagocitose, produção de ERO e ERN, produção de citocinas
29 pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-6 e TNF- α . Já subtipo M2 atua no reparo
30 tecidual e resolução de inflamações. Portanto, no contexto da leishmaniose, um
31 equilíbrio M1/M2 é determinante para um bom prognóstico (TOMIOTTO-
32 PELLISSIER et al., 2018).

1 Apesar de ERO e ERN serem geradas por macrófagos ativados,
2 espécies de leishmania podem inibir sua produção, como forma de evasão do
3 sistema imune (GONÇALVES et al., 2011). A principal ERN é o óxido nítrico
4 (NO), cuja síntese é dependente da indução da enzima oxido nítrico sintase
5 induzível (iNOS). A iNOS, por sua vez, depende classicamente da ação
6 sinérgica entre IFN- γ e TNF- α . O NO atua se difundindo pelas membranas
7 celulares acarretando a morte de amastigotas intracelulares (SCOTT; NOVAIS,
8 2016).

9 10 **1.4 Estresse Oxidativo e *Leishmania***

11 A mitocôndria apresenta papel central quando discutimos estresse
12 oxidativo em tripanossomatídeos, como possuem apenas um exemplar dessa
13 organela, danos e desbalanço redox podem culminar em morte celular. As
14 espécies reativas de oxigênio dependendo de sua quantidade, podem atuar na
15 célula de maneira fisiológica como molécula sinalizadora, ou então de maneira
16 citotóxica, sendo um dos principais mecanismos de morte frente a protozoários.
17 Na cadeia transportadora de elétrons, parte do oxigênio é reduzido a ânions
18 superóxido e radicais como peróxido de hidrogênio e hidroxila, quando essas
19 moléculas conseguem atravessar a membrana mitocondrial e se espalhar pelo
20 citosol, podem acarretar consequências deletérias (MENNA- BARRETO, DE
21 CASTRO, 2014). Estudos demonstram que as espécies reativas de oxigênio
22 são capazes de interferir no DNA de *L. amazonensis*, encurtando os telômeros
23 do parasito (DA SILVA et al., 2017).

24 Para driblar os danos causados pelo estresse oxidativo, *Leishmania*
25 *ssp* utiliza uma enzima conhecida como tripanotiona redutase (TR) que
26 mantém a tripanotiona reduzida para restabelecer o mecanismo redox do
27 parasito. A TR é uma molécula exclusiva de trypanossomatídeos e é análoga a
28 glutationa em mamíferos, portanto faz parte da família dos dependentes de
29 FAD e NAD(P)H oxiredutase. TR é uma proteína dimérica, onde cada
30 monômero é formado por 3 domínios, FAD, NADPH e domínio de interface, e a
31 liberação da tripanotiona reduzida é feita apenas depois de transformações
32 químicas que culminam na formação de uma ponte dissulfeto pra estabilização
33 da proteína (ILARI et al., 2017).

1 A desintoxicação feita pelo parasito apresenta uma etapa crucial no
2 estabelecimento e sucesso da infecção. A sinalização celular realizada pelo
3 Nrf2 em células hospedeiras promove a redução do burst respiratório causado
4 pela fagocitose do patógeno, o que alguns autores atribuem como sendo um
5 mecanismo antiinflamatório. A infecção por *L. amazonensis* caracteristicamente
6 induz um nível de estresse oxidativo quando comparado menor do que aquele
7 produzido em uma infecção por *L. major*, o que pode sugerir que ativação da
8 via Nrf2, e como consequência, menores níveis de ERO (VIVARINI, LOPES,
9 2020).

11 1.5 Tratamento

12 Atualmente a maioria das opções terapêuticas disponíveis para a
13 leishmaniose apresentam toxicidade e efeitos adversos. As formas de
14 tratamento atualmente se baseiam no uso de antimoniais pentavalentes como
15 antimonato de *N*-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio
16 (Pentostam®), como fármacos de primeira escolha. Em casos de resistência do
17 parasito, efeitos adversos ou contraindicação aos antimoniais, outros fármacos
18 podem ser utilizados, como pentamidina e anfotericina B, mas não possuem
19 um índice terapêutico tão favorável, requerendo maior tempo de tratamento, e
20 várias reações adversas (TIUMAN et al., 2011). Dentre os fármacos licenciados
21 pelo Ministério da Saúde, o tratamento para leishmaniose tegumentar no Brasil
22 tem como único fármaco disponível para distribuição no Sistema Único de
23 Saúde (SUS) *N*-metilglucamina apresentado como Glucantime®, atualmente
24 comercializado pela Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.

25 São propostos dois mecanismos de ação para o Glucantime®, o
26 primeiro é que há interações entre o fármaco e as biomoléculas do parasito,
27 através da formação de complexos Sb (V) com ribonucleosídeos,
28 interrompendo a função de topoisomerases essenciais para a replicação e
29 transcrição de DNA (FRÉZARD, et al., 2009). O outro modelo proposto é de que
30 o Glucantime® atua como uma pró-droga no organismo, onde o Sb (V) é
31 reduzido a Sb (III), ativo em amastigotas através de um sistema redox
32 envolvendo tripanotina, um conjugado espermidina-glutationa, exclusivo de
33 protozoários cinetoplastídeos (DENTON, et al., 2004), com função protetora

1 contra o ambiente oxidativo celular (RODRIGUEZ, 2000). Desta maneira o Sb
2 (III) induz uma cascata de eventos que levam ao estresse oxidativo celular,
3 culminando em fragmentação de DNA e morte celular programada (apoptose)
4 dos parasitos (FRÉZARD, et al., 2009).

5 A forma de administração do Glucantime® assim como dos outros
6 fármacos para leishmaniose com exceção da miltefosina (Milteforan®) é
7 desvantajosa para os pacientes, pois é feita por via parenteral, sendo
8 necessário o deslocamento do paciente até uma unidade de saúde por 28 dias
9 em média, o que pode levar a não adesão ao tratamento (FRÉZARD, et al.,
10 2009). Além disso, o Glucantime® apresenta toxicidade cardíaca que incluem
11 arritmias, prematuridade ventricular, taquicardia ventricular, dentre outros
12 efeitos adversos como mialgias, cefaléias, danos hepatotóxicos e nefrotóxicos.
13 Isso torna o tratamento dificultoso e muitas vezes inviável em pacientes que
14 possuam algum tipo de co-infecção (CHAKRAVARTY; SUNDAR., 2019)

15 A anfotericina B desoxicolato (AmB) um antibiótico polieno,
16 inicialmente utilizada como antifúngico, foi descoberta como tratamento
17 alternativo em áreas onde o tratamento convencional com antimoniais já não
18 apresentava eficácia, devido a crescente de cepas resistentes. O fármaco atua
19 formando poros na membrana microbiana se ligando ao ergosterol (principal
20 esterol presente na membrana), isso altera sua permeabilidade e permite a
21 saída de íons como Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , levando a morte celular (LINCOPAN;
22 MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO., 2005). Apesar de sua eficácia, os efeitos
23 adversos, incluindo reações à infusão, nefrotoxicidade, hipocalcemia e
24 miocardite, tornam obrigatório monitorar e hospitalizar o paciente, aumentando
25 o custo da terapia (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

26 Para minimizar os eventos adversos, foram introduzidas formulações
27 lipídicas da AmB nas quais o desoxicolato é substituído por outros lipídios,
28 introduzindo assim o tratamento com anfotericina B lipossomal (L- AmB). Essas
29 formulações são rapidamente absorvidas pelos órgãos e concentradas no
30 tecido reticulo endotelial, que é o local da doença na LV. A L-AmB permanece
31 nos tecidos por um longo período, permitindo a administração do medicamento
32 por um curto período de tempo. A desvantagem do medicamento é que possui
33 alta variabilidade de eficácia nas diferentes regiões endêmicas da doença, sua

1 eficácia diminui em pacientes co-infectados, além disso, L-Amb apresenta alto
2 custo (CHAKRAVARTY; SUNDAR., 2019).

3 A Miltefosina (Milteforan®) surge então como o primeiro medicamento
4 anti-*Leishmania* oral. A administração oral, a facilidade de uso e a eficácia
5 tornaram o medicamento de escolha para o programa de eliminação de LV na
6 Índia, Nepal e Bangladesh. No entanto no Velho Mundo já há relatos de cepas
7 resistentes ao tratamento, e estudos experimentais mostraram uma alta
8 percentagem de leishmaniose recidiva após o tratamento com Milteforan®
9 (NOGUEIRA, et al., 2019).

10 A pentamidina foi um medicamento utilizado como fármaco alternativo
11 a pacientes que não respondiam ao Glucantime®, no entanto seu uso e
12 eficácia diminuíram devido a sua alta toxicidade (CHAKRAVARTY; SUNDAR,
13 2019). O mecanismo de ação inclui a inibição da síntese de poliaminas, um
14 nutriente para *Leishmania*. Os efeitos adversos após sua utilização incluem
15 hipotensão, hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade e taquicardia (CROFT;
16 SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

17 Tendo em vista a alta toxicidade dos medicamentos disponíveis para
18 o tratamento das leishmanioses, a diversidade de cepas e respostas do
19 hospedeiro, recidiva, dificuldades na administração dos fármacos e elevado
20 custo do tratamento, a busca por novos compostos com atividade
21 leishmanicida e com baixa toxicidade ao paciente torna-se necessária.

22

23 **1.6 Excreção/Secreção Larval**

24 A família Calliphoridae (ordem: Diptera), é popularmente conhecida
25 como mosca verde ou varejeira, e possui antes da fase adulta três estágios de
26 desenvolvimento larvares, onde apresentam caracteristicamente hábitos
27 necrófagos (CALEFFE et al., 2019). As larvas de moscas dessa família são
28 estudadas desde a antiguidade por sua habilidade de remoção de tecido
29 necrótico e cicatrização de feridas.

30 Tradicionalmente, a Terapia Larval (TL) era feita com larvas estéreis
31 para desbridamento de feridas e eliminação de infecções bacterianas no local
32 da lesão. Peptídeos antimicrobianos podem ser encontrados na hemolinfa
33 larval, no tecido gorduroso e principalmente na excreção/ secreção (ES)

1 (ARORA; BAPTISTI; LIM, 2011), o uso de TL ou ES larval é considerado uma
2 técnica moderna no tratamento de infecção e feridas (ABDEL-SAMAD, 2019).

3 O gênero *Lucilia* é de grande destaque na família Calliphoridae, sendo
4 as espécies de maior relevância *L. cuprina* e *L. sericata*. *L. cuprina* é conhecida
5 em muitos países por ser uma ectoparasita facultativa, causadora de miíase
6 em ovelhas. No entanto vem sendo investigado seu potencial terapêutico em
7 lesões e microbicida frente a diversos microrganismos (ABDEL-SAMAD, 2019;
8 OWINGS, PICARD, 2018).

9 A ES larval é uma substância extraída de glândulas salivares e
10 intestinais de larvas em terceiro estágio de desenvolvimento. Durante o
11 desenvolvimento larval há produção de diferentes tipos de peptídeos, que são
12 responsáveis pelo auxílio na sobrevivência das larvas, em cada estágio de vida
13 há produção de diferentes moléculas em diferentes quantidades. Larvas em
14 terceiro instar de desenvolvimento, apresentam maior quantidade de moléculas
15 com efeitos microbicidas, quando comparadas a larvas de primeiro e segundo
16 instar (YOUNG; MEEUSEN; BOWLES VM, 1996).

17 Em experimentos realizados com complexos de peptídeos anti-
18 microbianos (AMPs) de *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *L. sericata* e
19 *Musca domestica*, foi demonstrado que os AMPs tem efeito contra *Escherichia*
20 *coli*, *Klebscella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii in vitro*, sem levar à
21 resistência bacteriana. Isto é, tiveram melhores efeitos quando comparados
22 aos antibióticos. Ademais, ES larval possui efeito microbicida sobre uma ampla
23 gama de patógenos, há relatos que ES larval de *Lucilia cuprina* possui eficácia
24 superior que métodos convencionais sobre alguns tipos bacterianos como
25 *Staphylococcus aureus* e bactérias resistentes a múltiplos fármacos (ARORA;
26 BAPTISTI; LIM., 2011). ES larval de *S. magellanica* possui efeito
27 antibacteriano frente *Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus aureus*.
28 (DÍAZ-ROA et al. 2014), atividade antileishmania *in vitro* em diferentes estágios
29 parasitários de *Leishmania panamensis* (LAVERDE-PAZ et al., 2018), e mais
30 recentemente foi demonstrado o efeito de ES larval de *L. cuprina* reduzindo a
31 infectividade de vírus Rift Valley Vírus (RVF) e Coxsackie B4 (CB4) (ABDEL-
32 SAMAD, 2019)

1 Em estudos *in vivo*, foi demonstrada a atividade de ES larval de *S.*
2 *magellanica* na cicatrização de feridas contaminadas em coelhos diabéticos.
3 Neste modelo, o tratamento com ES larval aumentou a produção de novos
4 tecidos e vasos sanguíneos, facilitando assim o processo de cicatrização
5 (GÓNGORA et al., 2015). Além disso, o ES larval de *S. magellanica* também
6 apresentou efeito *in vivo* sobre modelos de leishmaniose, promovendo eficácia
7 sobre úlceras causadas por *L. panamensis* (CRUZ-SAAVEDRA et al., 2016).

8 A presença de peptídeos que rompem ou aumentam a
9 permeabilização da parede bacteriana, e interrompem a síntese de DNA e
10 proteínas são consideráveis responsáveis pelo efeito antibacteriano de
11 Excreção/Secreção de larvas de algumas espécies de moscas
12 (CHERNYSH; GORDYA, SUBOROVA, 2015).

14 **1.7 Principais componentes descritos de ES larval**

15 Os peptídeos Antimicrobianos (AMP) é um grupo de diversas
16 moléculas utilizadas pelo sistema imune de organismos multicelulares para
17 prevenir ou combater infecções microbianas.

18 Os AMPs podem ser isolados de diversos organismos vivos, inclusive
19 de seres humanos. Nos insetos, esses peptídeos podem ser classificados por
20 sua característica estrutural e sequência em três categorias: lineares que não
21 contém resíduo de cisteína, como por exemplo as cecopinas, cíclicos que são
22 compostos por pontes dissulfeto como defensinas de insetos e por último,
23 lineares com grande parte do conteúdo sendo principalmente de prolina ou
24 glicina. Os AMPs são frequentemente encontrados em hemolinfa, corpo
25 gorduroso de insetos e também ES de larvas (WU; PATOČKA; KUČA, 2018)

26 Defensinas:

27 As defensinas podem ser classificadas como “clássicas”, beta e
28 defensina de insetos. As defensinas de insetos são peptídeos catiônicos
29 pequenos com resíduos de cisteína conservados. Sabe-se que o
30 mecanismo de atuação das defensinas de insetos é pela formação de poros na
31 membrana plasmática, através da interação com fosfolípido de membranas o
32 que pode acarretar na formação de poros e morte do parasito (YI et al., 2014).

33 Cecropinas:

1 As cecoprinas são peptídeos primeiramente isolados de hemolinfa de
2 pupa de *H. cecopria*, e já foram identificadas em diversos grupos de insetos,
3 como dípteros. A maior parte dos peptídeos contém triptofano, o que é
4 considerado importante na função microbicida da molécula. A atividade
5 antimicrobiana da molécula depende da conformação que ela assume na
6 presença do microorganismo, mostrando que em contato com membranas
7 microbianas elas assumem uma conformação α - helicoidal e apresentam efeito
8 lítico. Nesse sentido, os resíduos polares interagem com os fosfolipídios,
9 enquanto as cadeias apolares penetram no núcleo hidrofóbico da membrana
10 (BRADY et al., 2019).

11 Diptericinas:

12 As diptericinas são pequenos peptídeos ricos em glicina, até onde se
13 conhece são ativos contra um número reduzido de bactérias, agindo
14 principalmente sobre a membrana citoplasmática de bactérias em crescimento
15 (WU; PATOČKA; KUČA, 2018).

16 Prolina:

17 Os peptídeos antimicrobianos ricos em prolina estão presentes em
18 vertebrados e invertebrados, frequentemente os resíduos de prolina estão
19 associados a resíduos de arginina. Esses peptídeos possuem afinidade por
20 microorganismos e baixa toxicidade por células mamíferas. Diferente dos outros
21 tipos de AMPs citados aqui anteriormente, os peptídeos ricos em prolina não
22 atuam causando lise de membrana, mas sim penetrando em células
23 suscetíveis, agindo de maneira intracelular. Acreita-se que o mecanismo pelo
24 qual inativam o microorganismo pode depender de sua capacidade de inibir a
25 dobragem e redobragem de proteínas (SCOCCHI; TOSSI; GENNARO, 2011)

26 Segundo Young, Meeusen e Bowless (1996) na espécie *L. cuprina*,
27 uma das principais moléculas presentes identificadas até agora, são da classe
28 de serino-proteases (YOUNG, MEEUSEN, BOWLESS, 1996).

29 Serino-proteases:

30 As serino- proteases são relacionadas à quimiotripsina e são
31 responsáveis por hidrolizar ligações peptídicas com diferentes graus de
32 especificidade. Semelhantes aos fatores de coagulação em humanos, as

1 serino-proteases de insetos formam complexas redes para conter
2 sangramentos e combater infecções (CAO; GULATI; JIANG, 2017).

3 Dentre os componentes do ES larval, dois são bem caracterizados,
4 Sarconesin, um pequeno peptídeo isolado do ES larval de *Sarconesiopsis*
5 *magellanica*, que apresenta efeito antibacteriano, atuando na membrana
6 bacteriana, e também se ligando fortemente ao DNA, inibindo funções
7 intracelulares bacterianas. A sequência identificada de sarconesin em *S.*
8 *magellanica* é semelhante à sequência de peptídeos encontradas em moscas
9 *Lucilia*, incluindo *L. cuprina* (DÍAZ-ROA et al., 2018).

10 Um segundo peptídeo conhecido das moscas da família Calliphoridae
11 é designado lucifensina, conhecido como uma defensina de larvas de *Lucilia*
12 *spp.* Lucifensina é encontrado em extratos de diversos tecidos como intestino,
13 glândulas salivares, tecido gorduroso e hemolinfa. O peptídeo foi isolado de ES
14 de larvas da espécie *Lucilia sericata*, e apresenta atividade contra bactérias
15 (ČEŘOVSKÝ et al., 2010).

16 A ligação da maioria dos AMPs à superfície microbiana é necessária
17 para a atividade microbicida. A conformação estrutural em formas helicoidais é
18 essencial para a ligação a lipídios citoplasmáticos como o LPS.

19 Os AMPs de insetos tem carga positiva ou então uma superfície
20 carregada positivamente sob pH fisiológico, o que facilita a ligação com a
21 superfície microbiana que é tem carga negativa, por meio de interação carga-
22 carga, seguidas de permeabilização da membrana ou abertura de poros (YI et
23 al., 2014, WILMES et al., 2011). As membranas microbianas possuem maior
24 carga negativa que a de seres humanos o que pode explicar a seletividade das
25 defensinas de insetos frente a micróbios com baixa toxicidade ao hospedeiro
26 (WILMES et al., 2011).

27 Diante do exposto, compostos que ocorrem naturalmente em insetos,
28 atuam sobre microorganismos e sobre reparo tecidual, notavelmente, sobre
29 *Leishmania spp.* *in vitro* e *in vivo*, este trabalho teve por objetivo testar
30 ineditamente a atividade do ES larval de *L. cuprina*, sobre formas
31 promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como descrever os
32 possíveis mecanismos de morte envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a eficácia terapêutica da secreção/excreção de larvas (ES larval) da espécie de dípteros *Lucilia cuprina* frente à *Leishmania amazonensis* e sua citotoxicidade em linhagens celulares.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar atividade leishmanicida direta de ES larval, e determinar *in vitro* a concentração capaz de eliminar 50% (IC₅₀) das formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Analisar as alterações morfológicas das formas promastigotas após o tratamento com ES larval através da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinar a atividade citotóxica de ES Larval sobre linhagens celulares J774A.1 e VERO
- Determinar a atividade hemolítica de ES larval sobre eritrócitos ovinos;
- Verificar os mecanismos de morte envolvidos na atividade leishmanicida (despolarização mitocondrial, formação de vacúolos autofágicos, acúmulo de corpos lipídicos e produção de espécies reativas de oxigênio), sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Verificar a atividade anti-amastigota do tratamento de ES larval em linhagem celular (J774A.1) infectados com *L. amazonensis*.
- Investigar os mecanismos microbicidas (óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio) em sobrenadante de células infectadas, tratadas ou não com ES larval da espécie de dípteros *L. cuprina*.

Larval excretion/secretion of dipters of *Lucilia cuprina* species induces death in promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*

Ana Carolina Jacob Rodrigues¹; Bruna Taciane da Silva Bortoleti²; Amanda Cristina Machado Carloto¹; Taylon Felipe Silva¹; Virgínia Márcia Concato¹; Manoela Daiele Gonçalves³; Fernanda Tomiotto- Pelissier²; Mariana Barbosa

1 Detoni¹ Andrea Diaz-Roa⁴; Pedro Ismael da Silva Júnior⁴; Idessania Nazareth
2 Costa¹; Ivete Conchon-Costa¹; Danielle Lazarin Bidoia¹; Milena Menegazzo
3 Miranda-Sapla¹; Wander Rogério Pavanelli^{1*}

4

5 ¹Laboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer,
6 Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences State
7 University of Londrina, PR, Brazil

8 ² ^aBiosciences and Biotechnology Postgraduate Program, Carlos Chagas
9 Institute, (ICC/Fiocruz/PR), Curitiba, PR, Brazil.

10 ³Biotransformation and Phytochemistry Laboratory, Department of Chemistry,
11 Center for Exact Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil

12 ⁴Special Laboratory for Applied Toxinology, Instituto Butantan, SP, Brazil

13

14 * Corresponding Author: Wander Rogério Pavanelli

15 Department of Pathological Sciences, Laboratory of Immunoparasitology of
16 Neglected Diseases and Cancer, State University of Londrina- UEL
17 Rodovia Celso Garcia Cid Campus, Cep: 86057-970 Londrina, PR.

18 Phone: (43) 33714539

19 Email: wanderpavanelli@yahoo.com

20

21 **Abstract**

22 The World Health Organization considers Leishmaniasis a major neglected
23 tropical disease. One of its most frequent clinical manifestations is cutaneous
24 leishmaniasis affecting 600.000 to 1 million people every year, a context in
25 which Brazil stands among the countries with the most case reports of the
26 disease. It has been long in history that fly larvae of the Calliphoridae family are
27 studied for their effectiveness in wound debridement and tissue healing. Larval
28 excretion/secretion (ES) is extracted from salivary and intestinal glands of fly
29 larvae, which present microbicidal activity against Gram-positive and Gram-
30 negative bacteria, in addition to some species of *Leishmania*. Our study aimed
31 at assessing the *in vitro* efficacy of *Lucilia cuprina* larval ES against the
32 promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*, elucidating
33 possible microbicidal mechanisms and route of death involved. We used

1 concentrations of 0.8-75 µg/mL to assess the direct anti-promastigote activity
2 and calculated the value capable of inhibiting the viability of 50% of viable
3 promastigotes ($IC_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$ and $2 \times IC_{50} = 4 \mu\text{g/mL}$) as the standard for
4 subsequent experiments. Larval ES was able to inhibit the viability of *L.*
5 *amazonensis* at all concentrations as well as induce morphological and
6 ultrastructural changes in the parasite retraction of the cell body, roughness of
7 the cytoplasmic membrane, leakage of intracellular content, ROS production
8 increase, induction of membrane depolarization and mitochondrial swelling,
9 formation of cytoplasmic lipid bodies and phosphatidylserine exposure thus
10 indicating the possibility of apoptosis-like death. To verify the efficacy of larval
11 ES on amastigote forms, we performed a phagocytic assay at concentrations of
12 3.12-12.50 µg/mL, measurement of total reactive oxygen species (ROS) and
13 nitric oxide (NO). Treatment using larval ES reduced the percentage of infection
14 and the number of amastigotes per macrophage of lineage J774A.1 at all
15 concentrations, increasing the production of ROS and TNF- α , thus indicating
16 possible pro-inflammatory immunomodulation and oxidative damage. Therefore,
17 treatment using larval ES is effective at inducing the death of promastigotes and
18 amastigotes of *L. amazonensis* even at low concentrations.

19

20 **Keywords:** Leishmaniasis; Larval Therapy; Calliphoridae; Cell death;
21 Apoptosis-Like.

22

23 1. Introduction

24 Leishmaniasis is a neglected tropical disease transmitted by protozoa of the
25 *Leishmania* genus (CDC, 2019). The clinical manifestations of the disease vary
26 according to the parasite species and the host's immune system, ranging from
27 skin lesions to lethal visceral diseases (LABONY et al. 2014). Currently, 95% of
28 cases of cutaneous leishmaniasis (LC) occur in the Americas (called American
29 cutaneous leishmaniasis, ACL), the Middle East, and Asia, presenting about 1
30 million new cases annually, a context in which Brazil is the sixth country with the
31 highest incidence of cases notified. In addition, it is considered one of the six
32 major public health diseases, with high morbidity rate and case reports all over
33 Brazil (WHO, 2019).

1 The first choice among the currently available therapeutic options for
2 leishmaniasis is based on the use of pentavalent antimonials such as
3 meglumine antimoniate (Glucantime) and sodium stibogluconate (Pentostam)
4 (TIUMAN et al., 2011). However, the use of these drugs is associated with high
5 toxicity, adverse effects, cases of parasitic resistance, disease recurrence,
6 difficulties in administration, in addition to the high cost of treatment. Therefore,
7 research has focused on new compounds presenting leishmanicidal activity and
8 low toxicity (NOGUEIRA, et al. 2019).

9 It has been long in history that fly larvae of the Calliphoridae family are
10 studied for their ability to remove necrotic tissue and assist in wound healing
11 (ARORA; BAPTISTI; LIM, 2011). Larval excretion/secretion (ES), obtained from
12 the larval salivary and intestinal glands at the third stage of development of the
13 Calliphoridae fly, show microbicidal activity against *Staphylococcus epidermidis*,
14 *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* (DÍAZ-ROA et al.
15 2014, ČEŘOVSKÝ et al. 2010) and curative. Larval ES of different species are
16 characterized by the presence of several types of antimicrobial peptides
17 (AMPs), such as defensins, dipterocins, cecoprins, and prolines (WU;
18 PATOČKA; KUČA, 2018, BRADY et al., 2019).

19 Díaz-Roa et al., 2018 demonstrated that AMPs present in larvae of an
20 important member of Calliphoridae family, *Lucilia cuprina*, are mostly proteases
21 of the serine proteases class, which can damage the cell wall and interrupt DNA
22 synthesis in microorganisms (YOUNG; MEEUSEN; BOWLES VM, 1996) without
23 generating resistance (CHERNYSH; GORDYA, SUBOROVA, 2015).
24 Additionally, it has been reported the *in vitro* description of leishmanicidal
25 activity of larval ES of *L. sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* against
26 promastigotes and amastigotes of *Leishmania panamensis* (LAVERDE-PAZ et
27 al. 2018), as well as *in vivo*, increasing the pro-inflammatory response and
28 inducing the healing of ulcers caused by *L. panamensis* (CRUZ-SAAVEDRA et
29 al., 2016).

30 Despite the promising activity described in the literature, the activity of *L.*
31 *cuprina* products against *L. amazonensis* yet to be demonstrated. In this
32 context, this study aimed at assessing the leishmanicidal effect of the larval ES
33 of *L. cuprina* on promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*, in

1 addition to investigating the main microbicidal and pro-inflammatory
2 mechanisms and death pathways involved in eliminating the parasite.

3 **1. MATERIALS AND METHODS**

4 **2.1 Culture of *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

5 *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989 /166MJO) were
6 maintained as described by Tomiotto et. al, 2018, in culture medium 199
7 (GIBCO Invitrogen, New York, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum
8 (FBS) (GIBCO Invitrogen, New York, USA), Hepes 1M medium, 1% human
9 urine, 1% L-glutamine, streptomycin and penicillin (GIBCO Invitrogen) and 10%
10 sodium bicarbonate. The parasites were kept in a B.O.D. at 25°C. In all
11 experiments, promastigote forms were used in the stationary growth phase.

12 13 **2.2 Cell lines**

14 VERO cell lines (kidney of *Cercopithecus aethiops*), (kindly provided by
15 Dr. Phileno Pinge Filho - Laboratory of Experimental Immunopathology, State
16 University of Londrina) and J774A.1 (*mus musculus* macrophages) (kindly
17 provided by Dr. Fábio Henrique Kwasniewski - Laboratory of
18 Immunopharmacology, Londrina State University) were cultured with DMEM
19 medium (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% FBS
20 (GIBCO Invitrogen s), 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin
21 (GIBCO Invitrogen). Cell lines were maintained in an incubator at 37 °C, 5%
22 CO₂.

23 24 **2.3 Excretion/Secretion (ES) of larvae**

25 ES of *L. cuprina* larvae were obtained from the Special Laboratory for
26 Applied Toxicology of the Butantã Institute, grown according to Díaz-Roa et al.
27 (2014). in a brief description third instar larvae were centrifuged in a 15 ml
28 falcon, disinfected by adding 0.5% formaldehyde for 5 min, the solution is then
29 replaced with 0.5% hypochlorite with constant agitation and then washed with
30 sterile PBS. The ES mixture was removed by syringe, transported to another
31 falcon for centrifugation at 13,000 g at 4 ° C. The supernatant containing ES
32 was collected and sterilized by filtration and stored at -70 ° C.

1 Protein concentrations (0.8, 1.6, 3.12, 6.25, 12.5, 18.5, 25, 31.5, 50, and
2 75 µg/mL) of ES were quantified using NanoVuePlus (Biochrom, Holliston,
3 USA), and selected for testing against the parasite according to the literature
4 data (DÍAZ-ROA et al., 2014).

5 6 **2.4 Antipromastigote assay**

7 *L. amazonensis* promastigotes (10^6) were treated with different
8 concentrations of ES Larvae (0.8, 1.6, 3.12, 6.25, 12.5, 18.5, 25, 31.5, 50, 75
9 µg/mL) for 24 h at 25 °C. After this period of treatment, the parasites were
10 counted in a Neubauer chamber. The results were expressed as % of viable
11 promastigotes about the control, which was considered to be 100%. We used
12 as negative controls the *L. amazonensis* promastigote maintained in culture
13 without treatment, and vehicle (PBS diluted in 199 medium). The half-maximal
14 inhibitory concentration (IC_{50}) in parasites was calculated by non-linear
15 regression to the dose-response curve using Graph Pad Prism 6.01 software.

16 17 **2.5 Scanning electron microscopy (SEM)**

18 SEM of promastigote forms was performed according to Gonçalves et al.,
19 2018. Briefly, the parasites (10^6) were treated with IC_{50} (2µg/mL) and 2x IC_{50}
20 (4µg/mL) of ES Larvae for 24 h. After this procedure, were collected and
21 subjected to 2.5% glutaraldehyde-fixation in 0.1 M of sodium cacodylate buffer
22 containing 1mM $CaCl_2$, collected and placed in poly-L-lysine previously treated
23 coverslips and dehydrated in increasing concentrations of ethanol, CO_2
24 drypoint, gold-coated, and analyzed in FEI QUANTA 200 SEM. The length of
25 the trypomastigote forms was analyzed in the Image-Pro Plus software, based
26 on the 10,000x magnification images obtained. At least three images of each
27 condition were subjected to measurement.

28 29 **2.6 Transmission electron microscopy (TEM)**

30 For evaluation of ultrastructural changes by TEM, promastigote forms
31 (10^6) were treated with IC_{50} (2µg/mL) and 2x IC_{50} (4µg/mL) of ES Larvae for 24
32 h. After this procedure, the parasites were collected by centrifugation, washed
33 in PBS 0.01 M pH 7.2, and fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M

1 sodium cacodylate buffer. The parasites were post-fixed in a solution of 1%
2 osmium tetroxide, 0.8% potassium ferrocyanide, and 10.0 mM CaCl₂ in 0.1 M
3 sodium cacodylate buffer at room temperature and protected from light. After,
4 the samples were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer, dehydrated in
5 increasing concentrations of acetone (50 - 100%), included in EPON resin, and
6 polymerized at 60 °C for 72 h. Ultrathin sections were made in ultramicrotome,
7 deposited on a copper grid, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, for
8 20 and 10 min, respectively. The analysis was performed using a TEM JEOL
9 JEM 1400.

11 **2.7 Determination of reactive oxygen species (ROS) generation on *L.*** 12 ***amazonensis* promastigotes**

13 To evaluate the ROS generation, promastigote forms of *L. amazonensis*
14 (10⁶) treated with larval ES (IC₅₀ and 2x IC₅₀) for 24 h were incubated with 5 μM
15 of the 2',7'-dichlorofluorescein (H₂DCFDA) diacetate probe (Sigma, St. Louis,
16 MO, USA) for 45 min at 25 °C on a black background plate. ROS were
17 measured as an increase in fluorescence caused by the conversion of non-
18 fluorescent dye to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), using the
19 excitation wavelength 488 nm and emission of 530 nm in a fluorescence
20 microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland). Hydrogen peroxide (H₂O₂)
21 was used as a positive control. Additionally, micrographs of ES-treated
22 promastigotes were acquired using an EVOS® Microscope FL Auto Cell
23 imaging system (Thermo Fisher) at 200x magnification. The obtained
24 fluorescence values were normalized by the number of parasites.

26 **2.8 Determination of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)**

27 Promastigotes forms (10⁶) were treated with larval ES (IC₅₀ and 2x IC₅₀)
28 for 24 h at 25°C. After, parasites were washed with PBS and incubated with 25
29 nM of tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
30 USA) for 30 min at 25°C. The fluorescence was measured in a Victor X3
31 spectrofluorometer (PerkinElmer, Finland) at an excitation wavelength of 480
32 nm and an emission wavelength of 580 nm. Carbonyl cyanide m-
33 chlorophenylhydrazone (CCCP) was used as a positive control (100 μM)

1 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Additionally, micrographs of ES-treated
2 promastigotes were acquired using an EVOS[®] Microscope FL Auto Cell imaging
3 system (Thermo Fisher) at 200x magnification.

4 5 **2.9 Detection of lipid droplets (LD)**

6 Quantification of LD was performed using the Nile Red marker. After 24 h
7 of treatment with larval ES (IC₅₀ and 2x IC₅₀), promastigote forms were
8 incubated with Nile red (0.5 μM) for 30 min at 25°C. Fluorescence was
9 measured in the fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer,
10 Finland) with excitation of 530 nm and emission of 635 nm. PBS without adding
11 medium was used as a positive control. The obtained fluorescence values were
12 normalized by the number of parasites.

13 14 **2.10 Formation of autophagic vacuoles**

15 The formation of autophagic vacuoles in promastigote forms of *L.*
16 *amazonensis* was carried out according to Machado and collaborators (2017)
17 with modifications. Promastigote forms (10⁶) treated with larval ES (IC₅₀ and 2x
18 IC₅₀) for 24h were marked with monodansylcadaverine (MDC) (50 μM) for 1h at
19 25 °C. The parasites were analyzed using a fluorescence microplate reader
20 (Victor X3, PerkinElmer, Finland) with 380 nm excitation and 525 nm
21 emission. PBS without adding medium was used as a positive control. The
22 obtained fluorescence values were normalized by the number of parasites.

23 24 **2.11 Determination of cell membrane integrity**

25 Promastigote forms (10⁶) treated with larval ES (IC₅₀ and 2x IC₅₀) for 24 h
26 were incubated with propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (0.5
27 μg/mL) for 15 min at 25 °C. Parasites were analyzed using a fluorescence
28 microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland) with an excitation
29 wavelength of 480 nm and an emission of 580 nm. The obtained fluorescence
30 values were normalized by the number of parasites. Digitonin (Sigma, St. Louis,
31 MO, USA) (40 μM) was used as a positive control.

32 33 **2.12 Determination of phosphatidylserine exposure**

1 Phosphatidylserine exposure was detected using Annexin-V FITC
2 (Invitrogen, Eugene, USA). Promastigote forms (10^6) treated with larval ES (IC_{50}
3 and $2x IC_{50}$) for 24 h were incubated with 5 μ L of Annexin-V FITC for 15 min at
4 25°C. Camptothecin (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10 μ M) was used as a
5 positive control. The data were obtained from a fluorescence microplate reader
6 (Victor X3, PerkinElmer, Finland) at an excitation wavelength of 488 nm and
7 emission of 520 nm. The obtained fluorescence values were normalized by the
8 number of parasites.

9 10 **2.13 Cell viability**

11 Cytotoxicity effects of larval ES treatment in cell lines murine macrophage
12 VERO, and J774A.1, the MTT assay was performed as previously described
13 Gonçalves et al., (2018). Briefly, cells (10^4) were seeded in a 96-well culture
14 plate (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) and incubated with
15 different concentrations of Larval ES (3.12, 6.25, 12.5, 18.5, 25, 31.5, 50, 75
16 and 100 μ g/mL) for 24 h (37 °C, 5 % CO_2), washed, and added MTT (0.33
17 mg/mL) for 4 h. Absorbance was read in a spectrophotometer (Thermo
18 Scientific, Multiskan GO) at 550 nm. H_2O_2 was used as a positive control. The
19 results were expressed as the percentage of viability compared to the control
20 group calculated with the following formula: % (viable macrophages) = (samples
21 of the treated larval ES/sample OD untreated) x 100.

22 23 **2.14 Hemolytic assay**

24 Cell viability was assessed using sheep erythrocytes (Animal
25 Experimentation Ethics Committee at Londrina State University: 82862016.60).
26 Sheep blood was collected with heparin, and the erythrocytes were washed
27 three times with PBS (centrifugation at 1000 rpm for 10 min). A2% erythrocyte
28 suspension was incubated 1:1 with PBS and larval ES treatments (3.12, 6.25,
29 12.5 18.5, 25, 31.5, 50, 75, and 100 μ g/mL) in a total volume of 200 μ L in a 96-
30 well plates for 3 h at 37 °C at 5% CO_2 . The plates were centrifuged at 1000 rpm
31 for 10 min and the absorbance of the supernatants was read at 550 nm. PBS
32 was used as a negative control and Triton x-100 (1%) as a positive control.

2.15 Intramacrophage anti-amastigote assay

Cell line J774A.1 (5×10^5) were cultured in 24-well plates containing 13 mm-glass cover slips and submitted to 24 h incubation with a 200 μ L RPMI 1640 medium at 37°C and 5% CO₂. Adherent cells were submitted to infection with *L. amazonensis* promastigotes (10^6), subsequently, the non-internalized promastigotes were removed through a PBS washing, and the cells submitted to treatment using larval ES (1.6, 3.12, 6.25, 12.5, 25 μ g/mL) for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂). The cover slips were fixed with methanol for 10 min and stained with Leishman stain, and 20 fields analyzed through increased soaking using an Optical microscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) (1000x magnification) to determine the % of infected macrophages as well as the number of amastigotes per cell after a 24 h with treatment. The supernatant was stored at -80° to measure the cytokines and nitric oxide (NO).

2.16 Evaluation of ROS generation in infected macrophages

Macrophages J774A.1 infected and treated as described in item 2.14 and incubated with 2.5 μ M of H₂DCFDA for 45 min at 37°C. ROS were measured as an increase in fluorescence caused by the conversion of non-fluorescent dye to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), using the 488 nm excitation wavelength and 530 nm emission in a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland). Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as a positive control.

2.17 Determination of nitrite as estimative of NO levels

NO was determined by the Griess method (Bortoleti et al., 2018), where aliquots of the supernatant from the anti-amastigote assay were added with Griess reagent v/v [1% sulfanilamide and 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine in orthophosphoric acid (H₃PO₄) 5%]. After 10 min of incubation at room temperature, the samples were placed in 96-well microplates. A calibration curve was made using dilutions of NaNO₂, and the absorbance was determined at 550 nm in a microplate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO).

2.18 Tumor-necrosis factor-alpha (TNF- α) measurement

1 Anti-amastigote assay supernatants were used to measure TNF- α levels
2 by Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA), according to the
3 manufacturer's instructions (eBiosciences®, USA). Plates were read at 450 nm
4 using an ELISA plate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO).

6 **2.19 Statistical Analysis**

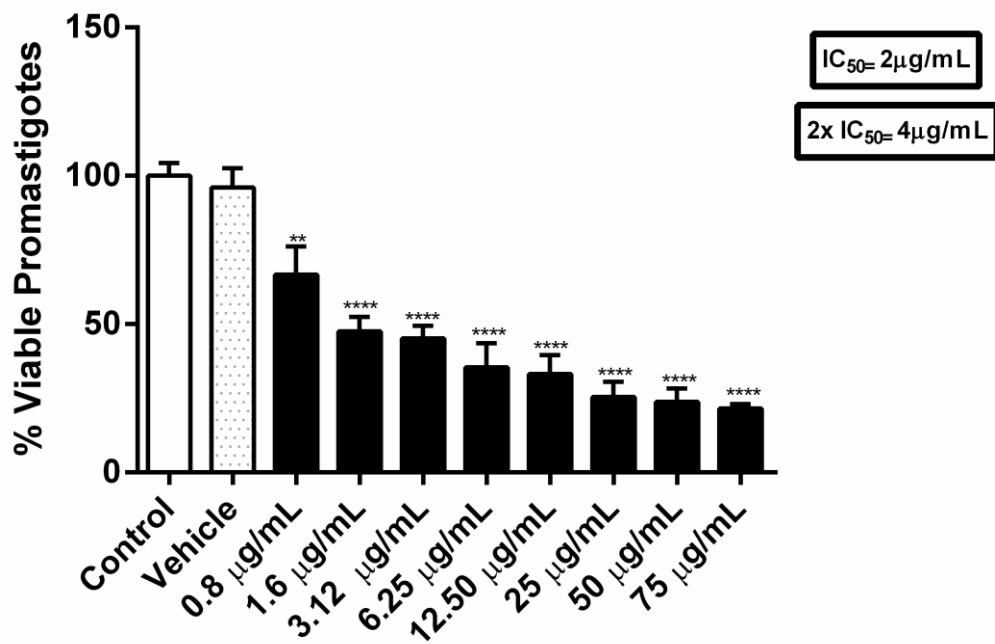
7 Statistical differences were obtained after analysis of variance (ANOVA),
8 followed by the Tukey test for multiple comparisons using GraphPad Prism 6.01
9 for Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA). Data were
10 expressed as mean \pm SEM and were considered significant differences when p-
11 value \leq 0.05. The values were also categorized by: * (p<0.05); ** (p<0.01); ***
12 (p<0.001); ****(p<0.0001).

14 **3. RESULTS**

15 **3.1 Larval ES inhibits viability of promastigote forms of *L. amazonensis* in** 16 ***vitro***

17 Initially, we investigated the direct activity of larval ES (0.8, 1.6, 3.12, 6.25,
18 12.5, 25, 50, 75 μ g/mL) on promastigote forms of *L. amazonensis* for 24 h. We
19 verified that all concentration tested were able to significantly reduce the
20 viability of the parasites in a dose-dependent manner by 33.34%, 52.39%,
21 54.86%, 64.60%, 66.87%, 74.55%, 76.13%, and 78.41%, respectively (p<0.01),
22 comparing with the control. The diluent (PBS) did not show leishmanicidal
23 activity (**Fig. 1**).

24 The determined values of IC₅₀ and 2xIC₅₀ were chosen for the subsequent
25 experiments.



1

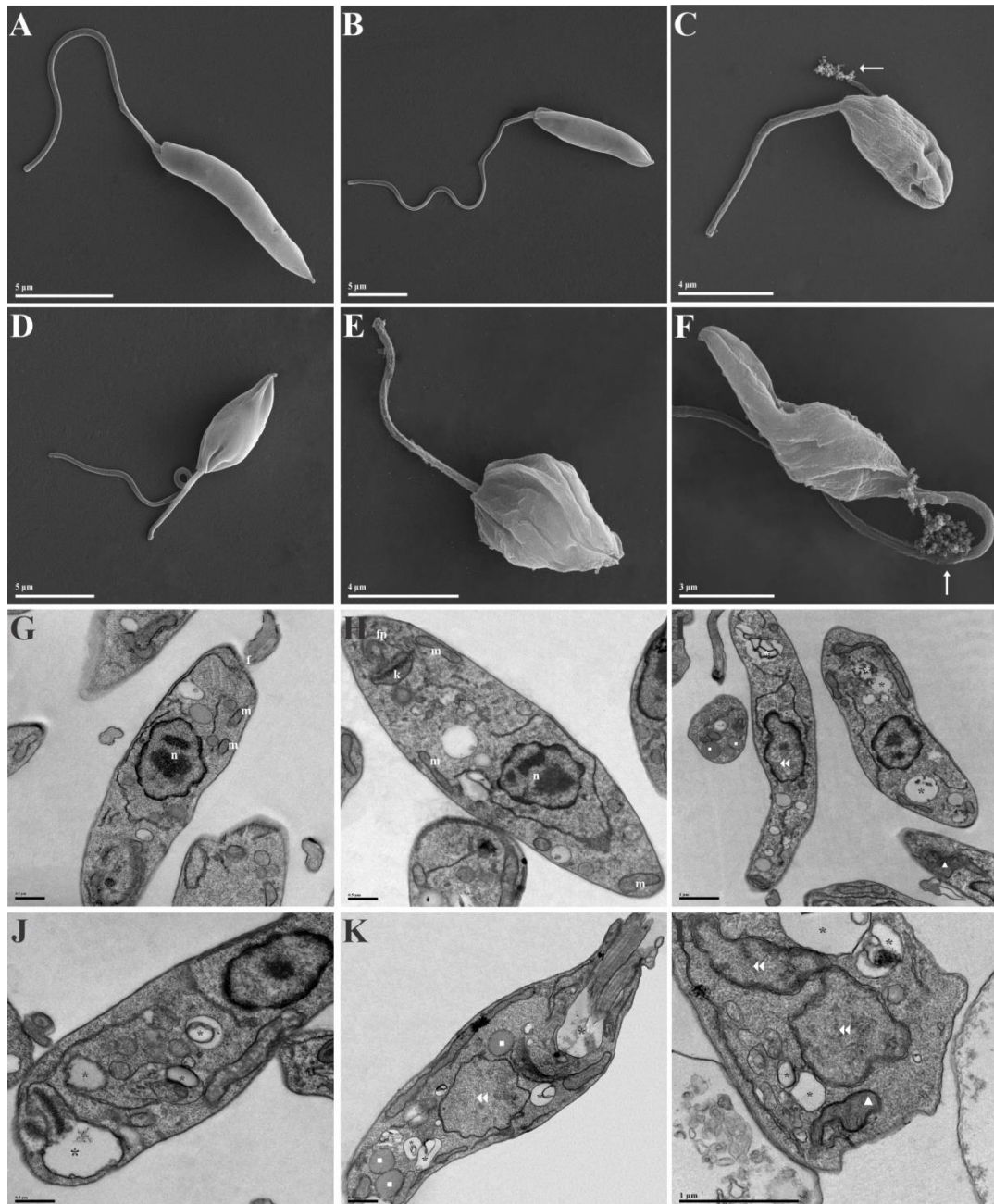
2 **Figure 1: Larval ES activity on promastigote forms of *L. amazonensis*.**

3 Parasites were treated with different concentrations of larval ES (0.8, 1.6, 3.12,
 4 6.25, 12.5, 25, 50, 75 µg/mL) for 24 h and counted in an neubauer chamber.
 5 PBS (0.1%) was used as a vehicle. The values shown are expressed as mean
 6 ± standard deviation.

7

8 **3.2 Larval ES induces morphological and ultrastructural damage in** 9 **promastigote forms**

10 Hereupon, we assessed the morphological and ultrastructural effects of
 11 larval ES (IC_{50} and $2xIC_{50}$) on *L. amazonensis* promastigotes using SEM and
 12 TEM. The SEM analysis showed typical untreated promastigotes (control) with
 13 an elongated body, smooth cell membrane, and a preserved anterior flagellum
 14 (**Fig. 2 a,b**). However, larval ES treated parasites exhibited rounded shape and
 15 reduced cell body size, roughness in cell surface, and apparent leakage of
 16 cytoplasmic contents (**Fig.2c-f**). In addition, the TEM analysis revealed well-
 17 preserved ultrastructural organization in untreated parasites (**Fig. 2g,h**), while
 18 the parasites treated with larval ES exhibited an accumulation of lipid-storage
 19 bodies and autophagic vacuoles in the cytoplasm, DNA disorganization in
 20 nuclei, and mitochondrial swelling (**Fig. 2 i-l**).



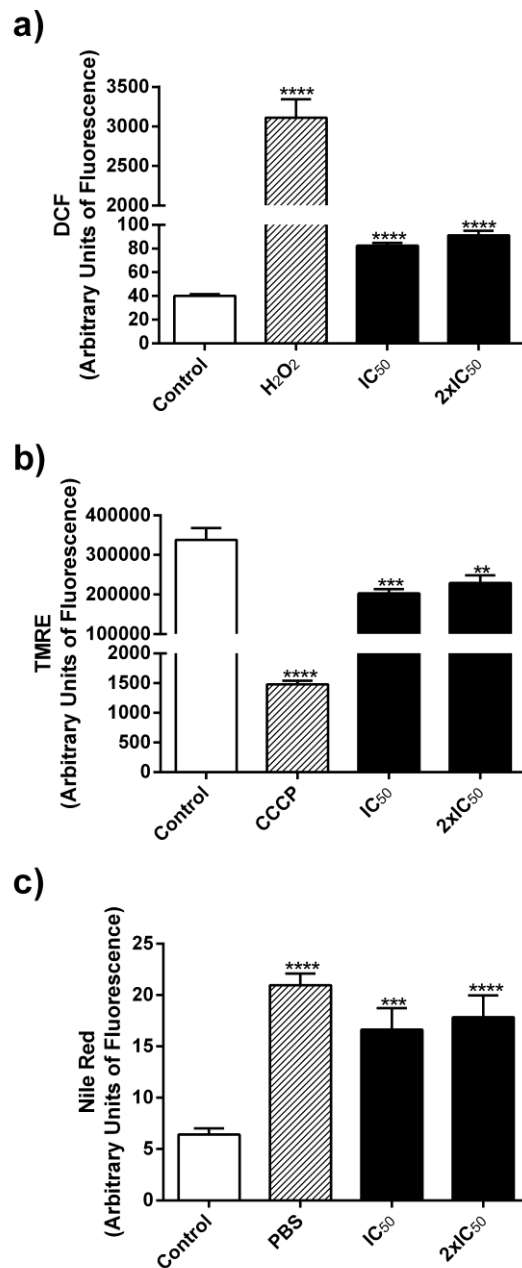
1

2 **Figure 2: Morphological and ultrastructural alterations on promastigotes**
 3 **of *L. amazonensis* treated with IC_{50} and $2x IC_{50}$ of larval ES for 24 h.** SEM
 4 images: **(A-B)** untreated promastigotes; **(C-D)** IC_{50} larval-ES treated parasites;
 5 **(E-F)** $2xIC_{50}$ larval-ES treated parasites. TEM images: **(G-H)** untreated
 6 promastigotes; **(I-J)** IC_{50} larval ES-treated parasites; **(K-L)** $2xIC_{50}$ larval
 7 ES-treated parasites.fp, flagellar pocket; f, flagellum; k, kinetoplast;m,
 8 mitochondrion;n, nucleus;* , autophagic vacuole;▲, swelling mitochondrial;■,
 9 lipid-storage bodies; ▶, DNA disorganization in nuclei. Scale bars = 5 μm (A, B,
 10 D), 4 μm (C, E), 3 μm (F), 1 μm (I, L), 0.5 μm (G, H, J, K).

11

1 **3.3 Larval ES increases ROS generation, mitochondrial depolarization,**
2 **and formation of lipid droplets in *L. amazonensis* promastigote forms**

3 Knowing that larval ES acted on promastigote forms, we sought to
4 understand the mechanisms triggered by the treatment. The fluorimetric
5 analysis showed that promastigotes forms of *L. amazonensis* treated with larval
6 ES (IC₅₀ and 2x IC₅₀) presented higher ROS generation (**Fig. 3a**), as well as
7 depolarization of the mitochondrial membrane, comparing with the control
8 (p<0.0001)(**Fig. 3b**). Furthermore, we observed that promastigotes treated with
9 larval ES (IC₅₀ and 2xIC₅₀) showed an increase in the formation of lipid droplets
10 in relation to non-treated parasites (p<0.0001) (**Fig.3c**). The IC₅₀ and 2xIC₅₀
11 treatments did not differ from each other.



1

2 **Figure 3: Death mechanisms induced by larval ES in promastigote forms**3 **of *L. amazonensis*.** Promastigotes of *L. amazonensis* were treated with larval4 ES (IC₅₀ and 2xIC₅₀) for 24 h and analyzed by the fluorescence unit. A) ROS5 production by DCF fluorescence, B) Alteration of $\Delta\Psi_m$ by TMRE and C)

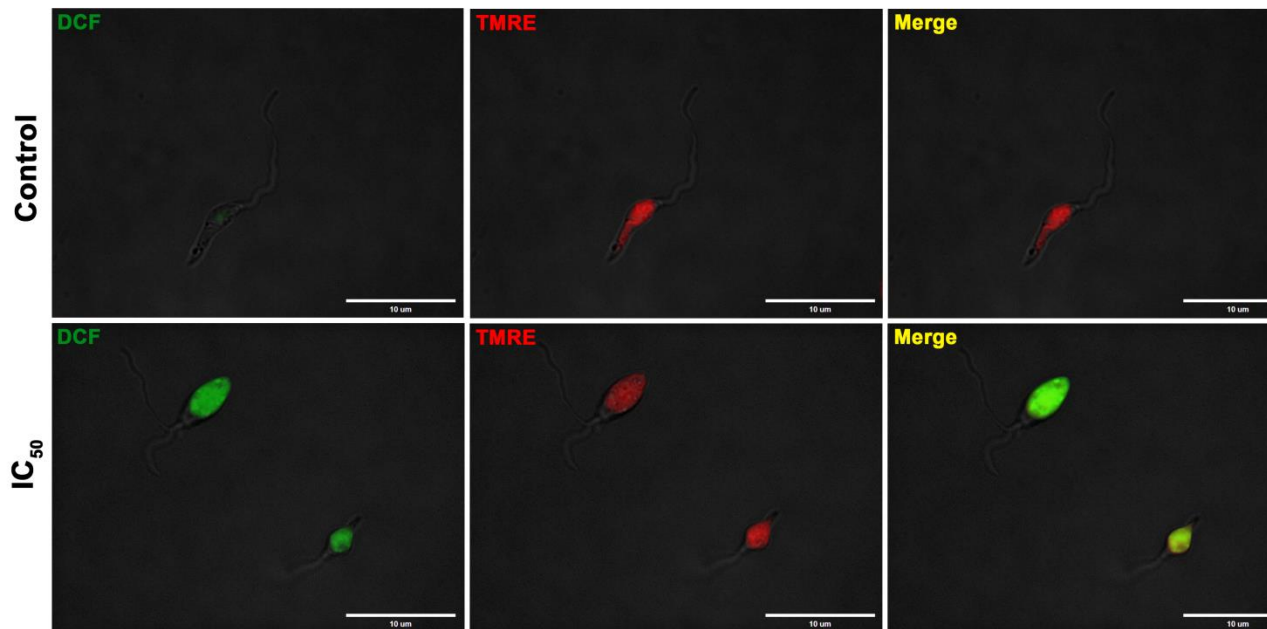
6 Accumulation of cytoplasmic LD by Nile Red. Promastigotes were cultivated in

7 medium 199 were used as a negative control, H₂O₂, CCCP, and PBS as a8 positive control. The values shown are expressed as mean \pm standard

9 deviation.

10

1 These data were confirmed through fluorescence microscopy, in which the
 2 non-treated parasites (control) presented virtually no DCF and strong TMRE
 3 labelling, whereas the treated parasites showed strong DCF and weak TMRE
 4 labelling. In addition, we found an overlap of the markers, suggesting that the
 5 ROS induced by Larval ES could be acting directly on the mitochondria (**Fig. 4**).



6
7

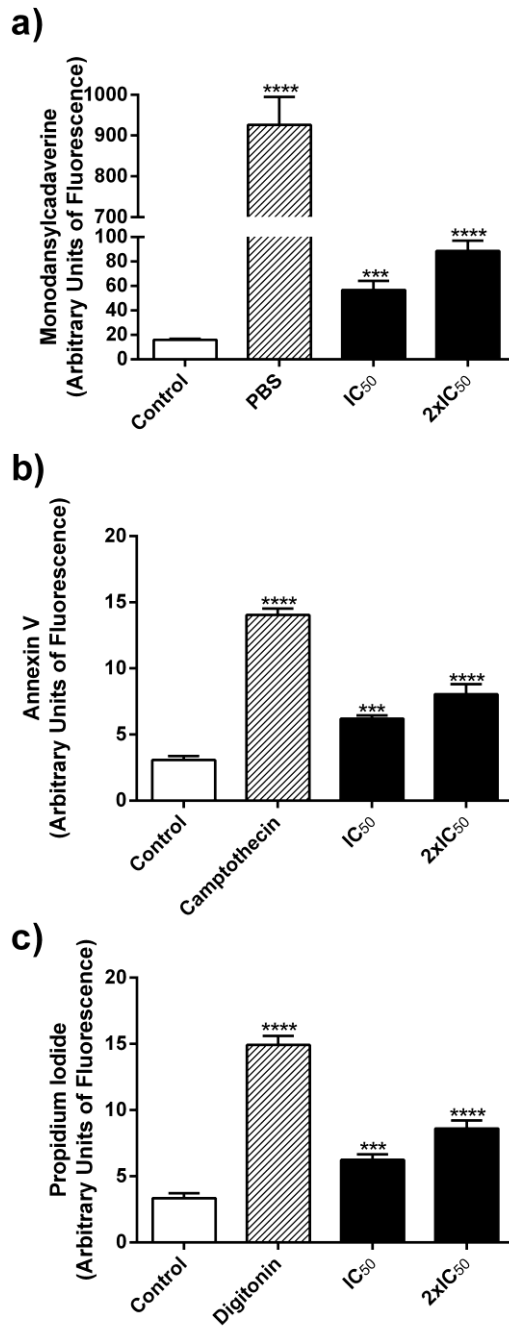
8 **Figure 4: Reactive oxygen species and mitochondrial membrane integrity**
 9 **by larval ES in *L. amazonensis* promastigotes.** Promastigotes were treated
 10 for 24 h with larval ES at the IC_{50} (2 $\mu\text{g/mL}$) and $2 \times IC_{50}$ (4 $\mu\text{g/mL}$)
 11 representative images taken by fluorescence microscopy showing ROS
 12 measurements as indicated by DCF fluorescence (green) and mitochondrial
 13 membrane integrity as indicated by TMRE marker (red). Control (untreated
 14 parasites). Scale bars = 10 μm . The data represent the mean \pm SEM of three
 15 independent experiments performed in duplicate.

16

17 **3.4 Larval ES induces autophagy and apoptosis-like death in *L.*** 18 ***amazonensis* promastigotes**

19 After 24 h of larval ES treatment (IC_{50} and $2 \times IC_{50}$) on promastigote forms,
 20 we observed higher fluorescence intensity of MDC in relation to the control
 21 ($p < 0.001$), suggesting an accumulation of autophagic vacuoles (**Fig. 4a**). We
 22 also assessed the exposure of phosphatidylserine and the integrity of the
 23 plasma membrane in the parasites treated with larval ES (IC_{50} and $2 \times IC_{50}$). We

1 found an increase in the levels of Annexin V and PI fluorescence comparing
 2 with the control ($p < 0.001$), which indicates an increase in cell death caused by a
 3 late apoptosis-like pathway (**Fig. 4b,c**).



4

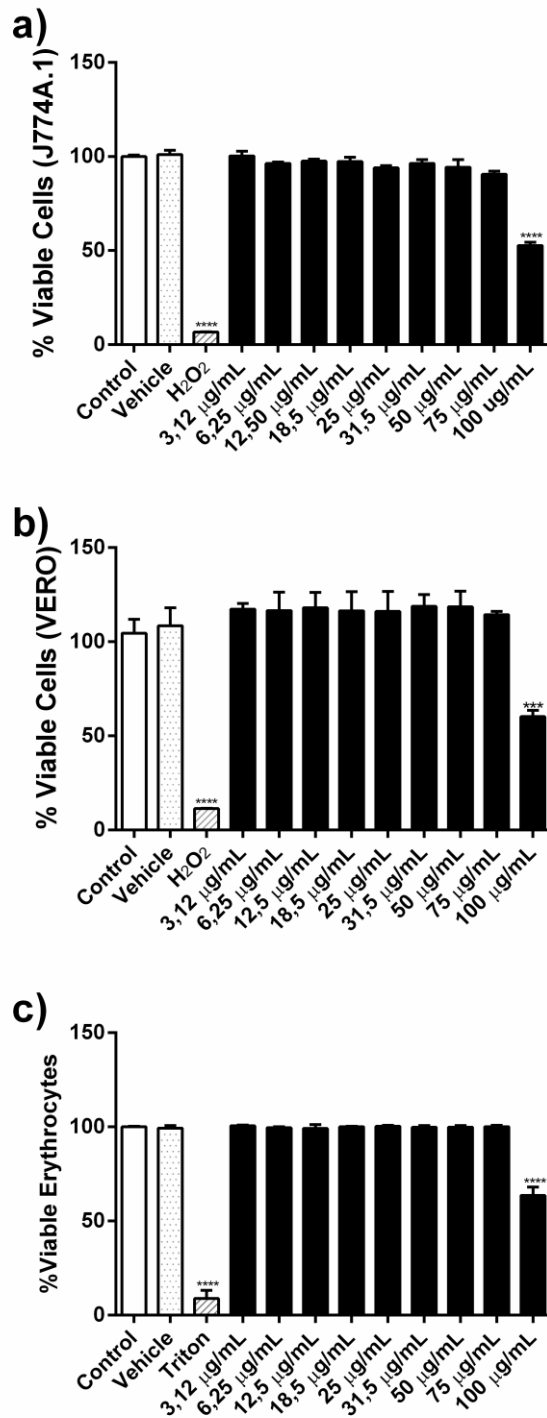
5 **Figure 5: Larval ES of *L. cuprina* induces autophagy and apoptosis-**
 6 **like in promastigote forms of *L. amazonensis*.** Promastigotes of *L.*
 7 *amazonensis* were treated with IC₅₀ and 2xIC₅₀ of larval ES for 24 h. A) MDC
 8 for autophagic vacuoles, B) Annexin V for phosphatidylserine exposure and C)

1 PI for cell membrane integrity. Medium 199 was used as negative control and
2 PBS as a positive control. Values are expressed as mean \pm standard deviation.

3

4 **3.5 Larval ES shows low cytotoxicity to VERO, J774A.1 cell lines, and** 5 **sheep erythrocytes**

6 To understand the effect of larval ES on mammalian cells, we investigated
7 its hemolytic potential and cytotoxic effect on an epithelial cell lineage (VERO).
8 Additionally, considering that cells are the main reservoir of parasites of the
9 *Leishmania* genus in the immune system, with the macrophages being mostly
10 infected (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018), we assessed the toxicity in
11 J774A.1 cells. Larval ES showed cytotoxicity in all cells tested only at the
12 highest concentration (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with a reduction of 48.06, 47.28, and 36.47,
13 respectively in for J774A.1, VERO and erythrocytes in relation to the control
14 ($p < 0.0001$) (**Fig. 5a,b,c**). Therefore, we chosen the lowest Larval ES
15 concentrations for further experiments (3.12, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).



1

2 **Figure 6: Cytotoxicity in J774A.1, VERO cell lines, and sheep erythrocyte.**

3 The cell lines were incubated with concentrations (3.12, 6.25, 12.5, 18.5, 25,
 4 31.5, 50, 75 and 100 μ g/mL) of larval ES for 24 h. Cell viability analysis was
 5 analyzed by MTT, where A) VERO, B) J774A.1, and C) Sheep erythrocytes
 6 incubated with larval ES for 3 h. The values presented are expressed as mean
 7 \pm standard deviation.

3.6 Larval ES has a leishmanicidal effect on *L. amazonensis* amastigotes

Since the treatment showed low cytotoxicity on macrophages and other mammalian cells, we performed an anti-amastigote assay to assess the leishmanicidal effect of Larval ES on *L. amazonensis*-infected macrophages, considering the percentage of infected cells and the number of amastigotes after 24h-treatment (3.12, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The results demonstrated that the larval ES reduced the percentage of infected macrophages (J774A.1) by 34.86, 47.24, 45.11, and 48.17% ($p < 0.01$), respectively, for 3.12, 6.25, 12.5, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 6a). Furthermore, the same tested concentrations were able to significantly reduce the number of amastigotes per macrophage by more than 50% ($p < 0.0001$) (Fig. 6b).

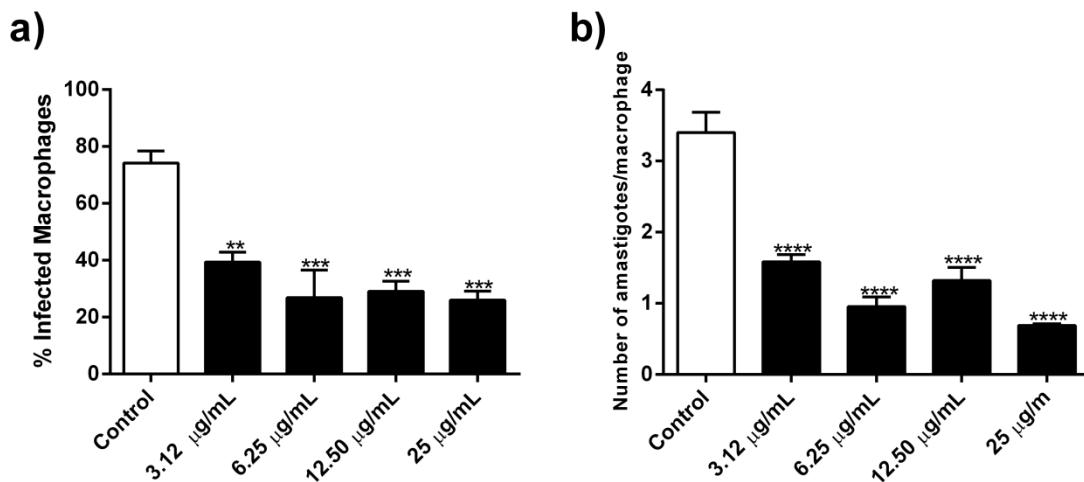
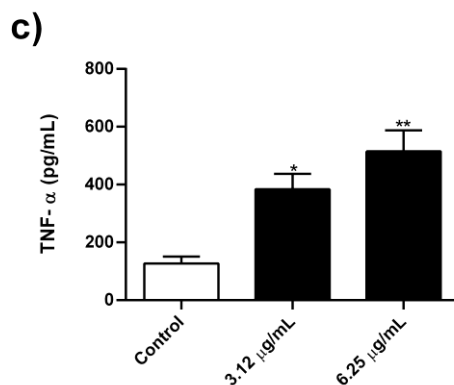
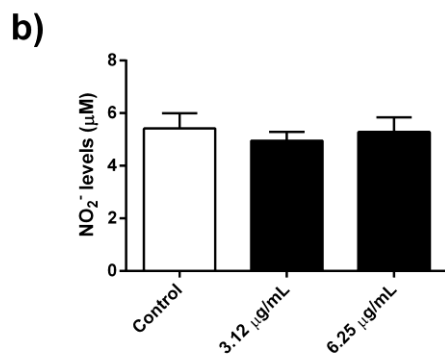
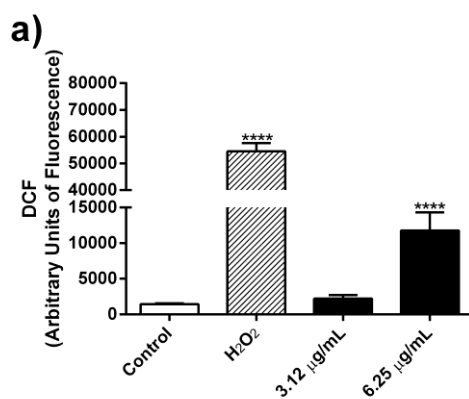


Figure 7: Larval ES activity on macrophages infected with *L. amazonensis*. *L. amazonensis*-infected macrophages J774A.1 treated with larval ES for 24 h at concentrations (1.60, 3.12, 6.25, 12.5, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and evaluated in an optical microscope, 20 random fields from each coverslip were counted, 3 coverslips of each concentration, in 100x magnification under immersion. A) Number of infected macrophages, and B) the number of amastigotes per macrophage. The values shown are expressed as mean \pm standard deviation.

3.7 Larval ES induces higher ROS generation and TNF- α levels in *L. amazonensis*-infected macrophages

1 Considering that all tested concentrations had an anti-amastigote effect,
2 for the following tests we selected the lowest concentrations that caused
3 deleterious effects on the intracellular form of the parasite (3.12 and
4 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

5 The treatment using larval ES was able to induce a significant increase in
6 the ROS generation in infected macrophages at a concentration of 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
7 comparing with the control ($p < 0.0001$) (**Fig. 7a**). However, none of the
8 concentrations revealed significant difference in the NO levels in relation to the
9 control (**Fig. 7b**).



1 **Figure 8: Increased levels of ROS and TNF- α in macrophages**
2 **infected and treated with larval ES.** Macrophages were infected with *L.*
3 *amazonensis* and treated with larval ES (3.12 and 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. A)
4 Measurement of ROS levels by marking with the H_2DCFDA probe, B) NO levels
5 measured by the Griess method and C) Evaluation of TNF- α production by the
6 ELISA immunoassay. Untreated *L. amazonensis*-infected macrophages were
7 used as a negative control and H_2O_2 as a positive control. The values shown
8 are expressed as mean \pm standard deviation.

9 Finally, our results showed higher TNF- α levels in groups treated with
10 larval ES at both concentrations tested ($p < 0.05$)(**Fig. 7c**). The IL-10 and IL-6
11 levels were below the detection levels of the kits (data not shown).

12

13 **DISCUSSION**

14 Leishmaniasis is a neglected tropical disease related to socioeconomic
15 factors, commonly endemic to developing countries and areas, however, with
16 the intense immigration of people, it has spread to several countries of the
17 globe, elevating it as a major neglected tropical disease, according to the WHO,
18 whose search for treatments is now a priority (BURZA, CROFT, BOELAERT,
19 2018).

20 The route of the drugs currently used in the treatment against
21 Leishmaniasis includes an administration that often requires hospitalization of
22 the infected individual involving long periods, in addition to causing the patient
23 to experience adverse effects, mostly resulting in the treatment interruption
24 (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Furthermore, the most worrying factor is
25 the emergence of drug resistant strains, which affects the result of the treatment
26 and spread of the parasite, therefore, it is urgent to seek and reach new
27 therapies against the disease (PONTE-SUCRE et al., 2017).

28 Given the difficulties presented for the treatment of Leishmaniasis, our
29 work presents a new efficient therapeutic alternative for the elimination of *L.*
30 *amazonensis* promastigotes and amastigotes, a species of wide distribution in
31 Brazil and Latin America, causing ATL and diffuse CL (TORRES-GUERRERO
32 et al., 2017).

1 The main components of insects larval ES are antimicrobial peptides
2 (AMPs), which presents potent antimicrobial effects. Our results demonstrate
3 that larval ES has a leishmanicidal effect on promastigote and amastigote forms
4 of *L. amazonensis*, corroborating with previous *in vitro* studies, showing that
5 larval ES of Calliphoridae blowfly have presented efficacy against
6 promastigotes forms of *L. panamensis*, *L. tropica*, and *L. major* (LAVERDE-PAZ
7 et al. 2018, CRUZ-SAAVEDRA et al. 2016, POLAT et al. 2012, SANEI-
8 DEHKORDI et al. 2016), and *in vivo* experiments suggest higher pro-
9 inflammatory response (LAVERDE-PAZ et al. 2018, CRUZ-SAAVEDRA et al.
10 2016).

11 Based on these data, our study is the first to determine the IC_{50} (2 $\mu\text{g/mL}$)
12 and $2xIC_{50}$ (4 $\mu\text{g/mL}$) values of larval ES of the *L. cuprina* species, with lower
13 inhibitory concentrations comparing with other species of flies from the
14 Calliphoridae family, such as *L. sericata* (IC_{50} 41.44 $\mu\text{g/mL}$), and
15 *Sarconesiopsis magellanica* (IC_{50} 23.42 $\mu\text{g/mL}$) against *L. panamensis*
16 (LAVERDE-PAZ et al., 2018).

17 Additionally, larval ES-treated parasites exhibited rounded shape and
18 reduced cell body size, cell surface roughness, and apparent leakage of
19 cytoplasmic contents. These morphological alterations occur because insect
20 AMPs have a positive charge or a positively charged surface under
21 physiological pH, which facilitates the connection to the microbial surface, which
22 has a negative charge, through charge-charge interaction, followed by
23 membrane disturbances or opening of pores (YI et al., 2014, WILMES et al.,
24 2011).

25 At the ultrastructural level, we observed that the treatment with larval ES
26 induced an accumulation of lipid-storage bodies and autophagic vacuoles in the
27 cytoplasm, DNA disorganization in nuclei, and mitochondrial swelling. Similar
28 morphological characteristics have already been described with other
29 compounds and related to apoptosis-like death (MIRANDA-SAPLA et al, 2019).

30 ROS are considered signaling molecules that regulate crucial components
31 to cellular functioning, which makes them potentially antimicrobial. Its effect
32 occurs through the reaction with the thiol group in enzymes, proteins, DNA, and
33 cell membranes (DRYDEN, 2018, KUMARI et al., 2017). The high generation of

1 ROS can lead to the formation of pores and alteration of mitochondrial
2 permeability, the so-called “ROS-induced ROS” effect, in which the increase in
3 cytoplasmic ROS causes mitochondrial disturbance and consequent release of
4 ROS generated by mitochondrial metabolism, a type of positive feedback that
5 spreads throughout the cell (ZOROV, JUHASZOVA, SOLLOTT, 2014).

6 Oxidative stress can lead to the loss of essential components of the
7 electron transport chain under its effects, structural modification of the lipid
8 membrane and deficiency in mitochondrial functionality, notable cellular
9 damage, and death (SINHA et al., 2013). In our work, the larval ES at IC₅₀ and
10 2xIC₅₀ concentrations significantly increased ROS levels in promastigote forms,
11 thus suggesting that the parasite was suffering from cellular stress.

12 Mitochondria is an organelle of great importance for cell survival, providing
13 energy by generating ATP through oxidative phosphorylation, which makes it an
14 easy target for increasing ROS generation and cell stress, and may induce the
15 release of cytochrome c into the cytoplasm (SAUDAGAR, DUBEY, 2014). In
16 parasites such as *Leishmania*, which has a single mitochondrion, proper
17 functioning of this organelle is essential to guarantee its survival (SHADAB et
18 al., 2017). Larval ES was able to lead to mitochondrial depolarization in the
19 parasites, as a consequence of the oxidative stress caused by the increased
20 ROS generation.

21 Mitochondrial dysfunctions can favor the formation of LD, mainly
22 composed of neutral lipids, triglycerides, and sterols, by changing metabolic
23 pathways for glycolysis and fatty acid biosynthesis in stressful situations (LEE et
24 al., 2013). Thus, the greater LD formation in the treated parasites suggest that
25 promastigotes were under cellular stress. All data presented so far corroborate
26 the ultrastructural assessment, which revealed abnormalities in the
27 mitochondrial structure and considerable accumulation of cytoplasmic lipids.

28 Autophagy is a pathway physiologically involved in the removal of
29 damaged cellular components, initially intended for cell survival. It is
30 characterized by forming autophagic vacuoles and can be activated in situations
31 of cellular stress. Although autophagy is a process of cell recovery and cycling,
32 over activation of this pathway can initiate the process of cell death (DOLAI,
33 ADAK, 2014, MACHADO et al., 2017). Our results showed an accumulation of

1 autophagic vacuoles throughout the parasite body, suggesting permanent loss
2 of organelle functionality.

3 Apoptosis is a death process that frequently occurs in parasites of the
4 genus *Leishmania* involving physical and biochemical changes such as cell
5 stress, mitochondrial damage, and changes in the parasite's morphology such
6 as body retraction, phosphatidylserine exposure, and nuclear fragmentation
7 (MIRANDA-SAPLA et al. 2019, BORTOLETI et al., 2018). Our fluorimetry
8 assays identified a considerable increase in both markers of cell death,
9 phosphatidylserine exposure, and membrane permeabilization.

10 Thus, our results demonstrate that 24h ES-treatment in *L. amazonensis*
11 promastigotes was able to induce morphological and ultrastructural damage
12 observed through SEM, TEM, and fluorometric tests, like a reduction of the cell
13 body, exhibited cell surface roughness, and apparent leakage of cytoplasmic
14 contents, disorganization in nuclei, mitochondrial swelling. In addition, we
15 observed higher ROS generation, mitochondrial depolarization, formation of
16 lipid droplets, autophagic vacuoles, phosphatidylserine exposure, and loss of
17 membrane integrity in parasites. This triggered a pathway that is particular to
18 late apoptosis-like process, with co-labeling of annexin-V and propidium iodide.
19 Such mechanism has been recently described in the same parasite species
20 treated using different compounds and extracts (ASSOLINI et al. 2020,
21 MIRANDA-SAPLA et al. 2019, BORTOLETI et al., 2018, TOMIOTTO-
22 PELLISSIER et al., 2018, GONÇALVES et al., 2018), suggesting that
23 apoptosis-like is a plausible mechanism through which ES induces
24 promastigotes death.

25 Amastigote forms are necessarily intracellular and are located within cells
26 of the innate immune system, especially the host macrophages, which has been
27 a challenge in the development of new effective drugs for leishmaniasis
28 (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Therefore, new candidate substances
29 for therapy should not be considered toxic to the host organism, however, they
30 must be effective against intracellular forms of *Leishmania* spp. (BORTOLETI et
31 al., 2018). Larval ES is presented as a candidate for anti-leishmaniasis therapy
32 for not inducing cytotoxic effects and eliminating amastigotes even at low
33 concentrations, therefore presenting greater selectivity for the parasite than for

1 the mammalian cell. Membranes of microorganisms have a greater negative
2 charge than that of humans, which may explain the selectivity of insect
3 defensins against microbes with low toxicity to the host (WILMES et al., 2011).

4 Producing ROS and NO is important to eliminate intracellular parasites
5 (HORTA et al. 2012). Although NO is an important microbicide molecule, it is
6 not the main mediator in the *L. amazonensis* death mechanism (GONÇALVES
7 et. al, 2018). In the phagocytosis process, there is an increase in the oxygen
8 demand of the phagocytic cells, known as respiratory burst, in which higher
9 ROS generation occurs, which may be responsible for eliminating the parasite,
10 promoting direct oxidative damage, imbalance in lipid metabolism, DNA
11 damage, as well as oxidation and nitrogen base dosing (PAIVA, BOZZA, 2014).

12 Immunomodulation through cytokine secretion can target *Leishmania*
13 infection at its initial phase (MIRANDA-SAPLA et al., 2019). Tumor necrosis
14 factor-alpha (TNF- α) is a cytokine secreted by cells of the innate immune
15 system and mainly by activated macrophages. It is considered important in the
16 pro-inflammatory response profile, with antiparasitic activity acting in the
17 elimination of *Leishmania* by inducing the synthesis of microbicide molecules
18 (DAYAKAR et al., 2019). The hypothesis that TNF- α can induce ROS
19 generation is well accepted, which, in turn, inhibit the activation of NF- κ B,
20 leading to cell death. Yet, another possibility is that the increase in intracellular
21 ROS, commonly a product of cell metabolism, causes irreparable stress,
22 culminating in cell death (BLASER et al., 2016).

23 Studies show that in mice susceptible to *Leishmania* infection, TNF- α
24 production is absent, which demonstrates the role of this cytokine in the
25 immune response against the parasite (DAYAKAR et al., 2019). Furthermore,
26 TNF- α was able to activate *in vitro* murine macrophages infected with *L. major*
27 amastigotes, in addition to the presence of the intracellular parasite inducing a
28 greater production of TNF- α (THEODOS et al., 1991). TNF- α can induce a
29 greater pro-inflammatory response by promoting Th1 responses with IFN- γ
30 production (MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016, MIRANDA-SAPLA et al.,
31 2019). Additionally, it is also known that ROS and TNF- α act on positive
32 feedback, in which TNF- α induces higher ROS generation, while ROS induces
33 the production of pro-inflammatory cytokines (BLASER et al., 2016).

1 Knowing that immunomodulation for the type 1 response with TNF- α
2 production can lead to the synthesis of more ROS, we believe that these
3 mechanisms are responsible for the elimination of amastigotes in J774A.1
4 macrophages treated with larval ES, while promastigotes can be eliminated
5 through apoptosis-like mechanism.

6 7 **CONCLUSION**

8 In conclusion, larval ES of flies of the species *Lucilia cuprina* showed
9 leishmanicidal activity *in vitro* on promastigote forms of *L. amazonensis* by
10 increasing the ROS generation, depolarization of the mitochondrial membrane,
11 production of lipid bodies, formation of cytoplasmic autophagic vacuoles,
12 causing morphological and ultrastructural changes, culminating in late
13 apoptosis-like death. Larval ES did not demonstrate cytotoxic activity in J774A.1
14 and VERO cell lines nor hemolytic activity at the tested concentrations. In
15 addition, the treatment was able to reduce the number of intracellular
16 amastigote forms from infected macrophages and amastigotes by
17 macrophages, suggesting that our treatment has high selectivity for the
18 parasite, possibly by increasing the production of TNF- α and consecutively
19 ROS.

20 21 **REFERENCES**

22 ARORA, S.; BAPTISTA, C.; LIM, C. Maggot metabolites and their combinatory
23 effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. **Annals of Clinical
24 Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 6, 2011.

25 BLASER, Heiko et al. TNF e ROS crosstalk na inflamação. **Tendências em
26 biologia celular** , v. 26, n. 4, pág. 249-261, 2016.

27 BRADY, Daniel et al. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential
28 Therapeutic Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 20,
29 n. 23, p. 5862, 2019.

30 BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Caffeic acid has antipromastigote activity by
31 apoptosis-like process; and anti-amastigote by TNF- α /ROS/NO production and
32 decreased of iron availability. **Phytomedicine**, v. 57, p. 262–270, 2019.

33 BURZA, Sakib; CROFT, Simon L .; BOELAERT, Marleen. Leishmaniose. **The
34 Lancet** , v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

35 CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **CDC - Leishmaniasis -**

- 1 **Biology**. 2019.
- 2 ČEŘOVSKÝ, V. et al. Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of
3 medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. **Cellular and Molecular Life**
4 **Sciences**, v. 67, n. 3, p. 455–466, 2010.
- 5 CHERNYSH, S.; GORDYA, N.; SUBOROVA, T. Insect Antimicrobial Peptide
6 Complexes Prevent Resistance Development in Bacteria. **PLOS ONE**, v. 10, n.
7 7, p. e0130788, 2015.
- 8 CRUZ-SAAVEDRA, L. et al. The effect of *Lucilia sericata*- and *Sarconesiopsis*
9 *magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. **Acta Tropica**,
10 v. 164, p. 280–289, 2016.
- 11 DAYAKAR, Alti et al. Cytokines: key determinants of resistance or disease
12 progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and
13 immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 10, 2019.
- 14 DÍAZ-ROA, Andrea et al. *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae)
15 excretions and secretions have potent antibacterial activity. **Acta tropica**, v.
16 136, p. 37-43, 2014.
- 17 DÍAZ-ROA, Andrea et al. Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval
18 excretions and secretions with antibacterial properties. **Frontiers in**
19 **microbiology**, v. 9, p. 2249, 2018.
- 20 DOLAI, S.; ADAK, S. Endoplasmic reticulum stress responses in *Leishmania*.
21 **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 1-8, 2014.
- 22 DRYDEN, M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. **International**
23 **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 299-303, 2018.
- 24 GONÇALVES, M. D. et al. Dehydroabiatic acid isolated from *Pinus elliottii*
25 exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS
26 production in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in
27 amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, v. 128, p. 224–232,
28 2018.
- 29 HORTA, Maria Fátima et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in
30 cutaneous leishmaniasis. **Journal of parasitology research**, v. 2012, 2012.
- 31 KUMARI, A. et al. Intracellular zinc flux causes reactive oxygen species-
32 mediated mitochondrial dysfunction leading to cell death in *Leishmania*
33 *donovani*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, 2017.
- 34 LABONY, Sharmin Shahid et al. Apply traditional and molecular protocols for
35 the detection of carrier state of visceral leishmaniasis in black Bengal goat. **J**
36 **Agric Vet Sci**, v. 7, p. 13-18, 2014.
- 37 LAVERDE-PAZ, M. J. et al. Evaluating the anti-leishmania activity of *Lucilia*
38 *sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions/secretions in
39 an in vitro model. **Acta Tropica**, v. 177, p. 44–50, 2018.
- 40 LEE, S. J. et al. Mitochondrial dysfunction induces the formation of lipid droplets

- 1 as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular**
2 **Longevity**, 2013.
- 3 MACHADO, P. DE A. et al. VOSalophen: a vanadium complex with a stilbene
4 derivative—induction of apoptosis, autophagy, and efficiency in experimental
5 cutaneous leishmaniasis. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n.
6 6, p. 929–939, 2017.
- 7 MASPI, Nahid; ABDOLI, Amir; GHAFARIFAR, Fathemeh. Pro-and anti-
8 inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and**
9 **global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.
- 10 MIRANDA-SAPLA, M. M. et al. trans-Chalcone modulates *Leishmania*
11 *amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability.
12 **European Journal of Pharmacology**, v. 853, p. 275–288, 2019.
- 13 NOGUEIRA, F.D.S. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral
14 leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**,
15 v. 12, n. 1, p. 79, 2019.
- 16 PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to
17 pathogens? Antioxidants and Redox Signaling. **Antioxidants & redox**
18 **signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000-1037, 2014.
- 19 POLAT, Erdal et al. Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata*
20 larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: first
21 work. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 2, p. 129-134, 2012.
- 22 PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in
23 leishmaniasis: A 21st-century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v.
24 11, n. 12, 2017.
- 25 SANEI-DEHKORDI, A. et al. Anti *Leishmania* activity of *Lucilia sericata* and
26 *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. **Experimental Parasitology**, v.
27 170, p. 59–65, 2016.
- 28 SAUDAGAR, Prakash; DUBEY, Vikash Kumar. Molecular mechanisms of in
29 vitro betulin-induced apoptosis of *Leishmania donovani*. **The American journal**
30 **of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 2, p. 354-360, 2014.
- 31 SHADAB, M. et al. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated
32 with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2,
33 2017.
- 34 SINHA, Krishnendu et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and
35 mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of toxicology**, v.
36 87, n. 7, p. 1157-1180, 2013.
- 37
- 38 THEODOS, CM et al. Papel do fator de necrose tumoral na atividade
39 leishmanicida de macrófagos in vitro e resistência à leishmaniose cutânea in
40 vivo. **Infecção e imunidade**, v. 59, n. 8, pág. 2839-2842, 1991.
- 41 TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. International

- 1 Journal of Infectious Diseases. **International Journal of Infectious Diseases**,
2 v. 15, n. 8, p. 525-532, 2011.
- 3 TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda et al. Macrophage polarization in
4 leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2529,
5 2018.
- 6 TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniose: uma revisão. **F1000Research** ,
7 v. 6, 2017.
- 8 WILMES, Miriam et al. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it
9 than lipid bilayer perturbation. **Natural product reports**, v. 28, n. 8, p. 1350-
10 1358, 2011.
- 11 WU, Qinghua; PATOČKA, Jiří; KUČA, Kamil. Insect antimicrobial peptides, a
12 mini-review. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 461, 2018.
- 13 YI, Hui-Yu et al. Insect antimicrobial peptides, and their applications. **Applied**
14 **microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 13, p. 5807-5822, 2014.
- 15 YOUNG, A. R.; MEEUSEN, E. N. T.; BOWLES, V. M. Characterization of ES
16 products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae. **International**
17 **Journal for Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 245–252, 1996.
- 18 ZOROV, Dmitry B.; JUHASZOVA, Magdalena; SOLLITT, Steven J.
19 Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release.
20 **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 909-950, 2014.

21

22 CONCLUSÃO

23 Em conclusão, o ES larval de moscas da espécie *Lucilia cuprina*
24 apresentou atividade leishmanicida in vitro sobre formas promastigotas de *L.*
25 *amazonensis* por aumento da geração de ROS, despolarização da membrana
26 mitocondrial, produção de corpos lipídicos, formação de vacúolos autofágicos
27 citoplasmáticos, causando morfologia e alterações ultraestruturais, culminando
28 em morte tardia semelhante à apoptose. O ES larval não demonstrou atividade
29 citotóxica nas linhagens celulares J774A.1 e VERO nem atividade hemolítica
30 nas concentrações testadas. Além disso, o tratamento foi capaz de reduzir o
31 número de formas amastigotas intracelulares de macrófagos infectados e
32 amastigotas por macrófagos, sugerindo que nosso tratamento tem alta
33 seletividade para o parasita, possivelmente por aumentar a produção de TNF- α
34 e de ROS consecutivamente.

35

36 REFERENCIAS

- 1 ABDEL-SAMAD, Mohammad RK. Antiviral and virucidal activities of *Lucilia*
2 *cuprina* maggots' excretion/secretion (Diptera: Calliphoridae): first
3 work. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02791, 2019
- 4 ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second
5 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 334-359, 2008.
- 6 ARORA, S.; BAPTISTA, C.; LIM, C. Maggot metabolites and their combinatory
7 effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. **Annals of Clinical**
8 **Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 6, 2011.
- 9 BRADY, Daniel *et al.* Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential
10 Therapeutic Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 20,
11 n. 23, p. 5862, 2019.
- 12 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.
13 Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância
14 da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde,
15 Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças
16 Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017
- 17 CALEFFE, R. *et al.* Biological control of diptera calliphoridae: A review. **Journal**
18 **of the Entomological Research Society**, v. 21, n. 2, p. 144-155, 2019.
- 19 CAO, Xiaolong; GULATI, Mansi; JIANG, Haobo. Serine protease-related
20 proteins in the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect biochemistry**
21 **and molecular biology**, v. 88, p. 48-62, 2017.
- 22 CARVALHO, A. K. *et al.* *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis*
23 promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response
24 in murine model. **Parasite immunology**, v. 34, n. 8-9, p. 395-403, 2012.
- 25 CARVALHO, S. H. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical
26 review of the current therapeutic approach with systemic meglumine
27 antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical**
28 **Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 2019.
- 29 CDC, C. FOR D. C. AND P. CDC - Leishmaniasis - Biology. 2019.
- 30 ČEŘOVSKÝ, V. *et al.* Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of
31 medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. **Cellular and Molecular Life**
32 **Sciences**, v. 67, n. 3, p. 455–466, 2010.
- 33 CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the
34 treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10,
35 p. 1251-1265, 2019.
- 36 CHERNYSH, S.; GORDYA, N.; SUBOROVA, T. Insect Antimicrobial Peptide
37 Complexes Prevent Resistance Development in Bacteria. **PLOS ONE**, v. 10, n.
38 7, p. e0130788, 2015.
- 39 CHRISTENSEN, S. M. *et al.* Host and parasite responses in human diffuse
40 cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical**
41 **Diseases**, v. 13, n. 3, 2018.

- 1 CRUZ-SAAVEDRA, L. *et al.* The effect of *Lucilia sericata*- and *Sarconesiopsis*
2 *magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. **Acta Tropica**,
3 v. 164, p. 280–289, 2016.
- 4 DA SILVA, Marcelo Santos *et al.* Consequences of acute oxidative stress in
5 *Leishmania amazonensis*: From telomere shortening to the selection of the
6 fittest parasites. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell**
7 **Research**, v. 1864, n. 1, p. 138-150, 2017.
- 8 DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-
9 leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent
10 reductase, TDR1. **Biochemical Journal**, v. 381, n. 2, p. 405–412, 2004.
- 11 DÍAZ-ROA, A. *et al.* Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* Blowfly Larval
12 Excretions and Secretions With Antibacterial Properties. **Frontiers in**
13 **Microbiology**, v. 9, 2018.
- 14 FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New
15 perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.
- 16 GONCALVES, R. *et al.* Platelet activation attracts a subpopulation of effector
17 monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **Journal of Experimental**
18 **Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1253–1265, 2011.
- 19 GÓNGORA, J. *et al.* Evaluating the effect of *Sarconesiopsis magellanica*
20 (Diptera: Calliphoridae) larvae-derived haemolymph and fat body extracts on
21 chronic wounds in diabetic rabbits. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015,
22 2015.
- 23 GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous
24 and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**,
25 v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.
- 26 HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis:
27 Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of**
28 **the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015.
- 29 ILARI, Andrea *et al.* Polyamine-trypanothione pathway: an update. **Future**
30 **medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 61-77, 2017.
- 31 KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v.
32 21, n. 2, p. 123–152, 1995.
- 33 LABONY, S. S. *et al.* Apply traditional and molecular protocols for the detection
34 of carrier state of visceral leishmaniasis in black Bengal goat. **IOSR Journal of**
35 **Agriculture and Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 13–18, 2014.
- 36 LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical
37 distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in**
38 **biology and medicine**, v. 1 - Biology and epidemiology. Academic Press:
39 London, p. 1-120, 1987.
- 40 LAVERDE-PAZ, M. J. *et al.* Evaluating the anti-leishmania activity of *Lucilia*
41 *sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions/secretions in

- 1 an *in vitro* model. **Acta Tropica**, v. 177, p. 44–50, 2018.
- 2 LINCOPAN, Nilton; MAMIZUKA, Elsa M.; CARMONA-RIBEIRO, Ana M. Low
3 nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer
4 fragments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 727-734,
5 2005.
- 6 MASIERO, F. S. *et al.* First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia*
7 *macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of
8 *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Neotropical**
9 **Entomology**, v. 46, n. 1, p. 125–129, 2017.
- 10 MASPI, Nahid; ABDOLI, Amir; GHAFARIFAR, Fathemeh. Pro-and anti-
11 inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and**
12 **global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.
- 13 MENNA-BARRETO, Rubem Figueiredo Sadok; DE CASTRO, Solange Lisboa.
14 The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of
15 mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed research**
16 **international**, v. 2014, 2014.
- 17 OWINGS, Charity G.; PICARD, Christine J. New Distribution Record for *Lucilia*
18 *cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in Indiana, United States. **Journal of Insect**
19 **Science**, v. 18, n. 4, p. 8, 2018.
- 20 PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to
21 pathogens? Antioxidants and Redox Signaling. **Antioxidants & redox**
22 **signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000-1037, 2014.
- 23 REED S. G. *et al.* Selection of aspecific skin test antigen for American visceral
24 leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p.
25 78-85, 1986.
- 26 SCOCCHI, Marco; TOSSI, Alessandro; GENNARO, Renato. Proline-rich
27 antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. **Cellular**
28 **and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 2317-2330, 2011.
- 29 SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in
30 protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581,
31 2016.
- 32 SILVA, I. A. DA *et al.* In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia)*
33 *braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as
34 evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human
35 macrophages. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- 36 VIVARINI, Aislan de Carvalho; LOPES, Ulisses Gazos. The Potential Role of
37 Nrf2 Signaling in Leishmania Infection Outcomes. **Frontiers in Cellular and**
38 **Infection Microbiology**, v. 9, p. 453, 2020.
- 39 WILMES, Miriam *et al.* Antibiotic activities of host defense peptides: more to it
40 than lipid bilayer perturbation. **Natural product reports**, v. 28, n. 8, p. 1350-
41 1358, 2011.

- 1 WU, Qinghua; PATOČKA, Jiří; KUČA, Kamil. Insect antimicrobial peptides, a
2 mini review. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 461, 2018.
- 3 YI, Hui-Yu et al. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied**
4 **microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 13, p. 5807-5822, 2014.
- 5 YOUNG, A. R.; MEEUSEN, E. N. T.; BOWLES, V. M. Characterization of ES
6 products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae. **International**
7 **Journal for Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 245–252, 1996.