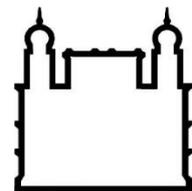




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**A INFLUÊNCIA DO DIABETES NA PATOGÊNESE DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA: O PAPEL DO LEUCOTRIENO B₄**

ICARO BONYEK SANTOS DA SILVA

Salvador - Bahia

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**A INFLUÊNCIA DO DIABETES NA PATOGÊNESE DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA: O PAPEL DO LEUCOTRIENO B₄**

ICARO BONYEK SANTOS DA SILVA

Orientadora: Dra. Natalia Machado Tavares

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau
de Mestre.

Salvador - Bahia

2018

"A INFLUÊNCIA DO DIABETES NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA: O PAPEL DO LEUCOTRIENO B₄".

ÍCARO BONYEK SANTOS DA SILVA

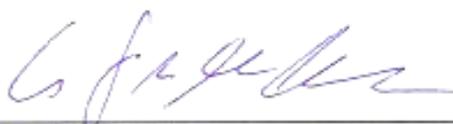
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 17 de Julho de 2018

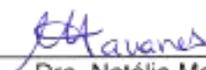
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de
Oliveira
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Natália Machado Tavares
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

À Deus, pela vida, por me guiar e tornar tudo possível.
Aos meus amados pais, Darilda e Ivo, pelo apoio, amor incondicional, encorajamento,
suporte, paciência e companheirismo, sem eles nada disso teria sido possível.

A Yasmin Monara, pelo apoio e companheirismo.

A Moabe, eterno amigo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Natalia Tavares, pelas suas contribuições na minha formação no âmbito da pesquisa e por nortear em todos os passos desse estudo.

Ao Grupo NT, Sara, Mariana e Reinan, pelo companheirismo, apoio e sugestões.

Ao grupo da Dra. Cláudia Brodskyn, pela agradável convivência e preciosas contribuições.

À equipe da área endêmica, pela colaboração e contribuições.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A FIOCRUZ, por potencializar a formação de novos pesquisadores.

A Biblioteca da FIOCRUZ, por todo o suporte.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho. Muito Obrigado!

SILVA, Icaro Bonyek Santos da Silva. A influência do diabetes na patogênese da leishmaniose cutânea: o papel do leucotrieno B4. 48 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose permanece como uma das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. A resposta imune do hospedeiro contra a *Leishmania* tem um papel crítico na eliminação dos parasitas, mas também é responsável pela inflamação e gravidade da doença. A forma cutânea localizada (LCL) é caracterizada pela presença de uma única lesão ulcerada na pele e inflamação descontrolada. A suscetibilidade aumentada de infecções de pele é uma das complicações do diabetes. Quando comparada ao estado euglicêmico, a hiperglicemia leva a alterações na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, principalmente pelo aumento da produção de leucotrieno B4 (LTB₄), um mediador lipídico inflamatório. **OBJETIVO:** Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do diabetes no resultado do LCL humano, considerando o papel do LTB₄. **MATERIAL E MÉTODOS:** Primeiramente, foram medidos os níveis séricos de mediadores inflamatórios, como LTB₄, PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 por ensaio imunoenzimático (ELISA) em pacientes euglicêmicos ou hiperglicêmicos com LCL. Em seguida foi feita uma correlação com dados clínicos, como glicose, tempo, tamanho, número e área da lesão. Para determinar a suscetibilidade à infecção por *Leishmania braziliensis*, foi feita a infecção de macrófagos de indivíduos diabéticos ou não, cultivados em condições com baixa e alta concentração de glicose. O sobrenadante da cultura foi destinado a mensuração do LTB₄ e as células para análise da expressão gênica de receptores do tipo Toll (TLR) e do BLT1. **RESULTADOS:** Detectamos aumento de LTB₄, IL-6 e TNF- α no plasma de pacientes diabéticos com LCL comparado a não diabético. Interessantemente, apenas o LTB₄ apresentou correlação positiva com o tempo de cicatrização. Os ensaios *in vitro* indicam que a glicose aumenta a taxa de infecção e a viabilidade de parasitos de maneira dose-dependente em macrófagos humanos infectados por *L. braziliensis*. Além disso, a alta concentração de glicose modula negativamente BLT1, TLR2 e TLR4. **CONCLUSÃO:** Juntos, esses resultados sugerem que pacientes diabéticos produzem altos níveis de LTB₄ e que este está relacionado com o tempo de cicatrização. Além disso, altas concentrações de glicose aumentam a suscetibilidade de macrófagos à infecção por *L. braziliensis* através da modulação negativa de BLT1, TLR2 e TLR4 diminuindo assim, a ação do LTB₄ produzido exacerbadamente.

Palavras-chave: LTB₄; Diabetes; *Leishmania braziliensis*; Inflamação.

SILVA, Icaro Bonyek Santos da Silva. The influence of diabetes on the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis: the role of leukotriene B₄. 48 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis remains one of the most neglected tropical diseases in the world. The immune response of the host against *Leishmania* plays a critical role in the elimination of parasites, but is also responsible for the inflammation and severity of the disease. The localized cutaneous form (LCL) is characterized by the presence of a single ulcerated lesion on the skin and uncontrolled inflammation. The increased susceptibility of skin infections is one of the complications of diabetes. When compared to the euglycemic state, hyperglycemia leads to alterations in the production of proinflammatory cytokines and chemokines, mainly due to increased production of leukotriene B₄ (LTB₄), an inflammatory lipid mediator. **OBJECTIVE:** In this context, the present study aimed to evaluate the influence of diabetes on the outcome of human LCL, considering the role of LTB₄. **MATERIAL AND METHODS:** Serum levels of inflammatory mediators such as LTB₄, PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10 were measured by immunoenzymatic assay (ELISA) in euglycemic or hyperglycemic patients with LCL. A correlation was then made with clinical data, such as glucose, time, size, number and area of the lesion. To determine the susceptibility to infection by *Leishmania braziliensis*, macrophages were infected from diabetic or non-diabetic individuals, cultured under conditions with low and high glucose concentration. The culture supernatant was used to measure LTB₄ and the cells for analysis of the Toll-like receptor (TLR) and BLT1 gene expression. **RESULTS:** We detected increased LTB₄, IL-6 and TNF- α in the plasma of diabetic patients with LCL compared to non-diabetic patients. Interestingly, only LTB₄ showed a positive correlation with healing time. In vitro assays indicate that glucose increases the rate of infection and parasite viability in a dose-dependent manner in *L. braziliensis*-infected human macrophages. In addition, high glucose concentration negatively modulates BLT1, TLR2 and TLR4. **CONCLUSION:** Together, these results suggest that diabetic patients produce high levels of LTB₄ and that this is related to the healing time. In addition, high glucose concentrations increase the susceptibility of macrophages to *L. braziliensis* infection through the negative modulation of BLT1, TLR2 and TLR4 thus decreasing the action of the exacerbated production of LTB₄.

Keywords: LTB₄; Diabetes; *Leishmania braziliensis*; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biossíntese e via de sinalização do LTB ₄	23
Figura 2	Indivíduos diabéticos com LCL necessitam de maior número de ciclos de Tratamento	30
Figura 3	Indivíduos diabéticos com LCL apresentam quadro inflamatório sistêmico mediado por LTB ₄ , IL-6 e TNF α	31
Figura 4	A glicemia e o tempo de cura estão correlacionados positivamente com a produção de LTB ₄ em indivíduos diabéticos	32
Figura 5	Macrófagos de indivíduos diabéticos infectados com <i>L. braziliensis</i> são mais suscetíveis	33
Figura 6	Macrófagos cultivados em diferentes concentrações de glicose e infectados com <i>L.braziliensis</i>	35
Figura 7	Macrófagos infectados produzem LTB ₄ e IL-6, independente da concentração de glicose, mas possuem uma modulação negativa dos receptores BLT1, TLR2 e TLR4	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados clínicos de pacientes com LCL infectados por <i>L. braziliensis</i> , diabetico ou não.....	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AGE	Produtos Finais da Glicação Avançada
BLT1	Receptor de Leucotrieno do Tipo 1
BLT2	Receptor de Leucotrieno do Tipo 2
CisLT	Leucotrienos Cisteinil
CXCL	Quimiocina (motivo C-X-C)
CSCP	Centro de Saúde de Corte de Pedra
CYP	Citocromo P450
DCs	Células Dendríticas
DM	Diabetes Mellitus
EETs	Ácidos Epoxieicosatrienóicos
FLAP	Proteína de Ativação
GPCRs	Proteína G associado a membrana
IL	Interleucina
IR	Resistência a Insulina
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LOXs	Lipoxigenases
LST	Teste Cutâneo de Leishmania
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
MCP1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MyD88	Molécula Adaptadora Resposta Primária de Diferenciação Mieloide 88
NFκB	Fator Nuclear Kappa B
NO	Oxido Nítrico

PA	Antimoniais Pentavalentes
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PKC	Proteína Quinase C
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RT	Transcrição Reversa
STAT-1	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	LEISHMANIOSES	14
1.1.1	<i>Leishmaniose Cutânea Localizada</i>	14
1.1.2	<i>Imunopatogênese da LCL</i>	15
1.1.3	<i>Leishmaniose e Diabetes</i>	16
1.2	DIABETES MELLITUS	16
1.2.1	<i>Impacto Global</i>	16
1.2.2	<i>O que é Diabetes?</i>	17
1.2.3	<i>Complicações do Diabetes</i>	18
1.2.4	<i>Cicatrização e suscetibilidade a infecções</i>	20
1.2.5	<i>Diabetes e Inflamação</i>	21
1.3	MEDIADORES LIPÍDICOS.....	22
1.3.1	<i>Biossíntese</i>	22
1.3.2	<i>Leucotrieno B₄</i>	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL.....	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	DECLARAÇÃO DE ÉTICA	27
5.2	ÁREA DE ESTUDO	27
5.3	POPULAÇÃO EM ESTUDO E DIAGNÓSTICO DA DOENÇA.....	27
5.4	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	28
5.4.1	<i>Obtenção do plasma</i>	28
5.4.2	<i>Separação de células mononucleares</i>	28
5.5	CULTURA DE MACRÓFAGOS HUMANOS.....	28
5.6	CULTURA DE LEISHMANIA E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS	29
5.7	TAXA DE INFECÇÃO E VIABILIDADE DOS PARASITAS	29
5.8	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	29
5.9	EXPRESSÃO DE RECEPTORES POR PCR EM TEMPO REAL	30
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6	RESULTADOS	31
6.1	DADOS CLÍNICOS	31
6.2	INDIVÍDUOS DIABÉTICOS PRODUZEM MAIORES NÍVEIS DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	32
6.3	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POSSUEM CORRELAÇÃO POSITIVA COM GLICOSE E TEMPO DE CURA.....	32
6.4	MACRÓFAGOS DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS SÃO MAIS SUSCETIVEIS À INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	34

6.5	A SUSCETIBILIDADE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i> É PROPORCIONAL A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	35
6.6	<i>L. BRAZILIENSIS</i> INDUZ LTB ₄ E IL-6 EM MACRÓFAGOS INDEPENDENTE DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, MAS A HIPERGLICEMIA INIBE A SUA SINALIZAÇÃO	36
7	DISCUSSÃO	38
8	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSES

1.1.1. *Leishmaniose Cutânea Localizada*

As Leishmanioses são um complexo de doenças negligenciadas presentes em mais de 88 países, resultantes da infecção pelo protozoário intracelular do gênero *Leishmania*. Estas doenças apresentam duas formas clínicas principais: Tegumentar, com comprometimento cutâneo ou mucoso, e Visceral, com envolvimento de baço, fígado e medula óssea (DAVID; CRAFT, 2009; KAYE; SCOTT, 2011).

A Leishmaniose é transmitida através da picada do flebotomíneo fêmea infectado, que inocula na derme do hospedeiro vertebrado, a forma infectante do parasita denominada promastigota metacíclica. Esta é livre e flagelada, mas se diferencia em amastigota no interior de células fagocíticas da imunidade inata, tais como: macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. A forma amastigota prolifera por divisão binária, levando a lise da célula e liberação desses parasitos no meio extracelular, os quais podem infectar células circunvizinhas, assim como, ser ingerida por outro flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo biológico (DAVID; CRAFT, 2009).

Em média, 350 milhões de pessoas residem em áreas passíveis de infecção pelo parasito. Considerado um problema de saúde pública, a Leishmaniose é responsável por mais 70.000 mortes e uma incidência de 2 milhões de novos casos anualmente. Destes, cerca de 1-1,5 milhões são casos de Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) (DAVID; CRAFT, 2009; DESJEUX, 2004; WHO, 2010).

Nas Américas, a LCL é a forma mais comum da doença e apresenta lesão única ou múltipla em diferentes partes do corpo, tais como face, braços e pés. Estas lesões são caracterizadas por bordas elevadas, fundo necrótico e de caráter crônico, com baixa ou nenhuma resposta a antibióticos ou esteroides (DAVID; CRAFT, 2009). É causada principalmente pelas espécies *Leishmania mexicana*, *Leishmania panamensis* ou *Leishmania braziliensis*. É a forma menos grave e apresenta cura espontânea. No entanto, as lesões podem levar meses para cicatrizar, ocasionando um impacto na vida social dos pacientes (DAVID; CRAFT, 2009; SCOTT; NOVAIS, 2016).

1.1.2. Imunopatogênese da LCL

Sabe-se que a LCL tem uma versatilidade muito grande no seu desfecho, uma vez que, pode passar de uma única lesão auto resolutiva para uma lesão de caráter crônico. Pouco se sabe sobre o mecanismo que determina essa dicotomia, podendo ter influência tanto do parasito como da resposta do hospedeiro. A lesão da LCL por *L. braziliensis* é caracterizada pela presença de pouco parasitos e uma inflamação exacerbada, podendo esta última, ser a chave para a dificuldade de cicatrização observada em muitos pacientes (SCOTT; NOVAIS, 2016).

No contexto inflamatório a resposta do hospedeiro contra a *Leishmania* é dependente de diversos tipos celulares, como: neutrófilos, monócitos, células dendríticas (DCs) e macrófagos. A resposta inata é de suma importância no contexto da Leishmaniose, uma vez que é a resposta inicial após a primeira infecção pelo patógeno. A cinética inflamatória consiste inicialmente na chegada de neutrófilos para o sítio de infecção, seguido de monócitos, DCs e macrófagos, os quais utilizam diferentes respostas celulares para eliminar o patógeno (SCOTT; NOVAIS, 2016). Dentre estas respostas, duas são indispensáveis para o controle da infecção por *Leishmania*, a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Óxido Nítrico (NO), assim como a produção de interferon- γ (IFN γ), TNF- α (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; SCOTT; NOVAIS, 2016) e LTB₄ (CHAVES; CANETTI; COUTINHO-SILVA, 2016).

Além da imunidade inata, a resposta imune adaptativa também é crucial na resposta a infecção, com a participação de células T CD4⁺ com perfil Th1 e células T CD8⁺ (BACELLAR et al., 2002; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; SCOTT; NOVAIS, 2016). No entanto, a redução da carga parasitária no sítio infeccioso não é sinônimo de resolução e cicatrização da ferida, uma vez que, a inflamação exacerbada montada para eliminar o patógeno pode prolongar o desfecho da lesão, ocasionando uma doença de caráter crônico e localizado.

1.1.3. *Leishmaniose e Diabetes*

A comorbidade entre doenças podem agravar o quadro do paciente, devido a competição por tempo, atenção e tratamento (PENTAKOTA et al., 2012). Um estudo relatou que pelo menos 88,6% de pacientes diabéticos possuem uma doença adicional crônica (PENTAKOTA et al., 2012). Em geral, doenças infecciosas são mais frequentes em pacientes diabéticos, uma vez que, o ambiente hiperglicêmico favorece a disfunção imune, tal como quimiotaxia, fagocitose e atividade bactericida de neutrófilos e macrófagos (ALVES; CASQUEIRO; CASQUEIRO, 2012; BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007).

A inflamação de caráter exacerbado e crônico é uma característica em comum de duas patologias de causas diferentes, a Leishmaniose Cutânea e o Diabetes, de forma localizada e sistêmica, respectivamente. Sabe-se que pacientes diabéticos são mais suscetíveis a diferentes infecções cutâneas (ALVES; CASQUEIRO; CASQUEIRO, 2012; BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007; FILGUEIRAS et al., 2015b; POZZILLI; LESLIE, 1994). Neste sentido, um estudo relatou o diagnóstico de LCL em uma lesão de pé diabético, podendo inferir uma possível associação entre ambas as patologias (NICLOT et al., 2014). No entanto, ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual a inflamação exacerbada contribui para a maior suscetibilidade a infecções observada em diabéticos.

1.2. DIABETES MELLITUS

1.2.1. *Impacto Global*

O *Diabetes mellitus* é uma das desordens metabólicas mais frequentes no mundo, caracterizado por níveis elevados de glicose na circulação sanguínea (KEANE et al., 2017). Atualmente, estimativas indicam que 422 milhões de pessoas convivem com o diabetes, o que corresponde a 8% da população mundial (ZHOU et al., 2016). A China lidera a lista dos 10 principais países com maior número de adultos diagnosticados com diabetes, em média 109,6 milhões de pessoas. O Brasil, com um número de 14,3 milhões de pessoas diagnosticadas para diabetes (9,4% da população), ocupa o 4º lugar do ranking mundial para a doença, com uma estimativa de aumento para 23,3 milhões até o ano de 2040 (IDF, 2015). Com um gasto mundial de US\$ 673 bilhões e de US\$ 21,8 bilhões no Brasil (IDF, 2015), nos últimos anos o diabetes tem ganhado grande atenção e se tornado uma preocupação no âmbito da saúde pública nacional e internacional.

Há, em média, 320,5 milhões de pessoas vivendo com diabetes na faixa etária entre 20-64 anos e 94,2 milhões com 65-79 anos. Neste cenário, existe uma maior prevalência de homens comparado com mulheres. Além disso, há um percentual maior de casos situados na zona urbana quando comparado com zona rural. No entanto, este último ponto tende a ter uma diferença ainda maior devido à mudança no hábito de vida implantado nos grandes centros (IDF, 2015).

Ademais, o diabetes é uma importante causa de mortalidade e morbidade (ZHOU et al., 2016) devido ao seu caráter crônico e silencioso. Por conta disso, o diabetes causou, de forma direta, a morte de 1,5 milhões de pessoas em 2012 e, de forma indireta, por mais 2,2 milhões. A principal causa destas mortes está associada com o aumentando do risco de doenças cardiovasculares. Sendo que 43% dessas mortes ocorreram antes dos 70 anos de idade e em países de baixa ou média renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Diante desses dados, fica evidente o impacto socioeconômico causado pelo diabetes. Com uma incidência cada vez maior ao passar dos anos, o diabetes hoje, se encontra como um grande problema de saúde pública.

1.2.2. O que é Diabetes?

O Diabetes é uma condição crônica ocasionada pela ausência de produção de insulina pelo pâncreas (Diabete do tipo 1) ou por não reconhecer eficientemente a insulina produzida (Diabetes do tipo 2), resultando, em ambos os casos, em níveis elevados de glicose na circulação sanguínea (KATSAROU et al., 2017; KEANE et al., 2017).

O Diabetes tipo 1 (DM1), é considerado uma doença autoimune devido uma reação de autoanticorpos contra as células beta pancreáticas produtoras de insulina, levando à destruição destas células e comprometendo a produção deste hormônio (KATSAROU et al., 2017). O mecanismo responsável pela eliminação das células beta pancreáticas envolve anticorpos que reagem contra a ilhota pancreática, devido a apresentação do autoantígenos por células dendríticas e subsequente resposta de células T CD4+ e CD8+ autoimunes (KATSAROU et al., 2017). O indivíduo diagnosticado com DM1 é considerado dependente de insulina e requer o seu uso exógeno diariamente para controlar o nível glicêmico (IDF, 2015). A sintomatologia é composta por urinação excessiva e sede, fome constante, perda de peso, alteração na visão e fadiga (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O tratamento é baseado na administração de insulina, com a finalidade manter os níveis de glicose nas

condições normais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O diagnóstico é feito por um simples exame de rotina para analisar a glicemia ou através da detecção de autoanticorpos (KATSAROU et al., 2017).

O Diabetes tipo 2 (DM2), antigamente conhecido como diabético não dependente de insulina, é a forma mais frequente da doença. Corresponde a cerca de 85-95% dos casos (ZHOU et al., 2016), sendo caracterizado pela resistência a insulina (IR) nos tecidos, tais como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (KEANE et al., 2017). Apresenta sintomas semelhantes ao DM1, porém são menos frequentes ou ausentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O tratamento mais utilizado para pacientes com DM2 é através da administração dos medicamentos hipoglicemiantes, como a Metformina e o Gliclazide. Ambos bem estabelecidos no mercado, no entanto, podem ser encontrados alguns outros fármacos como o análogo de GLP-1 e os inibidores de DPP4 (IDF, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o diagnóstico desses pacientes pode ser feito em exames laboratoriais, os quais constam elevados níveis glicêmicos, em ambos os tipos de diabetes, ou seja, pacientes que possuem valor glicêmico em jejum ≥ 126 mg/dl ou $\geq 6,5\%$ de Hemoglobina Glicada (HbA1c) (IDF, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

1.2.3. Complicações do Diabetes

Ambos os tipos de diabetes estão associados com complicações secundárias que culminam na redução da qualidade de vida destes pacientes. Juntamente com alterações micro e macrovasculares, o diabetes tem sido correlacionado com doenças cardiovasculares, retinopatia, nefropatia, neuropatia, amputação de membros inferiores, redução da capacidade de cicatrização e aumento de suscetibilidade a doenças infecciosas (BOWLING; RASHID; BOULTON, 2015; EZZATI, 2014; FILGUEIRAS et al., 2015a; GOLDEN et al., 2015; IDF, 2015; KATSAROU et al., 2017; VINCENT et al., 2011; WU et al., 2016).

As doenças cardiovasculares são as causas mais comuns de morte em pacientes com diabetes, dentre estas estão a angina, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca (IDF, 2015; SR et al., 2013). As doenças cardiovasculares e diabetes, juntos, em 2010 foram responsáveis por mais de 33% de todas as mortes do mundo (EZZATI, 2014). O paciente diabético, principalmente do tipo 2, possui os maiores fatores de risco para as doenças cardiovasculares, como a obesidade, hipertensão,

dislipidemia, coagulabilidade, disfunção endotelial e neuropatia (LEON, 2015). A produção exacerbada de citocinas em diabéticos como Interleucina 1 (IL-1), IL-6 e proteína quimioatrante de monócitos (MCP-1) tem sido correlacionado com a disfunção endotelial, infarto do miocárdio e cardiomiopatias (MATHEUS et al., 2013).

Outra complicação do diabetes é a retinopatia, uma complicação microvascular retinal que afeta de forma moderada ou grave a visão em pacientes diabéticos, podendo progredir para casos que resultem até em perda total da visão. Possui uma prevalência de 80% em pacientes com DM1 (HANG et al., 2014; KATSAROU et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A retinopatia diabética é caracterizada principalmente pelo extravazamento vascular e a neovascularização, esses dois fatores são provenientes da ativação dos produtos finais da glicação avançada (AGE), ativação da Proteína Quinase C (PKC) e a ativação da via de superóxido. A ativação dessas vias resulta na regulação positiva de fatores imunológicos, imunogênicos e pró-angiogênicos, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e MCP-1 (HANG et al., 2014).

O dano a pequenos vasos sanguíneos localizados nos rins pode levar ao quadro de nefropatia (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011), onde os rins se tornam menos eficientes ou até mesmo totalmente falhos (IDF, 2015). O Estágio Final de Doença Renal (EFDR) tem uma incidência de até 10 vezes maior em pacientes hiperglicêmicos comparado aos euglicêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A hiperglicemia age de forma direta nas células renais residentes ou não, levando a produção de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, os quais provocam alterações no glomérulo desses pacientes, incluindo arteriosclerose hialina, aumento da deposição de colágeno e aumento da permeabilidade glomerular (SCHENA, 2005).

O alto nível glicêmico de forma prolongada pode, também, afetar os nervos, conhecido como neuropatia. A participação da hiperglicemia no contexto da neuropatia se dá principalmente pela disfunção mitocondrial ocasionado pela mudança metabólica e consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (VINCENT et al., 2011). Além disso, os AGE reconhecidos por seus receptores ativam sinais inflamatórios nas células intensificando ainda mais o estresse oxidativo (VINCENT et al., 2011). A forma mais comum é a neuropatia periférica, a qual os nervos sensoriais dos pés são os mais afetados, podendo levar a dor, formigamento e perda de sensibilidade. Essa perda de sensibilidade pode permitir que lesões nestas extremidades passem despercebidas pelos pacientes, o que pode levar a ulceração da lesão, infecções secundárias e até mesmo amputações de membros (BOWLING; RASHID; BOULTON, 2015; IDF, 2015).

1.2.4. Cicatrização e suscetibilidade a infecções

Dentre todas as complicações provocadas pelo diabetes, a dificuldade de cicatrização (WU et al., 2016) e a maior suscetibilidade a doenças infecciosas nesses indivíduos tem chamado a atenção (ALVES; CASQUEIRO; CASQUEIRO, 2012; BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007; FILGUEIRAS et al., 2015b). A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo e dinâmico, sendo feito de forma organizada e coordenada em quatro fases: (I) Homeostase, fase inicial, onde ocorre a formação do coágulo e agregação plaquetária; (II) Inflamação; etapa caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios; (III) Proliferação, etapa responsável pela produção de colágeno e formação de novos vasos; (IV) Remodelamento, etapa final onde ocorre o balanço final entre síntese e degradação de matriz extracelular (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014; SINGH et al., 2016).

A cicatrização de lesões teciduais deve apresentar, na fase inflamatória, produção de citocinas e quimiocinas curta e auto-limitada. A inflamação exacerbada e prolongada observada em pacientes diabéticos contribui para que a cicatrização seja falha ou mais lenta, tornando o processo crônico e pouco resolutivo, ocasionando a ulceração das lesões (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014; SINGH et al., 2016). Além disso, o perfil celular encontrado nas feridas desses pacientes é predominantemente mais pró-inflamatório, com a presença de macrófagos clássicos (M1), liberação de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014; MIRZA; KOH, 2015) e participação do mediador lipídico inflamatório Leucotrieno B₄ (LTB₄) (GUIMARÃES et al., 2018). Devido a essa resposta inflamatória exacerbada, indivíduos diabéticos apresentam maior risco de desenvolver lesões cutâneas crônicas.

Apesar do padrão inflamatório exacerbado, os diabéticos apresentam maior suscetibilidade a doenças infecciosas quando comparado a pacientes euglicêmicos. No entanto, o mecanismo que leva a esse aumento na suscetibilidade ainda é pouco conhecido (ALVES; CASQUEIRO; CASQUEIRO, 2012; BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007; KRAKAUER, 2015). Um estudo em pacientes hospitalizados mostrou que a cada 1 mmol/l aumentado de glicemia, o risco para o desenvolvimento de pneumonia, infecção do trato urinário e infecções de pele aumenta em 6-10% (BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007). Em 2015, Filgueiras e colaboradores demonstraram, em modelo murino de diabetes, que há uma forte associação entre inflamação exacerbada e maior suscetibilidade a sepse. Os autores atribuem essa associação ao mediador lipídico LTB₄, que se encontra aumentado nesse contexto (FILGUEIRAS et al., 2015b). Diante desses achados,

fica evidente que apesar da inflamação exacerbada em pacientes hiperglicêmicos, durante um processo infeccioso esses indivíduos parecem ser mais suscetíveis.

1.2.5. Diabetes e Inflamação

A resposta inflamatória, de modo controlado e auto limitante, é um processo biológico de importância fundamental na defesa contra patógenos (CHEN; NUÑEZ, 2010). Contudo, mesmo na ausência de patógenos, uma resposta inflamatória pode ser induzida, conhecida como “inflamação estéril”. Sendo caracterizada pela cronicidade da inflamação, desencadeada pelo acúmulo de produtos metabólicos como ácido úrico, colesterol, ácidos graxos livres ou glicose (FILGUEIRAS; HENRIQUE SEREZANI; JANCAR, 2015).

O acúmulo de glicose na circulação sanguínea em pacientes diabéticos resulta no processo de inflamação estéril, caracterizada por elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (BALZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014; ZAND; MORSHEDZADEH; NAGHASHIAN, 2017), além do mediador lipídico LTB₄ (FILGUEIRAS et al., 2015a). Dentre esses mediadores inflamatórios, o TNF- α foi o primeiro a ser relacionado com a indução de resistência a insulina em tecido adiposo, principalmente pela ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF κ B) e cinases c-Jun N-terminal (JNKs), resultando no comprometimento da sinalização dos receptores de insulina (HOTAMISLIGIL, 2017; ZAND; MORSHEDZADEH; NAGHASHIAN, 2017). A produção dessas citocinas pró-inflamatórias pode ser induzida por dois mecanismos distintos: ativação dos receptores do tipo *Toll* (TLR) ou pela via do inflamassoma. A cascata de sinalização após a ativação através dos receptores *Toll* são dependentes da molécula adaptadora Resposta Primária de Diferenciação Mieloide 88 (*MyD88*), a qual culmina na ativação do NF κ B, um fator de transcrição envolvido na expressão de vários genes de citocinas pró-inflamatórias. Os níveis de expressão destas moléculas estão elevados em indivíduos com hiperglicemia, indicando que a inflamação estéril é uma consequência importante proveniente dessa alteração metabólica. (FILGUEIRAS; HENRIQUE SEREZANI; JANCAR, 2015).

Outro aspecto importante da resposta inflamatória, é que seus diferentes mediadores apresentam vias de sinalização em comum. Apesar disso, grande parte dos estudos sobre o controle da inflamação no diabetes é focado em avaliar um mediador de interesse de forma isolada, com pouco ou nenhum sucesso (LI et al., 2015). Neste sentido, estudos recentes demonstraram a forte influência do LTB₄ no contexto inflamatório, como uma molécula

chave, uma vez que, a sua produção está relacionado com o aumento na expressão do *Myd88* e consequentemente de outros mediadores inflamatórios. Com isso, o LTB_4 tem sido associado à indução de inflamação exacerbada, suscetibilidade a infecções, dificuldade de cicatrização e aumento de resistência à insulina observados em diabéticos (FILGUEIRAS et al., 2015b; GUIMARÃES et al., 2018; LI et al., 2015).

1.3. MEDIADORES LIPÍDICOS

1.3.1. *Biossíntese*

A produção de mediadores lipídicos é iniciada a partir da metabolização do ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo essencial formado por uma cadeia de 20 carbonos encontrado na membrana celular. Após estímulos como patógenos, partículas fagocíticas, citocinas, complexos imunes e lesões, a enzima fosfolipase A2 (PLA2) é ativada, liberando o AA no citosol (BENNETT; GILROY, 2016; BRANDT; SEREZANI, 2017). Ele é, então, metabolizado gerando os eicosanoides, produtos fundamentais nos processos inflamatórios, agindo de modo autócrino e parácrino (SIVAMANI, 2014). A metabolização do AA pode ocorrer por três diferentes vias/enzimas, gerando diferentes produtos. Prostaglandinas e Tromboxanos são formados a partir das cicloxigenases (COX); os Leucotrienos (LTs) e Lipoxinas (LXs), pelas lipoxigenases (LOXs) e os Ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs), pelo citocromo P450 (CYP) (BENNETT; GILROY, 2016). Dentre esses eicosanoides, o LTB_4 tem sido o mais relacionado no contexto inflamatório (FILGUEIRAS et al., 2015b), participando diretamente no processo de suscetibilidade e resistência a infecções, principalmente de *Leishmania sp.* (CHAVES; CANETTI; COUTINHO-SILVA, 2016; MORATO et al., 2014; SEREZANI et al., 2006; TAVARES et al., 2016).

1.3.2. *Leucotrieno B₄*

Para a formação dos LTs, o AA liberado no citosol sofre a ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) juntamente com a proteína de ativação (FLAP), gerando assim o LTA_4 . Este pode ser metabolizado por duas enzimas distintas: a LTC_4 sintetase, dando origem aos Leucotrienos cisteinil (CisLTs, que são LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) ou pode ser convertido pela LTC_4 hidrolase, originando o LTB_4 (Figura 1). Este último é considerado um dos mais potentes quimioatratador e ativador celular produzido por diferentes tipos celulares, como os

granulócitos, monócitos e macrófagos durante um estímulo inflamatório (BRANDT; SEREZANI, 2017; WERZ, 2002).

A sinalização induzida pelo LTB₄ se dá através de dois possíveis receptores acoplados a proteína G associados a membrana (GPCRs), o Receptor de LT 1 (BLT1) e 2 (BLT2). No entanto, o BLT1 é o receptor mais estudado, devido sua maior afinidade ao LTB₄. Já o BLT2 tem baixa afinidade ao LTB₄ e pouco se sabe sobre as consequências da sua ativação (BRANDT; SEREZANI, 2017; TODA; YOKOMIZO; SHIMIZU, 2002). O reconhecimento do LTB₄ pelo receptor BLT1 ativa respostas biológicas nas células, tais como degranulação de neutrófilos, fagocitose, produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), Oxido Nítrico (NO), citocinas como GM-CSF, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , além de quimiocinas como Proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), quimiocina CXC Ligante 1 (CXCL1) e CXCL2 (BRANDT; SEREZANI, 2017). Juntos, estas respostas celulares desencadeadas pela sinalização do LTB₄ potencializam a inflamação.

A sinalização intracelular após o reconhecimento do LTB₄ já está bem elucidada e se baseia na sua capacidade em aumentar a expressão do *Myd88* via Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1 (STAT-1), após uma regulação negativa do SOCS-1, resultando na maior ativação do NF κ B (Figura 1) (SEREZANI et al., 2011a).

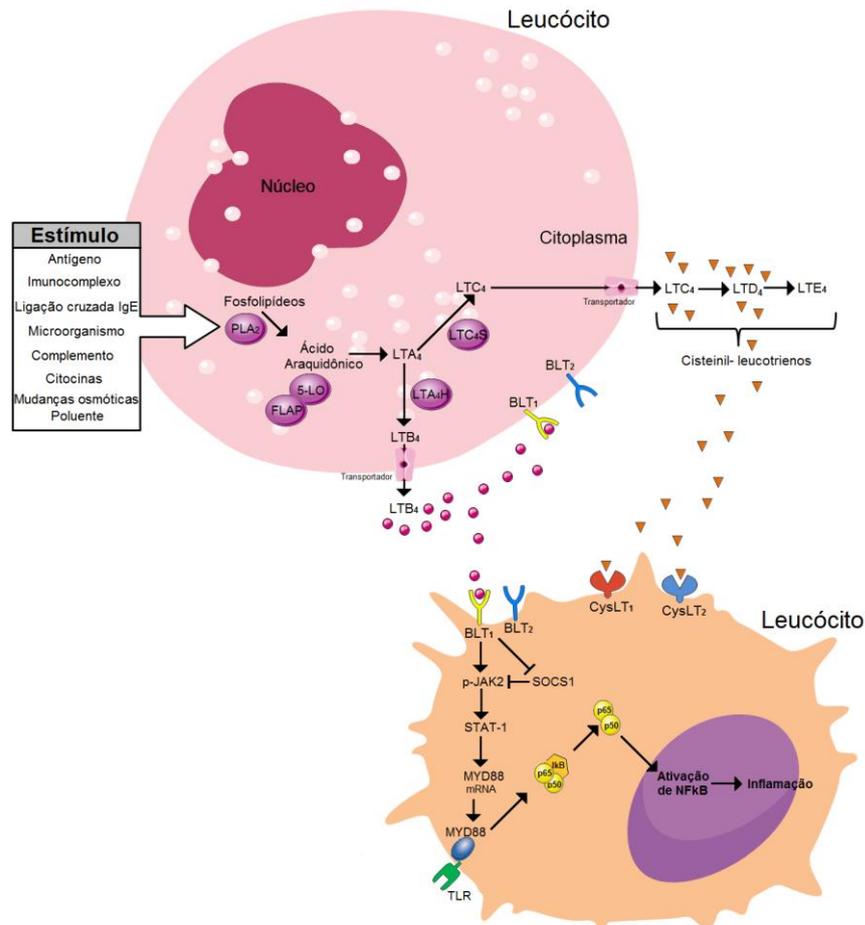


Figura 1 Biossíntese e via de sinalização do LTB₄:

Após estimulação, a enzima PLA₂ é ativada, agindo em fosfolípidos de membrana gerando ácido araquidônico. O ácido araquidônico, então, é metabolizado pela enzima 5-LO e sua proteína ativadora FLAP, originando o LTA₄. O LTB₄ é formado a partir da ação da hidrolase LTA₄H sobre o LTA₄ que se liga ao receptor de maior afinidade, BLT₁, de forma autócrina ou parácrina. Isso resulta na inibição do SOCS-1 e aumento de STAT-1, levando à transcrição do Myd88, que potencializa a via dos TLRs. Com isso, há uma maior ativação do NFκB e consequentemente uma resposta celular mais inflamatória.

Os efeitos da sinalização via LTB₄/BLT₁ tem um papel fundamental para a eficiência na eliminação de patógenos, tais como aumento da capacidade fagocítica e produção de espécies reativas de oxigênio. No entanto, em condições de inflamação estéril, tais como no diabetes, o excesso de LTB₄ tem sido associado a um comprometimento no mecanismo de defesa, levando ao aumento da susceptibilidade à infecções (BRANDT; SEREZANI, 2017; FILGUEIRAS et al., 2015b; MORATO et al., 2014). Contudo, o mecanismo pelo qual essa produção excessiva de LTB₄ compromete a defesa do hospedeiro ainda não é bem conhecido.

2 JUSTIFICATIVA

O diabetes é uma das doenças metabólicas com o crescimento mais acelerado nos últimos anos. O Brasil possui uma prevalência de adultos com diabetes superior a média mundial, cerca de 9,4%, ocupando o 4º lugar no ranking mundial. Sabe-se que pacientes em condições hiperglicemias possuem elevados níveis de mediadores inflamatórios na circulação sanguínea e que estes podem aumentar o risco de comorbidades, dentre elas a dificuldade de cicatrização e o aumento de suscetibilidade a infecções. Atualmente, os estudos têm focado em controlar a inflamação crônica e exacerbada desses pacientes agindo de forma isolada e pontual no produto final. No entanto, essa estratégia até o momento tem pouco ou nenhum resultado satisfatório. Entretanto, um mediador lipídico, o LTB₄, tem mostrado sua forte participação no contexto inflamatório, uma vez que, sua ação é necessária para a potencialização das demais vias inflamatórias.

Mediadores lipídicos também possuem participação na patogênese de doenças de caráter infeccioso, como a LCL, uma doença inflamatória crônica localizada causada por um protozoário intracelular. Diante de duas doenças de caráter inflamatório, surge a necessidade de investigação de novas ferramentas e alvos que possam contribuir para um melhor desfecho da doença nesses pacientes. Uma vez que, relatos clínicos em áreas endêmicas tem mostrado uma possível associação entre o diabetes e a LCL, diante da baixa resposta desses pacientes aos tratamentos convencionais. Além disso, os achados obtidos neste estudo podem ser aplicados em outras enfermidades inflamatórias de cunho infeccioso, cuja gravidade pode estar relacionada com a presença do diabetes.

3 HIPÓTESE

Alterações nos níveis de produção do LTB₄ estão associadas à gravidade da Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) em pacientes diabéticos.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel funcional do LTB₄ na influência da LCL humana em pacientes diabéticos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar dados clínicos de pacientes com LCL, diabéticos ou não com níveis séricos de mediadores lipídicos e inflamatórios;
- Mensurar a produção deste(s) mediador(es) *in vitro* em cultura de macrófagos humanos infectados com *Leishmania braziliensis* em condições normoglicêmicas ou hiperglicêmicas;
- Avaliar a infecção de macrófagos humanos por *Leishmania braziliensis* em condições normoglicêmicas ou hiperglicêmicas;
- Avaliar a participação desses mediadores na infecção de macrófagos humanos por *Leishmania braziliensis* em condições normoglicêmicas ou hiperglicêmicas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número CAAE 34954814.1.0000.0040.

5.2. ÁREA DE ESTUDO

O atual estudo foi realizado na região de Corte de Pedra, pertencente ao município de Tancredo Neves situado no Sudoeste do estado da Bahia, a 275 km da capital Salvador (latitude sul 13°26' e 59°30'). Corte de Pedra é considerada uma região endêmica para a Leishmaniose, sendo bem conhecida pelos altos índices de transmissão de *Leishmania braziliensis*.

5.3. POPULAÇÃO EM ESTUDO E DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

Diante do acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o estudo de corte transversal recrutou 8 pacientes com LCL sem diabetes e 12 pacientes diabéticos com LCL, ambos os grupos provenientes do Centro de Saúde de Corte de Pedra (CSCP) sob responsabilidade do Dr. Edgar Carvalho. Para o diagnóstico de pacientes com LCL duas ferramentas foram utilizadas, o Teste de Cutâneo de Leishmania (LST) seguindo os critérios estabelecidos pela OMS e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do parasito em biópsia de pele, a positividade em uma das técnicas juntamente com a observação clínica, foi considerado positivo para LCL. O diagnóstico de Diabetes foi baseado nos níveis glicêmicos em jejum desses pacientes, aqueles que possuísem o nível glicêmico \geq 126 mg/dL eram considerados diabético e aqueles com níveis inferiores considerados pacientes não diabéticos. Em ambos os grupos, os seguintes dados clínicos foram coletados: Sexo, idade, glicemia, tempo de cicatrização, quantidade e tamanho de lesões.

5.4. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5.4.1. *Obtenção do plasma*

Foi coletado 20ml de sangue periférico de cada paciente por venipuntura usando tubos anticoagulantes contendo Heparina. Em seguida o sangue foi centrifugado a 400 xg por 15 minutos para separação do plasma e alíquotas foram feitas para a dosagem dos mediadores inflamatórios.

5.4.2. *Separação de células mononucleares*

O sangue periférico dos pacientes e de voluntários saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia (Bahia, Brazil) foram diluídos com solução salina estéril na proporção 1:1 e depositado lentamente sobre HISTOPAQUE® 1077 (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Para a separação do gradiente, foi feita uma centrifugação por 30 minutos em temperatura ambiente a 400 xg, a fase que continha a camada de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) foram retiradas e lavadas com salina estéril por sucessivas lavagens a 4°C. Por fim, as células foram contadas em azul de tripan com a Câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e destinadas à cultura celular.

5.5. CULTURA DE MACRÓFAGOS HUMANOS

Os PBMCs isolados de voluntários saudáveis foram plaqueados ($2-5 \times 10^6$ /poço) em placa de cultura com 24 poços (TPP, Switzerland) contendo ou não lamínulas de 13mm (Perfecta), sendo incubadas por 37°C e 5% CO₂ por 30 min para ocorrer a aderência celular. As células aderentes, em média 10% do total de células plaqueadas ($2-5 \times 10^5$) foram cultivadas com meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Brazil) em diferentes concentrações de glicose ou manitol (0 mg/dL, 90 mg/dL, 150 mg/dL e 300 mg/dL) (Sigma Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomicina e 50 ng/ml M-CSF por 7 dias. A cultura de PBMCs de pacientes diferiram em alguns quesitos, as células foram cultivadas utilizando o soro autólogo e com o nível de glicose correspondente ao nível glicêmico de cada paciente. Para avaliar a densidade celular por campo, foi feita uma média da contagem de 10 campos aleatórios nas

lamínulas. Para garantir a viabilidade celular da cultura em diferentes concentrações de glicose foi feito o teste de citotoxicidade celular com o reagente Alamar blue (Invitrogen, Frederick, MD).

5.6. CULTURA DE LEISHMANIA E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS

L. braziliensis (MHOM/BR/01/BA788) foram cultivadas em cultura *in vitro* em meio Schneider Insect medium (Sigma Aldrich, St Louis, MO) a 24°C, suplementado com 10% SBF, 2 mM/ml L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml estreptomicina por 5-7 dias. Os macrófagos diferenciados foram infectados por 4 horas com a forma promastigota de *L. braziliensis* (fase estacionária), na proporção de 10 parasitos para uma célula (10:1).

5.7. TAXA DE INFECÇÃO E VIABILIDADE DOS PARASITAS

Depois da infecção, o sobrenadante da cultura foi coletado e os poços foram lavados para remover os parasitas não internalizados, em seguida, as células foram fixadas com Metanol e coradas com Panótico rápido (LB Laborclin, Brazil), uma vez corado, as lamínulas foram analisadas com microscópio óptico (Nikon) na objetiva de 100x para determinar a taxa de infecção e o número de amastigota total. O percentual de células infectadas e o número de amastigotas intracelular foram obtidos pela contagem as “cegas” de 100 células em campos aleatórios. Para avaliar a viabilidade dos parasitas, depois da infecção por 4 horas, as células foram incubadas com meio Schneider Insect medium (Sigma Aldrich, St Louis, MO) a 24°C por 72 horas para favorecer o crescimento dos parasitas não eliminados, em seguida esses parasitas foram contados em Câmara de Neubauer (Boeco, Germany).

5.8. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A produção das citocinas TNF- α (Invitrogen, San Diego, CA), IL-1, IL-6 e IL-10 (eBioscience, San Diego, CA) no plasma sanguíneo e sobrenadante foram medidos usando o ensaio de imunoabsorção enzimática do tipo sanduíche (ELISA) de acordo as normas do fabricante. Para quantificar o nível de PGE₂ no plasma por ELISA foi utilizado o Kit

Prostaglandina E₂ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Para mensurar a produção do LTB₄ no plasma e sobrenadante celular por ELISA foi utilizado o Kit Leucotrieno B₄ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), todos de acordo com as normas do fabricante.

5.9. EXPRESSÃO DE RECEPTORES POR PCR EM TEMPO REAL

Para avaliar a expressão de BLT1, TLR2 E TLR4 (IDT, Illinois, EUA) em macrófagos humanos cultivados em diferentes concentrações de glicose, infectados ou não. As células foram ressuspensas em 500uL do reagente TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA, EUA). Em seguida, foi feito a extração pela técnica de fenol-clorofórmio e quantificação do RNA obtido, bem como análise da sua qualidade e pureza utilizando espectrofotômetro NanoDrop à 260 nm. Para obtenção do cDNA, foi feito a transcrição reversa (RT) do mRNA com o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, San Diego, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA em seguida foi destinado para uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A análise da expressão relativa dos genes foi feita usando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ e tendo como parâmetro o gene constitutivo β -actina.

5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados perante o padrão de distribuição de normalidade, uma vez, assumindo uma distribuição não normal as análises foram executadas utilizando o teste de Mann–Whitney quando comparado dois grupos e Kruskal–Wallis seguido do pós-teste de Dunn quando comparado múltiplos grupos, os valores foram expressos como mediana com desvio do interquartil. Para análise das correlações, utilizou-se a correlação de Spearman. Todos os testes foram executados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) e aqueles resultados que obtiveram um valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significante.

6 RESULTADOS

6.1. DADOS CLÍNICOS

Dados clínicos, tais como, glicemia em jejum, tamanho da lesão, número de lesões e tempo de cura (quantidade de ciclos de tratamento) de pacientes com LCL, diabéticos ou não, foram obtidos e analisados (Tabela 1). Com base nos valores de glicemia, foi possível separar dois grupos distintos, obedecendo ao limiar de positividade para diabetes nesse estudo (glicemia > 126mg/dL). É possível observar, no grupo de pacientes diabéticos (LCL+DM), que seus valores de glicemia apresentam variação entre 129 a 430mg/dL (Figura 2A). Essa heterogeneidade não é observada no grupo de pacientes normoglicêmicos (LCL) (Figura 2A).

Em relação ao tamanho (Figura 2B) e número de lesões (Figura 2C), não foi observada diferença entre os grupos LCL e LCL+DM. No entanto, o grupo LCL+DM apresenta, em média, parece precisar mais tempo para cicatrização da lesão, uma vez que pacientes diabéticos não cicatrizavam no primeiro ciclo de tratamento, necessitando de no mínimo 2 ciclos (Figura 2D). Por outro lado, no grupo LCL, pacientes normoglicêmicos já apresentavam resposta ao tratamento após o primeiro ciclo (Figura 2D).

Estes dados sugerem, então, que pacientes sob condições hiperglicêmicas tendem a responder ao tratamento a LCL com maior dificuldade quando comparado a pacientes normoglicêmicos. Necessitando assim um maior número de ciclos até o diagnóstico de cura para a doença.

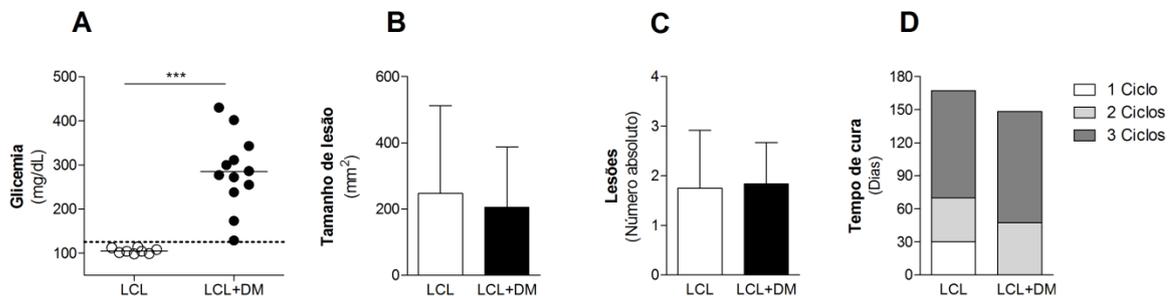


Figura 2 Indivíduos diabéticos com LCL necessitam de maior número de ciclos de tratamento:

A) Nível de glicose sérica com critério de separação entre pacientes não diabéticos (até 125mg/dL) e diabéticos (acima de 126 mg/dL). **B)** Tamanho de lesão. **C)** Número de lesões. **D)** Tempo de cura com base nos ciclos de tratamento utilizados (1 ciclo: até 30 dias; 2 ciclos: entre 31 e 60 dias; 3 ciclos: acima de 60 dias). LCL: pacientes apenas com Leishmaniose Cutânea Localizada; LCL+DM: pacientes com LCL e diabetes; Teste de Mann-Whitney; *** p < 0,001.

6.2. INDIVÍDUOS DIABÉTICOS PRODUZEM MAIORES NÍVEIS DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Diferentes mediadores inflamatórios, tais como citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10) e mediadores lipídicos (LTB₄ e PGE₂) foram mensurados no plasma de pacientes com LCL, diabéticos ou não. Com relação aos mediadores lipídicos, foi observado que os pacientes diabéticos possuem níveis circulantes de LTB₄ superiores em comparação aos não diabéticos (Figura 3A). Esta diferença não foi encontrada com o mediador lipídico PGE₂ (Figura 3B).

Os pacientes diabéticos com LCL também apresentaram níveis circulantes mais elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (Figura 3C) e TNF- α (Figura 3D) quando comparados com pacientes não diabéticos. As citocinas IL-1 β e IL-10 também foram avaliadas, mas tiveram níveis abaixo do limite de detecção em todas as amostras.

Em conjunto, esses dados indicam que indivíduos diabéticos com LCL possuem um perfil inflamatório sistêmico maior que aqueles pacientes normoglicêmicos, com uma maior produção de LTB₄, IL-6 e TNF- α .

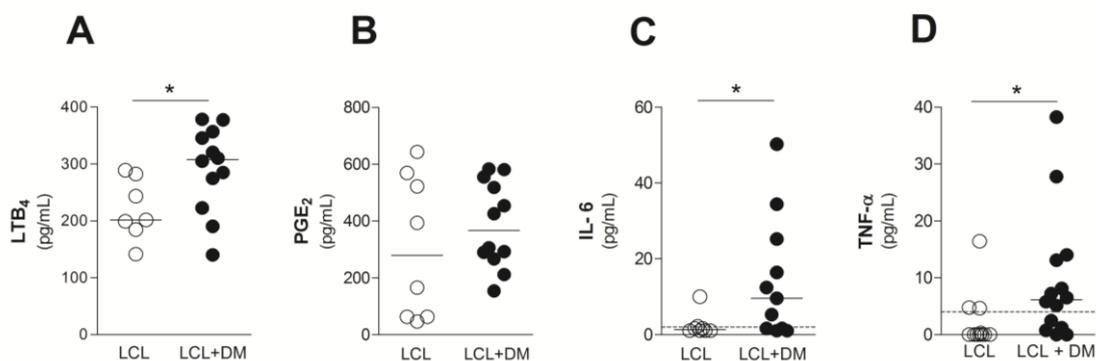


Figura 3 Indivíduos diabéticos com LCL apresentam quadro inflamatório sistêmico mediado por LTB₄, IL-6 e TNF- α : Quantificação dos níveis séricos de **A)** LTB₄; **B)** PGE₂; **C)** IL-6 e **D)** TNF- α em pacientes apenas com Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL); Pacientes com LCL e diagnosticado com diabetes (LCL+DM); Teste de Mann-Whitney; * p < 0,05.

6.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POSSUEM CORRELAÇÃO POSITIVA COM GLICOSE E TEMPO DE CURA

Com a obtenção dos dados clínicos e da quantificação sérica dos mediadores inflamatórios de cada paciente, buscamos identificar possíveis consequências clínicas associadas a este padrão inflamatório através de análises de correlação. Dessa forma, encontramos uma correlação positiva entre os valores de glicemia com LTB₄ (Figura 4A) e também com TNF- α (Figura 4C), quando todo o conjunto de pacientes (LCL e LCL+DM) é

avaliado. Estes achados indicam que quanto maior o nível glicêmico desses indivíduos, maior será a concentração sérica de LTB₄ e TNF- α .

Contudo, ao analisar a associação entre esses mediadores com o tempo de cura da LCL somente em pacientes diabéticos, apenas o LTB₄ (Figura 4D) apresenta correlação positiva. Diferentemente, os outros mediadores, IL-6 (Figura 4E) e TNF- α (Figura 4F) não apresentam qualquer associação com o tempo de cicatrização da lesão na LCL. Com isso, estas análises sugerem que quanto maiores os níveis de LTB₄ na circulação, maior será o tempo de cura da LCL nos diabéticos.

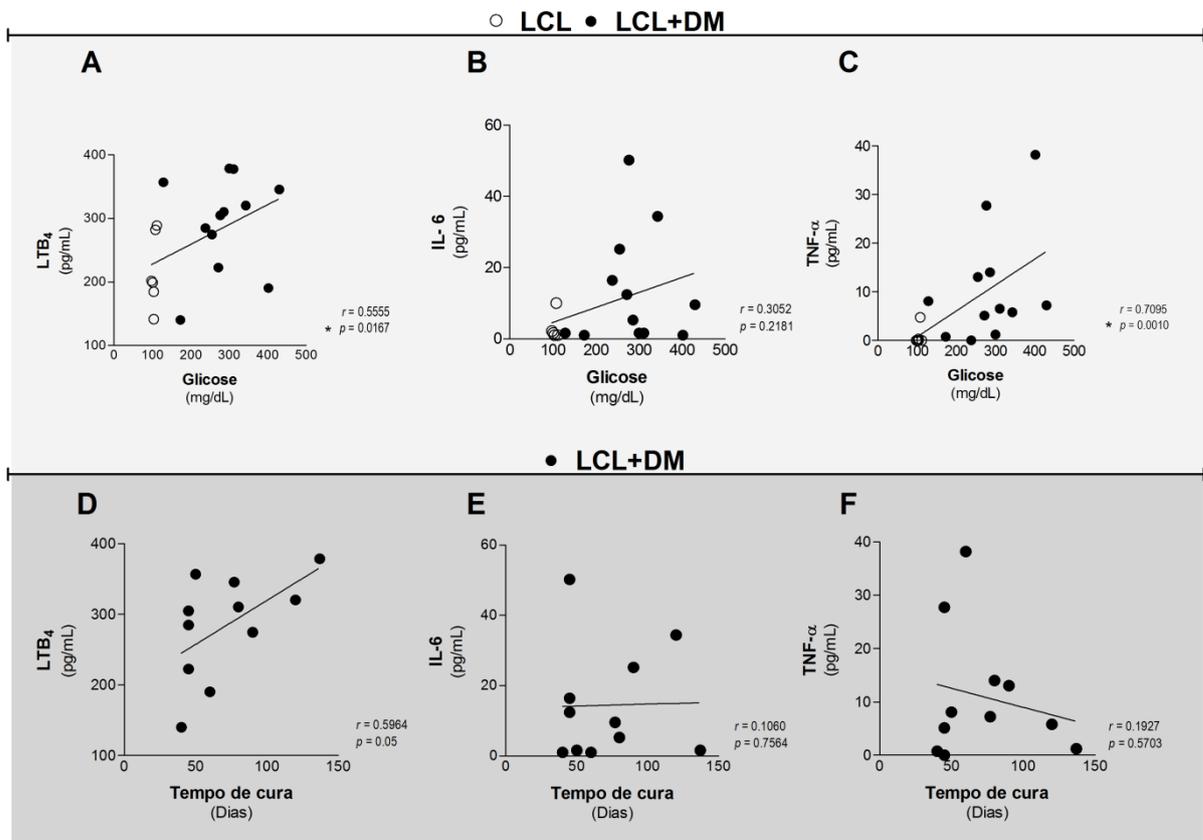


Figura 4 A glicemia e o tempo de cura estão correlacionados positivamente com a produção de LTB₄ em indivíduos diabéticos:

Análise de correlação entre **A**) LTB₄; **B**) IL-6 e **C**) TNF- α com níveis glicêmicos em pacientes com LCL, diabéticos (círculo preenchido) ou não (círculo vazio) e de **D**) LTB₄; **E**) IL-6 e **F**) TNF- α com tempo de cura apenas em pacientes diabéticos com LCL; r = Coeficiente de correlação de Spearman; * $p < 0,05$.

6.4. MACRÓFAGOS DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS SÃO MAIS SUSCETIVEIS À INFECÇÃO POR *L.braziliensis*

Em seguida, buscamos avaliar se o diabetes também aumenta a suscetibilidade de macrófagos humanos a infecção por *L. braziliensis*. Para isso, células mononucleares do sangue periférico foram coletadas dos pacientes com LCL, diabéticos ou não, cultivadas *in vitro*, diferenciadas em macrófagos e infectadas com o parasita.

Os resultados mostram que macrófagos de indivíduos diabéticos possuem uma maior suscetibilidade a infecção por *L. braziliensis*, devido ao aumento na sua taxa de infecção (Figura 5A) e número de amastigotas (Figura 5B) em comparação com macrófagos de indivíduos não diabéticos. Esta diferença pode ser visualizada nas fotomicrografias representativas da infecção, onde os macrófagos provenientes de diabéticos estão mais infectados e com número superior de amastigotas em comparação aos não diabéticos (Figura 5C).

Esses resultados confirmam a maior suscetibilidade à infecção por parasita protozoário, como *L. braziliensis*, de células humanas provenientes de indivíduos diabéticos.

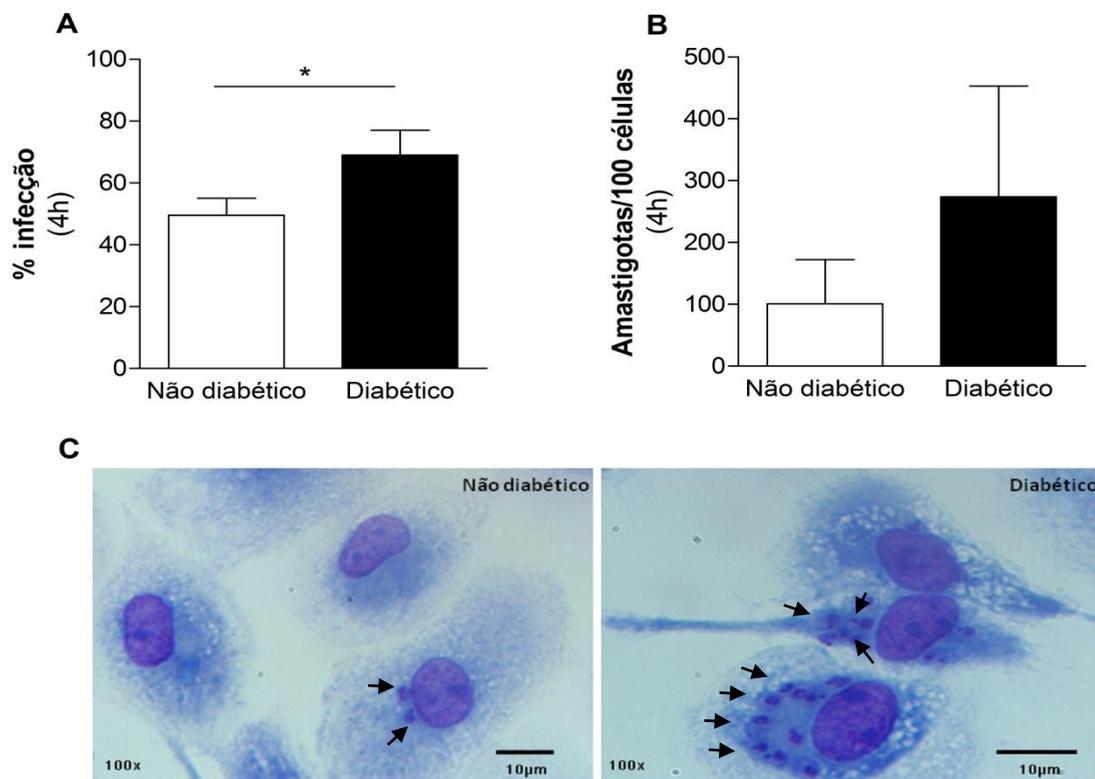


Figura 5 Macrófagos de indivíduos diabéticos infectados com *L. braziliensis* são mais suscetíveis:

A) Percentual de infecção e **B)** número de amastigotas em 100 células. **C)** Fotomicrografia de macrófagos humanos de pacientes com LCL, diabéticos ou não, infectados com *L. braziliensis* por 4 horas. Objetiva de 100x; Barra de escala = 10 µm. Setas = amastigotas. Grupo não diabético n=4; diabético n=7; Teste de Mann-Whitney; * p < 0,05.

6.5. A SUSCETIBILIDADE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. braziliensis* É PROPORCIONAL A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

Para avaliar os mecanismos que regulam esse aumento da suscetibilidade a infecção por *L. braziliensis* em condições de hiperglicemia, macrófagos humanos de doadores voluntários foram cultivados em diferentes concentrações de glicose e, em seguida, expostos ao parasita.

Os achados obtidos com esses ensaios indicam que o aumento na concentração de glicose resulta em maior suscetibilidade dos macrófagos à infecção, conforme fotomicrografias representativas (Figura 6A). Nas imagens, é possível observar a maior frequência de células infectadas à medida que a concentração de glicose aumenta de 90 até 300mg/dL (Figura 6A). Os valores referentes à quantificação das repetições deste experimento confirmam o aumento significativo na taxa de infecção (Figura 6B) e número de amastigotas nos macrófagos (Figura 6C) em condições hiperglicêmicas. Isso se reflete na viabilidade dos parasitos após 72 horas de cultivo, onde há um aumento significativo com 300mg/dL de glicose (Figura 6D), sugerindo que macrófagos submetidos a hiperglicemia são menos eficientes em eliminar *L.braziliensis*.

Uma vez que alterações na concentração de solutos interferem na osmolaridade do meio, o manitol foi utilizado como controle osmótico nas mesmas condições que a glicose (90, 150 e 300mg/dL). Nossos resultados confirmam que é a presença da glicose que leva ao aumento da suscetibilidade à *L. braziliensis*, visto que o tratamento dos macrófagos com manitol não alterou os valores de taxa de infecção (Figura 6E) e número de amastigotas (Figura 6F). Ademais, estas alterações na osmolaridade não tiveram nenhum efeito na cultura celular, tendo a característica de uma cultura homogênea em relação ao número de células por campo (Figura 6G).

Diante desses achados, conclui-se que em condições de hiperglicemia há o aumento da suscetibilidade de macrófagos humanos à infecção por *L. braziliensis*, reduzindo a eficiência destas células em eliminar o parasita.

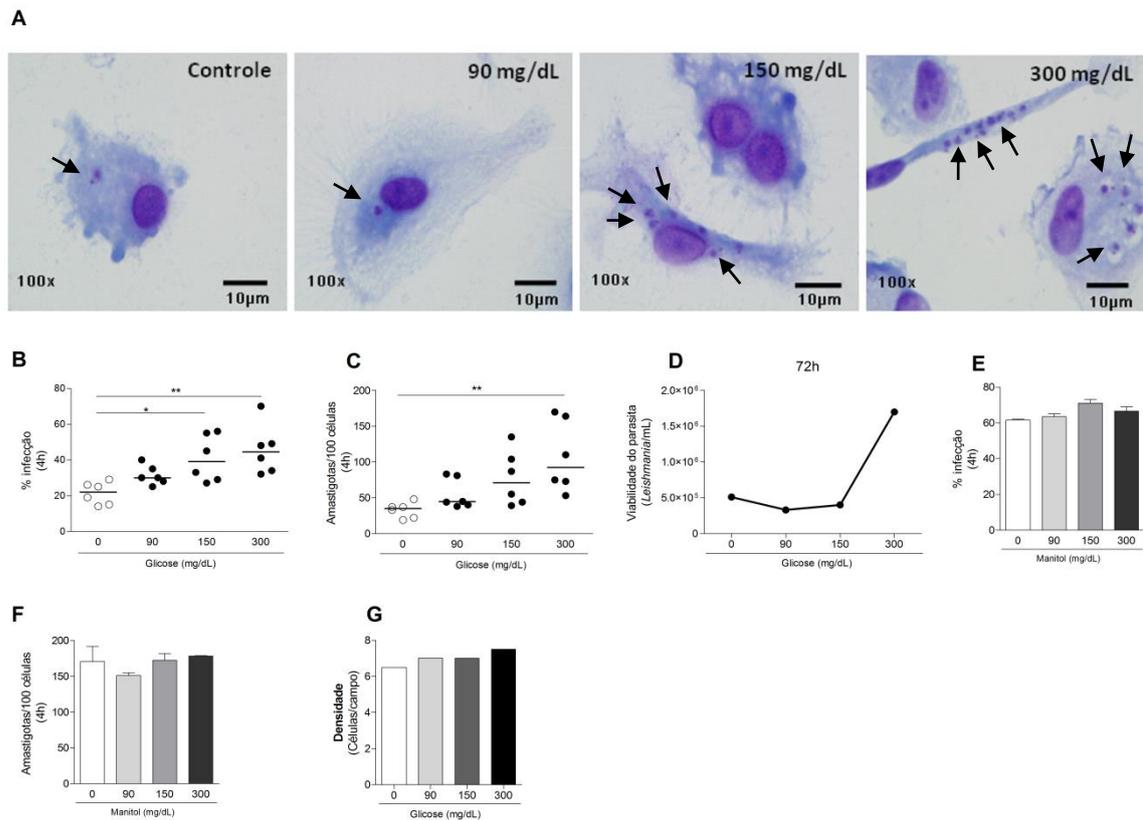


Figura 6 Macrófagos cultivados em diferentes concentrações de glicose e infectados com *L. braziliensis*:

A) Fotomicrografias de macrófagos humanos de doadores saudáveis cultivados em 0, 90, 150 e 300 mg/dL de glicose, infectados com *L. braziliensis*. **B)** Percentual de infecção e **C)** Número de amastigotas em 100 células, n=6. **D)** Viabilidade do parasita 72 horas após infecção em diferentes concentrações de glicose, n=13. **E)** Percentual de infecção e **F)** Número de amastigotas em macrófagos cultivados em manitol infectados com *L. braziliensis*, n=2. **G)** Densidade celular, n=6. Objetiva de 100x; Barra de escala = 10 µm. Setas = amastigotas; Kruskal–Wallis com pós-teste de Dunn; * p < 0,05; ** p < 0,01.

6.6. *L. BRAZILIENSIS* INDUZ LTB_4 E IL-6 EM MACRÓFAGOS INDEPENDENTE DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, MAS A HIPERGLICEMIA INIBE A SUA SINALIZAÇÃO

Diante destes resultados, buscamos identificar *in vitro* o mecanismo envolvido no aumento da suscetibilidade à *L. braziliensis* em condições hiperglicêmicas.

Verificamos que a produção de LTB_4 (Figura 7A) e IL-6 (Figura 7B) foi aumentada após a infecção dos macrófagos com *L. braziliensis* de forma independente da concentração de glicose. Sabendo da importância do reconhecimento do LTB_4 , buscamos avaliar o receptor, o BLT1, onde este se mostrou modulado negativamente em altas concentrações de glicose, tanto em macrófagos infectados como apenas com a glicose (Figura 7C). Essa modulação negativa também pode ser vista para os receptores TLR2 (Figura 7D) e TLR4 (Figura 7E) em

macrófagos cultivados em altas concentrações de glicose. Com isso, os resultados sugerem que macrófagos em condições hiperglicêmicas possuem uma modulação negativa de BLT1, TLR2 e TLR4, resultando em um menor reconhecimento do LTB₄ e conseqüentemente menor potencialização dos TLR, os quais também estão modulados negativamente, fazendo com que o macrófago seja mais hiporresponsivo.

Para garantir que esta diferença de suscetibilidade é realmente um fenômeno biológico da hiperglicemia e não uma influência na viabilidade celular devido a deposição de um soluto na cultura (glicose) foi feito o teste citotoxicidade (Figura 7F). Mostrando que alta concentração de glicose não interferia na viabilidade celular.

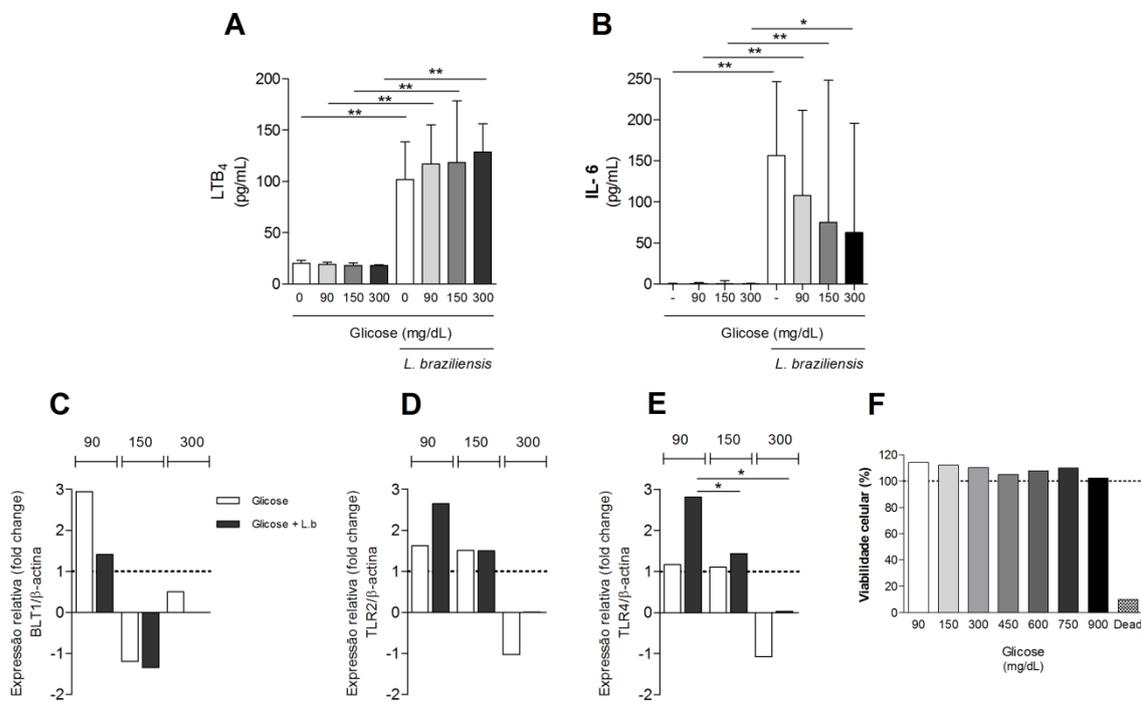


Figura 7 Macrófagos infectados produzem LTB₄ e IL-6, independente da concentração de glicose, mas possuem uma modulação negativa dos receptores BLT1, TLR2 e TLR4:

A) Produção de LTB₄ e **B)** IL-6 em macrófagos humanos infectados em diferentes concentrações de glicose comparados a macrófagos não infectados, n=9. Quantificação relativa da expressão gênica de **C)** BLT1, n=9 **D)** TLR2, n=6 e **E)** TLR4, n=6 em macrófagos cultivados em diferentes concentrações de glicose sem infecção (branco) ou infectados (preto). **F)** Viabilidade dos macrófagos em diferentes concentrações de glicose, n=3. Teste de Mann-Whitney; * p < 0,05; ** p < 0,01.

7 DISCUSSÃO

O diabetes é uma doença metabólica, caracterizada por elevados níveis de glicose na circulação sanguínea (KEANE et al., 2017). Esse distúrbio metabólico tem ganhado grande atenção devido a sua gravidade e a alta incidência ao passar dos anos. No Brasil, estima-se que no prazo de 20 anos, o número de adultos diagnosticado com Diabetes cresça mais de 60% (IDF, 2015).

A inflamação crônica e sistêmica em pacientes diabéticos é algo bem estudado e consolidado, com elevados níveis de mediadores pró-inflamatórios na circulação sanguínea, esses pacientes em longo prazo tendem a desenvolver graves complicações, dentre elas, a dificuldade de cicatrização e aumento da suscetibilidade a infecções (DONATH; SHOELSON, 2011; FILGUEIRAS et al., 2015a).

Os dados clínicos dos pacientes do presente estudo revelaram um grande descompensamento glicêmico em pacientes diabéticos, tornando um grupo bastante heterogêneo, isso pode ser devido à falta de diagnóstico precoce e controle da doença em regiões endêmicas (Figura 2A). A área endêmica de Corte de Pedra no estado da Bahia é uma das mais significativas da América Central e do Sul na infecção por *L. braziliensis*, no entanto, os dados de pacientes diabéticos até o período de 2008 eram escassos no Posto de Saúde de Corte de Pedra, evidenciando que a população em estudo apenas nos últimos anos passou a ter atenção perante a hiperglicemia (JIRMANUS et al., 2012).

Na população em estudo não foi possível verificar aumento no tamanho (Figura 2B) e número de lesão (Figura 2C) entre pacientes diabéticos e não diabéticos. Jirmanus e Colaboradores rastrearam os dados clínicos de pacientes da área endêmica de Corte de Pedra no período de 1988-2008, constatando um número constante de lesões por pacientes, não verificando diferença nem mesmo em formas clínicas distintas da doença. Eles mostraram também que a forma cutânea da Leishmaniose é a que possui o menor tamanho em comparação as outras formas clínicas (JIRMANUS et al., 2012). De Moura e Colaboradores mostraram em modelo experimental que a lesão surge apenas no local de inoculação das formas infectantes do parasita, deixando a entender que na LCL, o número de lesão pode ser mais dependente do flebotômio do que mesmo o hospedeiro (DE MOURA et al., 2005). No entanto, foi possível observar que pacientes hiperglicêmicos não cicatrizavam no primeiro ciclo de tratamento para LCL, possuindo uma resposta positiva apenas com o segundo ciclo em diante, quando os pacientes também começam a responder aos medicamentos

hipoglicemiantes (Figura 2D). A dificuldade de cicatrização em ambiente hiperglicêmico é uma complicação constante desses pacientes, os comprometimentos macro e microvasculares, a neuropatia, hipóxia e inflamação crônica podem ser fatores determinantes para tal consequência (BALTZIS; ELEFTHERIADOU; VEVES, 2014).

No processo de cicatrização em ambiente hiperglicêmico pouco se sabe os mecanismos celulares e moleculares envolvidos, Wu e Colaboradores experimentalmente mostraram que um dos principais fatores na dificuldade de cicatrização é a inflamação exacerbada induzida via TLR3 (WU et al., 2016). Nesse mesmo contexto, um estudo mostrou a participação da inflamação proveniente do TLR9 dificultando a cicatrização em pacientes DM2 (SINGH et al., 2016). Além disso, Mirza e Colaboradores ressaltaram a participação de macrófagos na dificuldade de cicatrização em ambientes hiperglicêmicos, principalmente pela sua polarização para um perfil pró-inflamatório (MIRZA et al., 2014, 2015). Isso fortalece o entendimento que determinados mediadores inflamatórios e potencializadores de TLRs estão relacionados com a dificuldade de cicatrização em pacientes diabéticos (MIRZA et al., 2013; MIRZA; KOH, 2015; SINGH et al., 2016; WU et al., 2016).

Para determinar o estado inflamatório dos pacientes em estudo, os níveis de LTB₄ (Figura 3A), PGE₂ (Figura 3B), IL-6 (Figura 3C) e TNF- α (Figura 3D) foram mensurados. Os resultados confirmam que indivíduos diabéticos com LCL possuem elevados níveis de mediadores inflamatórios comparado a pacientes apenas com LCL. Resultados estes, que corroboram com os achados por Hang e Colaboradores, onde encontraram um aumento de IL-6 e TNF- α em pacientes com retinopatia diabética (HANG et al., 2014). As citocinas IL-6 e TNF- α também têm sido associadas em pacientes diabéticos com nefropatias (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Em modelo experimental de diabetes, o aumento de LTB₄ tem sido relacionado com o a suscetibilidade a infecções (FILGUEIRAS et al., 2015b). O LTB₄ em camundongos diabéticos é encontrado em grandes níveis na circulação, possuindo uma característica peculiar, a capacidade de aumentar as demais citocinas pró-inflamatórias encontradas em condições hiperglicêmicas (BRANDT; SEREZANI, 2017; FILGUEIRAS et al., 2015b; SEREZANI et al., 2011a). Em relação ao PGE₂, os resultados mostram que pacientes diabéticos com LCL mesmo estando sistemicamente inflamados, os níveis deste eicosanoide permanece indiferente em relação a pacientes com LCL não diabético, isso mostra um desequilíbrio inflamatório desses pacientes hiperglicêmicos, uma vez que, PGE₂ tem sido relacionado com a patogênese de doenças inflamatórias, principalmente pela sua associação anti-inflamatória e imunossupressora ao ligar no seu receptor EP4 e induzir a

inibição do NF- κ B, diminuindo assim citocinas pró-inflamatórias (GILL et al., 2016; NATARAJ et al., 2001; OGAWA et al., 2009).

A hiperglicemia é um fator determinante para a produção de altos níveis de mediadores inflamatórios, nossos achados demonstram uma correlação positiva entre a glicemia e os níveis de LTB₄ (Figura 4A), IL-6 (Figura 4B) e TNF- α (Figura 4C) em pacientes com LCL, diabético ou não. Liu e Colaboradores, conseguiram associar o grau de glicação de Hemoglobina (HbA1c) com a inflamação em pacientes euglicêmicos ou hiperglicêmicos (LIU et al., 2015). Interessantemente, o LTB₄ foi o único mediador inflamatório capaz de mostrar uma correlação positiva com o tempo de cura para LCL em pacientes diabéticos (Figura 4D). Mostrando a participação deste mediador no desfecho da LCL em pacientes sistemicamente inflamados. Estudos recentes tem mostrado a participação deste mediador lipídico no contexto de cicatrização de feridas, demonstrando que a sua inibição está relacionado com um melhor processo resolutivo (GUIMARÃES et al., 2018). Além disso, a produção descontrolada de LTB₄ em ambientes hiperglicêmicos tem sido relacionada com um recrutamento descontrolado de neutrófilo e formação ineficiente do abscesso (Dados não publicados - BRANDT et al., 2018). Nesse contexto, Hang e Colaboradores mostraram a capacidade de um mediador inflamatório ser utilizado como biomarcador em complicações diabéticas (HANG et al., 2014). Sindhu e Colaboradores também evidenciaram a possibilidade de encontrar proteínas com potencial de sinalizar a agravamento de patologias como o diabetes (SINDHU et al., 2016). Mostrando que o alvo do atual estudo, pode tanto fornecer uma via a ser explorada como medida terapêutica assim como um possível biomarcador.

A suscetibilidade a infecções em pacientes com distúrbio metabólico como o diabetes é uma preocupação incessante, tanto para o paciente quanto para o corpo médico em ambiente hospitalar (BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007; FILGUEIRAS et al., 2015b; POZZILLI; LESLIE, 1994). Os resultados do presente estudo destaca o aumento da suscetibilidade de macrófagos de indivíduos diabéticos a infecção por *L. braziliensis* comparado com indivíduos não diabético (Figura 5A;B). Nesse contexto, esses resultados estão de acordo com o descrito por Filgueiras e Colabores, os quais, em modelo experimental de diabetes, mostraram a suscetibilidade a infecção e agravamento de sepse (FILGUEIRAS et al., 2015b). Outro estudo também mostrou associação da suscetibilidade a infecções com o diabetes, relatando o aumento de infecções na pele, pulmão e trato urinário (BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007).

Os dados do atual estudo mostram que macrófagos cultivados em condições hiperglicêmicas parecem ter uma resposta ineficiente durante um processo infeccioso (Figura

6A-D) diferindo do encontrado em um estudo feito para avaliar a suscetibilidade de macrófagos submetidos a altas concentrações glicose infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, o qual mostrou que a glicose não participa sozinha no processo de suscetibilidade, sendo dependente de outros fatores, como a produção dos mediadores inflamatórios (LACHMANDAS et al., 2015). Sendo assim, a suscetibilidade diante da hiperglicêmica pode ser dependente do patógeno e não uma característica generalizada para todos os tipos de infecções.

Diante desses achados, o LTB₄ produzido em macrófagos após a infecção por *L. braziliensis* juntamente com a modulação negativa dos receptores BLT1 (Figura 7C), TLR2 (Figura 7D) e TLR4 (Figura 7E) em macrófagos sob condições hiperglicêmicas parece ser o responsável pela suscetibilidade (Figura 7A). A sinalização do LTB₄ parece ter um papel fundamental, uma vez que, um estudo experimental de diabetes destacou a correlação da produção exacerbada de LTB₄ com a suscetibilidade a infecções bacterianas (FILGUEIRAS et al., 2015b). Além disso, um estudo mostrou que o parasita protozoário *Leishmania sp.* parece modular negativamente a ação do LTB₄ com a finalidade de evadir do sistema imune (CHAVES et al., 2014; CHAVES; CANETTI; COUTINHO-SILVA, 2016; MORATO et al., 2014).

Sabe-se que o LTB₄ é um potencializador de TLR (SEREZANI et al., 2011b). No entanto, quando os TLR ou o seu receptor BLT1 estão modulados negativamente pouco da sua função é exercida, como a produção de citocinas pró-inflamatórias e capacidade de eliminação do patógeno (FILGUEIRAS et al., 2015b; MORATO et al., 2014; ROSE-JOHN; WINTHROP; CALABRESE, 2017; SEREZANI et al., 2011b). Além disso, os TLR são de grande importância para o controle da infecção por *Leishmania* (GATTO et al., 2015). Em especial, a expressão de TLR2 e TLR4 foi relacionada com a produção de mediadores inflamatórios antes e depois do tratamento para Leishmaniose (GATTO et al., 2015). Assim como no perfil de resposta contra a *L. donovani* (MURRAY et al., 2013). Halliday e Colaboradores mostraram que camundongos sem TLR2 e TLR4 apresentou um número maior de lesões e de carga parasitária comparado a camundongos selvagens, mostrando a participação desses receptores no controle da infecção por *L. major* (HALLIDAY et al., 2016).

Os dados mostram também a produção da citocina IL-6 após infecção de macrófagos por *L. braziliensis*. Um estudo mostrou que essa citocina está relacionada com a capacidade do hospedeiro em resolver os mais variados tipos de infecções, como viral, fúngica, bacteriana e parasitária (ROSE-JOHN; WINTHROP; CALABRESE, 2017). A produção de

IL-6 na Leishmaniose tem mostrado ter um papel imunoprotetor (STÄGER et al., 2006). Foi relatada também a sua participação em PMBCs estimulados com a *L.braziliensis* e relacionada com indivíduos bons respondedores (GOMES et al., 2014). No entanto, em um contexto de cultura celular, a citocina IL-6 pode não estar relacionado a suscetibilidade, uma vez que, diferente do LTB₄ que age diretamente no aumento ROS e subsequente eliminação do parasita (CHAVES; CANETTI; COUTINHO-SILVA, 2016), a IL-6 em macrófagos está relacionada apenas com o aumento da expressão do receptor de IL4 (IL4R) (BONCI; LUPICA; MORALES, 2015).

Diferente de condições normoglicêmicas, que o LTB₄ parece ter um papel protetor em infecções com *L. braziliensis* (CHAVES et al., 2014; CHAVES; CANETTI; COUTINHO-SILVA, 2016; MORATO et al., 2014). Esses dados sugerem que em condições hiperglicêmicas, a produção exacerbada de LTB₄ pode dificultar uma resposta controlada e eficaz contra a *L. braziliensis*, resultando em uma resposta inflamatória crônica e subsequente dificuldade de cicatrização. Além disso, a hiperglicemia parece ter um papel importante na modulação de receptores da via do LTB₄ e dos TLR, resultando em macrófagos mais hiporresponsivo a infecção por *L. braziliensis*. Fornecendo assim, possíveis vias a ser exploradas com a finalidade de melhorar a resposta imunológica desses pacientes, resultando em um melhor prognóstico no tempo de cicatrização.

8 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo, juntos, mostram que indivíduos diabéticos com LCL possuem um perfil inflamatório exacerbado e sistêmico comparado a indivíduos não diabético. E em destaque, um mediador lipídico, o LTB₄, presente em altos níveis em pacientes hiperglicêmicos está relacionado com a dificuldade de cicatrização. Além disso, os resultados mostram que tanto macrófagos provenientes de indivíduos diabéticos como de doadores saudáveis submetidos a altas concentrações de glicose possuem uma maior suscetibilidade a infecção por *L. braziliensis*. Esta suscetibilidade pode ser estar relacionado com a modulação negativa de receptores como BLT1, TLR2 e TLR4, fazendo com que não haja a sinalização completa do LTB₄, resultando assim, em uma reposta ineficiente e diferente em comparação aos macrófagos cultivados em concentrações normais de glicose.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C.; CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 7, p. 27, 2012.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.
- BALTZIS, D.; ELEFThERIADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. **Advances in Therapy**, v. 31, n. 8, p. 817–836, 2014.
- BENFIELD, T.; JENSEN, J. S.; NORDESTGAARD, B. G. Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. **Diabetologia**, v. 50, n. 3, p. 549–554, 2007.
- BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid Mediators in Inflammation. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, p. 1–21, 2016.
- BONCI, A.; LUPICA, C. R.; MORALES, M. **HHS Public Access**. v. 18, n. 3, p. 386–392, 2015.
- BOWLING, F. L.; RASHID, S. T.; BOULTON, A. J. M. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 10, p. 606–616, 2015.
- BRANDT, S. L.; SEREZANI, C. H. Too much of a good thing: How modulating LTB₄ actions restore host defense in homeostasis or disease. **Seminars in Immunology**, v. 33, n. August 2016, p. 37–43, 2017.
- CHAVES, M. M. et al. Leukotriene B₄ Modulates P2X₇ Receptor-Mediated Leishmania amazonensis Elimination in Murine Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 10, p. 4765–4773, 2014.
- CHAVES, M. M.; CANETTI, C.; COUTINHO-SILVA, R. Crosstalk between purinergic receptors and lipid mediators in leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 489, 2016.
- CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, 2010.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.
- DE MOURA, T. R. et al. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, 2005.
- DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98–107, 2011.

EZZATI, M. Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 2, n. 8, p. 634–647, 2014.

FILGUEIRAS, L. R. et al. Leukotriene B₄-mediated sterile inflammation favors susceptibility to sepsis in murine type 1 diabetes HHS Public Access. **Sci Signal**, v. 8, n. 361, 2015b.

FILGUEIRAS, L. R. et al. Leukotriene B₄ – mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes. **Sci Signal**, v. 8, n. 361, p. 1–10, 2015a.

FILGUEIRAS, L. R.; HENRIQUE SEREZANI, C.; JANCAR, S. Leukotriene B₄ as a potential therapeutic target for the treatment of metabolic disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. OCT, p. 13–16, 2015.

GATTO, M. et al. The involvement of TLR2 and TLR4 in cytokine and nitric oxide production in visceral leishmaniasis patients before and after treatment with anti-leishmanial drugs. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2015.

GILL, S. K. et al. The anti-inflammatory effects of PGE₂ on human lung macrophages are mediated by the EP₄ receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 21, p. 3099–3109, 2016.

GOLDEN, S. H. et al. Update on Prevention of Cardiovascular Disease in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus in Light of Recent Evidence: A Scientific Statement From the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Diabetes care**, v. 38, n. September, p. 1777–1803, 2015.

GOMES, C. M. et al. Leishmania braziliensis amastigotes stimulate production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 5, p. 225–231, 2014.

GUIMARÃES, F. R. et al. The inhibition of 5-Lipoxygenase (5-LO) products leukotriene B₄ (LTB₄) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) modulates the inflammatory response and improves cutaneous wound healing. **Clinical Immunology**, v. 190, p. 74–83, 2018.

HALLIDAY, A. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a role in controlling cutaneous leishmaniasis in vivo, but does not require activation by parasite lipophosphoglycan. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

HANG, H. et al. Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy. **Molecular vision**, v. 20, n. August, p. 1137–45, 2014.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature Publishing Group**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.

IDF. **IDF Diabetes Atlas**. [s.l: s.n.].

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of Leishmania (Viannia) braziliensis transmission over a 20-year

period. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 3, p. 426–33, mar. 2012.

KATSAROU, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, 2017.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, 2011.

KEANE, K. N. et al. The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2017.

KRAKAUER, T. Inflammasome, mTORC1 activation, and metabolic derangement contribute to the susceptibility of diabetics to infections. **Medical Hypotheses**, v. 85, n. 6, p. 997–1001, 2015.

LACHMANDAS, E. et al. The effect of hyperglycaemia on in vitro cytokine production and macrophage infection with mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2015.

LEON, B. M. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 13, p. 1246, 2015.

LI, P. et al. LTB₄ promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. **Nature Medicine**, v. 21, n. 3, p. 239–247, 2015.

LIU, S. et al. Association between inflammation and biological variation in hemoglobin A1c in U.S. nondiabetic adults. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 6, p. 2364–2371, 2015.

MATHEUS, A. S. et al. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. **Int J Hypertens**, v. 2013, n. Cvd, p. 653789, 2013.

MIRZA, R. E. et al. Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. **Diabetes**, 2013.

MIRZA, R. E. et al. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. **Diabetes**, 2014.

MIRZA, R. E. et al. Macrophage PPAR γ and impaired wound healing in type 2 diabetes. **Journal of Pathology**, v. 236, n. 4, p. 433–444, 2015.

MIRZA, R. E.; KOH, T. J. Contributions of cell subsets to cytokine production during normal and impaired wound healing. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 409–412, 2015.

MORATO, C. I. et al. Essential role of leukotriene B₄ on Leishmania (Viannia) braziliensis killing by human macrophages. **Microbes and Infection**, 2014.

MURRAY, H. W. et al. Leishmania donovani Infection in the Liver. v. 81, n. 7, p. 2318–2326, 2013.

NATARAJ, C. et al. Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1229–1235, 2001.

- NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F. et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 327–340, 2011.
- NICLOT, J. et al. Des ulcérations de cheville et du pied chez un diabétique révélant une leishmaniose cutanée. **Journal des Maladies Vasculaires**, v. 39, n. 6, p. 430–433, 2014.
- OGAWA, M. et al. The Mechanism of Anti-Inflammatory Effects of Prostaglandin E2 Receptor 4 Activation in Murine Cardiac Transplantation. **Transplantation**, v. 87, n. 11, p. 1645–1653, 2009.
- PENTAKOTA, S. R. et al. Does diabetes care differ by type of chronic comorbidity?: An evaluation of the Piette and Kerr framework. **Diabetes Care**, v. 35, n. 6, p. 1285–1292, 2012.
- POZZILLI, P.; LESLIE, R. D. G. Infections and Diabetes: Mechanisms and Prospects for Prevention. **Diabetic Medicine**, v. 11, n. 10, p. 935–941, 1994.
- ROSE-JOHN, S.; WINTHROP, K.; CALABRESE, L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 7, p. 399–409, 2017.
- SCHENA, F. P. Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 3_suppl_1, p. S30–S33, 2005.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Publishing Group**, 2016.
- SEREZANI, C. H. et al. Leukotrienes Are Essential for the Control of Leishmania amazonensis Infection and Contribute to Strain Variation in Susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3201–3208, 2006.
- SEREZANI, C. H. et al. Leukotriene B4 amplifies NF- κ B activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. **Journal of Clinical Investigation**, 2011a.
- SEREZANI, C. H. et al. Leukotriene B 4 amplifies NF- κ B activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 2, p. 671–682, 2011b.
- SINDHU, S. et al. Plasma fetuin-A/ α 2-HS-glycoprotein correlates negatively with inflammatory cytokines, chemokines and activation biomarkers in individuals with type-2 diabetes. **BMC Immunology**, v. 17, n. 1, p. 33, 2016.
- SINGH, K. et al. Increased expression of TLR9 associated with pro-inflammatory S100A8 and IL-8 in diabetic wounds could lead to unresolved inflammation in type 2 diabetes mellitus (T2DM) cases with impaired wound healing. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 1, p. 99–108, 2016.
- SIVAMANI, R. K. Eicosanoids and Keratinocytes in Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 476–481, 2014.
- SR, R. B. D. A. et al. Cardiovascular Disease Risk Assessment: Insights from Framingham. **Global Heart**, v. 8, n. 1, p. 11–23, 2013.

STÄGER, S. et al. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 7, p. 1764–1771, 2006.

STEPHANIE L. BRANDT, SUE WANG, NAIARA N. DEJANI³, NATHAN KLOPFENSTEIN, SETH WINFREE, L. et al. Excessive localized leukotriene B₄ levels dictate poor skin host defense in diabetic mice. 2018. (DADOS NÃO PUBLICADOS)

TAVARES, N. et al. Degranulating Neutrophils Promote Leukotriene B₄ Production by Infected Macrophages To Kill *Leishmania amazonensis* Parasites. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 4, p. 1865–1873, 2016.

TODA, A.; YOKOMIZO, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene B₄ receptors. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, 2002.

VINCENT, A. M. et al. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 10, p. 573–583, 2011.

WERZ, O. 5-Lipoxygenase: Cellular Biology and Molecular Pharmacology. **Current drug targets - Inflammation and allergy**, v. 1, n. 1, p. 23–44, 2002.

WHO. WHO Technical Report Series. **Control of the leishmaniases**. [s.l: s.n.]. v. 978

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016.

WU, Y. et al. Hyperglycaemia inhibits REG3A expression to exacerbate TLR3-mediated skin inflammation in diabetes. **Nature Communications**, v. 7, p. 13393, 2016.

ZAND, H.; MORSHEDZADEH, N.; NAGHASHIAN, F. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, 2017.

ZHOU, B. et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1513–1530, 2016.

Tabela 1 Dados clínicos de pacientes com LCL infectados por *L. braziliensis*, diabético ou não.

Pacientes	Parâmetro								
	Idade (Anos)	Gênero	Glicemia (mg/dL)	Tempo de cura (Dias)	Tamanho de lesão (mm)	Número de lesão (n)	Local da lesão	LST (mm)	PCR
Não diabético									
27062	54	F	112	30	5X4	01	Coxa esquerda	23x20	Positivo
27067	55	M	114	90	13X12	01	Braço direito	17x15	Positivo
27140	49	M	99	80	25X18	01	Perna esquerda	15x15	Positivo
27197	39	M	104	X	20X19	04	Perna esquerda	5x5	Positivo
27807	24	F	108	90	7X7	03	Tórax e braço	10x10	Positivo
27828	28	F	101	80	35X22	01	Braço direito	17x15	NR
28097	25	F	98	145	10X05	01	Coxa direita	12x12	Positivo
26970	62	F	104	40	10X10	02	Pé direito	15x12	NR
Diabético									
27023	45	F	430	77	14X11	02	Coxa esquerda	16x10	Positivo
27055	45	M	300	137	12X10	02	Braço direito	14x10	Positivo
27112	66	F	173	40	5X4	01	Perna direita	20x15	NR

27114	64	M	402	60	20X15	03	Perna direita	10x18	Positivo
27130	51	F	343	120	19X7	03	Abdômen	15x12	Negativo
27146	55	F	277	45	20X15	01	Perna direita	20x15	Positivo
27185	55	F	238	45	20X6	03	Coxa direita	22x22	Positivo
27258	65	F	255	90	27X25	02	Perna esquerda	16x15	Negativo
27255	45	M	129	50	25X15	02	Tronco	22x16	Positivo
27362	61	M	286	80	13X8	01	Perna direita	17x15	Positivo
27407	49	M	311	20	8X6	01	Abdômen	13x13	NR
28069	38	F	272	45	11X10	01	Antebraço direito	20x17	Positivo

LST – Teste de Pele contra Leishmania; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase ; NR – Não reagido; X – Dados não obtidos