

## UTILIZAÇÃO DE LARVAS DE *Tenebrio Molitor* COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO

<sup>1</sup>Lara Luisa Valerio de Mello Braga;

laraluisabraga1@gmail.com

<sup>2</sup>Isabella Wzorek França dos Santos;<sup>2</sup>Laryssa Regis Bueno; <sup>1</sup>Fernanda da Silva Platner; <sup>2</sup>Bruna Carla da Silveira; <sup>2</sup>Karien Sauruk da Silva; <sup>3</sup>Natalia Mulinari Turin de Oliveira; <sup>4</sup>Elizabeth Soares Fernandes e <sup>4</sup>Daniele Maria Ferreira.

<sup>1</sup>Aluna Iniciação Científica; <sup>2</sup>Aluna de Mestrado; <sup>3</sup>Aluna de Doutorado; <sup>4</sup>Professora orientadora

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdades Pequeno Príncipe, Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe

**RESUMO:** O processo inflamatório está associado a diversas doenças. Apesar de a curto prazo constituir uma resposta vital, a resposta inflamatória aguda pode evoluir para uma condição crônica se a homeostase não for restaurada ou se a ativação do sistema imunológico for mantida. A exposição à inflamação, portanto, pode causar danos permanentes, tornando-se necessária a busca constante por novas alternativas terapêuticas. Nesse sentido, animais vertebrados, como camundongos, têm sido amplamente utilizados em pesquisas médicas e científicas básicas para estudos testes de substâncias de interesse farmacológico, avaliação da eficácia de substâncias anti-inflamatórias e no desenvolvimento de novas terapias. No entanto, algumas questões éticas têm sido levantadas por pesquisadores e pela sociedade, e desde então esta prática têm sido reformulada. Além disso, o uso de animais experimentais requer alto investimento econômico e mão de obra qualificada. Assim, pesquisadores em todo o mundo têm sido cada vez mais incentivados a reduzir ou substituir a experimentação animal por metodologias alternativas. Dentre os modelos alternativos mais utilizados, podemos incluir o uso dos vermes planaria e *Caenorhabditis elegans*, além de insetos como *Drosophila melanogaster*. Mais recentemente, outros insetos como *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* ganharam atenção devido à conservação evolutiva de várias características fisiológicas importantes. As larvas de *T. molitor*, por exemplo, têm sido utilizadas para o estudo de efeitos de substâncias anti-inflamatórias, antifúngicas, antimicrobianas e substâncias tóxicas. Além da importância da substituição de animais vertebrados em etapas específicas da experimentação básica, a criação e manutenção das larvas de *T. molitor* apresentam outras vantagens, como baixo custo, representando assim um ótimo modelo de alternativo de pesquisa. **Objetivos:** Desta maneira, a elaboração deste trabalho teve como objetivo padronizar o uso das larvas de *T. molitor* como método alternativo de pesquisa, e avaliar o efeito tóxico e anti-inflamatório de um polissacarídeo isolado do bagaço de um fruto comestível. Como posteriormente também vamos verificar a capacidade anti-inflamatória e cicatrizante deste polissacarídeo frente a um insulto inflamatório, duas substâncias tóxicas

(substância 1 e substância 2) que induzem resposta inflamatória foram testadas para os mesmos parâmetros. **Métodos:** As larvas de *T. molitor* foram adquiridas em produtor local. Primeiramente, a toxicidade foi avaliada. Para isso, as larvas de *T. molitor* foram separadas em diferentes grupos. Com o auxílio de uma seringa, as substâncias testes foram inoculadas na terceira pata falsa das larvas (veículo: as larvas receberam injeção de salina estéril; polissacarídeo: as larvas receberam três diferentes doses do polissacarídeo em mg/kg diluído em salina estéril; substância tóxica 1: as larvas receberam uma dose desta substância em mg/kg diluída em salina estéril; e substância tóxica 2: as larvas receberam uma dose desta substância em mg/kg diluída em salina estéril). Após este procedimento, as larvas de *T. molitor* foram monitoradas durante cinco dias para avaliação do escore de severidade, que inclui: observar a movimentação das larvas, a taxa de melanização e a sobrevivência. O escore foi calculado e analisado. No último dia da experimentação, a hemolinfa das larvas foi coletada e armazenada para dosagens de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. As larvas foram armazenadas em formalina tamponada neutra a 10% para avaliação histológica. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós teste de Tukey de comparações múltiplas. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo. **Resultados:** A partir dos nossos resultados preliminares é possível observar que no último dia de avaliação (dia 5), nenhuma das doses testadas do polissacarídeo causou toxicidade para as larvas quando comparado ao grupo veículo (média veículo: 1; média dose 1 do polissacarídeo: 0,83; média dose 2 do polissacarídeo: 1,42; média dose 3 do polissacarídeo: 1,38). Por outro lado, as duas substâncias tóxicas testadas (substância 1 e substância 2) apresentaram alta toxicidade e mortalidade, o que pode indicar um processo inflamatório severo. As amostras de hemolinfa coletadas, bem como a avaliação histológica ainda estão sob análise. **Conclusão:** Em síntese, nossos resultados demonstram que o polissacarídeo testado não é tóxico e pode ser avaliado quanto ao seu potencial anti-inflamatório; e que as duas outras substâncias testadas (substância 1 e substância 2) têm potencial para indução de inflamação.

**Perspectivas futuras:** Nossos objetivos futuros incluem a finalização da avaliação dos parâmetros de inflamação, estresse oxidativo e histológicos. Além disso, nosso grupo também está padronizando um modelo de cicatrização com as larvas de *T. molitor*.

**PALAVRAS-CHAVE:** metodologias alternativas, *Tenebrio molitor*, inflamação.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

BARNES, A. et al. **Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity.** The Royal Society, 2000, doi:2000.10.1098/rspb.2000.0984.

IGNASIAK, K. MAXWELL, A. **Galleria mellonella (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials.** BMC Research Notes, 2017, doi: 10.1186 / s13104-017-2757-8.

KAY, S. et al. **Galleria mellonella Infection Model Identifies Both High and Low Lethality of *Clostridium perfringens* Toxigenic Strains and Their Response to Antimicrobials.** Frontiers in Microbiology, 2019, doi: 10.3389 / fmicb.2019.01281.

TSAI, C, et. al. **Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing**. *Virulence*, 2016, doi: 10.1080 / 21505594.2015.1135289.