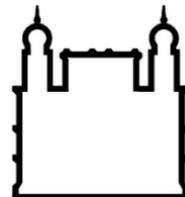




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA METFORMINA NA INFECÇÃO
POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

FILIPPE ROCHA LIMA

**Salvador – Bahia
2019**

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA METFORMINA NA INFECÇÃO
POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

FILIPPE ROCHA LIMA

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marcos Arruda
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas

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

**Salvador – Bahia
2019**

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA METFORMINA NA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA BRAZILIENSIS”.**

Filipe Rocha Lima

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 28 de novembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Sérgio Marcos Arruda
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

AGRADECIMENTOS

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas mudam o mundo.”

Paulo Freire

Agradeço as pessoas que participaram nas vivências das aventuras e desventuras que corroboraram para a consolidação da presente dissertação, da formação como pesquisador e das transmutações para evolução como pessoa.

Sinceros agradecimentos aos meus orientadores Prof. Dr. Sérgio Arruda e Prof. Dr. Luiz Freitas, como também, ao Prof. Dr. Edgar Carvalho Filho e a Prof^a. Dr^a Natália Tavares pelas contribuições.

A rotina experimental e de discussões científicas e ou simplesmente da vida não seriam ideais sem os amigos do LASP P0. Agradeço a todos os integrantes que durante os 7 anos de LASP tornaram todos os dias magníficos e incentivadores de continuar o desenvolvimento da ciência no Brasil. Agradeço a equipe do LAPEM, aos amigos do grupo NT e CB do LAIPHE, como também, a Associação de Pós-graduandos (APG) Fiocruz BA por implementar o ímpeto de transformação do cenário acadêmico e científico na comunidade IGM. Obrigado a todos os pacientes, profissionais que permitiram a execução do projeto e a colaboração do MSc. Alexsandro Lago. Agradeço a farmacêutica Joselia Cirqueira por todo auxílio.

Meus notórios reconhecimentos ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Patologia Experimental (PGPAT), a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto Gonçalo Moniz (IGM) - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), a coordenação de ensino, as plataformas tecnológicas do IGM, a biblioteca do IGM e a Sra. Ana Maria Fiscina, assim como, em especial a coordenadora do PGPAT Prof^a. Dr^a Valéria Borges.

Reafirmo minha gratidão aos meus pais Paulo Cesar Bonfim de Lima (*in memoriam*) e Tânia Regina de Jesus Rocha Lima, bem como, a toda família, Wellignton Cunha, amigos, *Òrìṣàs*, *Ìyá* Maria de Fátima e a família do *Ilê Aṣẹ̀ Ògún Oṣìn Ímolè* por todos os incentivos para subsidiar o alcance dos objetivos propostos.

Por fim, agradeço as instituições de fomento CAPES e CNPq. Como também, afirmo a atual Presidência da República Brasileira que a ciência e educação sempre foram e serão os veículos de obtenção do sucesso e desenvolvimento da nação.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará a seu tamanho original.”

Albert Einstein

LIMA, Filipe Rocha. Avaliação do efeito imunomodulador da metformina na infecção por *Leishmania braziliensis*. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O aumento da incidência na gravidade das manifestações clínicas em pacientes com doenças metabólicas, como a diabetes mellitus (DM) tipo 2, ocorre devido a inflamação crônica induzida pelo aumento dos níveis plasmáticos de glicose e lipídios exógenos. DM é classificada como um fator de risco para doenças infecciosas e endêmicas, em países tropicais. Portanto, infecções cutâneas causadas por patógenos como *L. braziliensis* (L.b), no Brasil, , causador da leishmaniose cutânea (LC), representam um modelo para avaliar o efeito da associação entre DM, uso da metformina, fármaco hipoglicemiante de primeira escolha para o tratamento por hipoglicemiante na DM, mais amplamente utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS), e suas interferências na resposta imune *in situ* e sistêmica do hospedeiro contra este protozoário. Tendo em vista, os efeitos adicionais do hipoglicemiante metformina (MET) ter capacidade moduladora na resposta imunológica inata e adaptativa do hospedeiro. **OBJETIVO:** Avaliar as diferenças clínicas e histopatológicas de pacientes com LC com e sem DM e o efeito imunomodulador da metformina em modelo experimental de infecção por L.b. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo de caso-controle, amostra de conveniência, de caráter investigativo e descritivo em biópsias de pacientes com LC com e sem DM. Biópsias foram caracterizadas por análises histopatológicas e de imunohistoquímica. Adicionalmente, um estudo experimental de infecção com L.b e tratamento com MET *in vivo* em camundongos BALB/c e *in vitro* em macrófagos Raw 264.7. **RESULTADOS:** Pacientes com DM desenvolvem LC atípica, com menor frequência de necrose e diminuição do número de células T CD8⁺ nas úlceras. MET no modelo experimental *in vivo* induziu diminuição de TNF e IL-12p70 séricos, interferiu na cinética da lesão e esteve associado ao aumento da carga parasitária no local da inoculação e nos linfonodos ipsilaterais. *In vitro*, em macrófagos tratados com MET, foi observado redução da proliferação celular e não houve interferência na viabilidade celular. Diminutas concentrações de MET no cultivo de L.b permite a manutenção da fase estacionária de crescimento. Na infecção *in vitro* por L.b e células tratadas com MET, observou-se aumento do número de macrófagos infectados e da carga parasitária. MET e infecção por L.b isoladamente promove a produção de ROS intracelular, contudo os níveis de ROS são reduzidos em macrófagos tratados com MET e submetidos a infecção com L.b. **CONCLUSÃO:** DM podem interferir no fenotípico das lesões cutâneas através da modulação no infiltrado celular no local da inflamação, assim como, na extensão e frequência da necrose na LC em pacientes diabéticos. De forma sistêmica, o tratamento experimental com MET foi capaz de reduzir os níveis de citocinas indutoras de uma resposta Th1, descrita como protetora para o controle parasitário, como também e interferir na cinética da ulceração cutânea e causando aumento da carga parasitária. As evidências experimentais foram comprovadas em ensaios de cultivo celular nos quais a MET aumentou a carga parasitária, alterou a produção de ROS e modulou a proliferação celular. Diante dessas evidências conclui-se que DM interfere na apresentação clínica na úlcera da LC e MET piora a evolução da leishmaniose cutânea experimental.

Palavras-chave: Metformina. Leishmaniose cutânea. Diabetes. Imunomodulação.

LIMA, Filipe Rocha. Evaluation of the immunomodulatory effect of metformin on *Leishmania braziliensis* infection. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The increased incidence in the severity of clinical manifestations in patients with metabolic diseases such as diabetes mellitus (DM) type 2 is due to chronic inflammation induced by increased plasma glucose and exogenous lipid levels. DM is classified as a risk factor for infectious and endemic diseases, in tropical countries. Therefore, cutaneous infections caused by pathogens such as *L. braziliensis* (Lb) in Brazil, which causes cutaneous leishmaniasis (CL), represent a proposed model to evaluate the effect of the association between DM, metformin use. Metformin is a hypoglycemic drug of first choice for hypoglycemic treatment of DM and is widely used in the Unified Health System (SUS), despite its interference in the host's in situ and systemic immune response against the protozoan. Given the additional effects of metformin (MET), it is capable of modulating the innate and adaptive host immune response. **OBJECTIVE:** To evaluate the clinical and histopathological differences of CL patients with and without DM and the immunomodulatory effect of metformin in an experimental model of Lb infection. **MATERIAL AND METHODS:** This is a case-control study, convenience sample, investigative and descriptive study in biopsies from patients with CL with and without DM. Biopsies were characterized by histopathological and immunohistochemistry analysis. Additionally, an experimental study of Lb infection and MET treatment *in vivo* in BALB / c mice and *in vitro* in Raw 264.7 macrophages. **RESULTS:** Patients with DM develop atypical CL, with less frequency of necrosis and CD8 + T cells in ulcers. MET in the *in vivo* experimental model induced a decrease in serum TNF and IL-12p70, interfered with lesion kinetics and was associated with increased parasite load at the inoculation site and ipsilateral lymph nodes. In MET-treated macrophages, cell proliferation reduction was observed and there was no interference on cell viability. Small MET concentration in L.b culture allows the maintenance of the stationary phase of growth. *In vitro* infection with Lb and MET-treated cells increased the frequency of infected macrophages and parasite load. Although MET and Lb infection alone are able to promote the production of intracellular ROS, ROS levels are reduced in MET-treated macrophages undergoing L.b infection. **CONCLUSION:** DM can interfere with the phenotypic of skin lesions by modulating cell infiltrate at the inflammation site, as well as the extent and frequency of CL necrosis in diabetic patients. Systemically, the experimental treatment with MET was able to reduce the levels of cytokines that induce a Th1 response, described as protective for parasitic control, as well as to interfere with cutaneous ulceration kinetics and causing increased parasite load. Experimental evidence was confirmed in cell culture assays in which MET increased parasitic load, altered ROS production, and modulated cell proliferation. Based on this evidence, it can be concluded that DM interferes in the clinical presentation of the ulcer and MET worsens the evolution of experimental cutaneous leishmaniasis.

Keys word: Metformin. Cutaneous leishmaniasis. Diabetes. Immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1	Quantificação semiautomática das áreas de inflamação <i>in situ</i> no software Image-Pro Plus 3D Suite v. 7.0.	32
Figura 2	Quantificação semiautomática das imunomarcações no software Image-Pro Plus 3D Suite v. 7.0.	34
Figura 3	Úlceras cutâneas de pacientes com LC.	45
Figura 4	Comparação dos níveis de glicose sérica jejum e/ou pós-prandial nos pacientes com leishmaniose.	46
Figura 5	Extensão do infiltrado inflamatório relativo à área total do fragmento cutâneo.	48
Figura 6	Avaliação imunofenotípica do infiltrado inflamatório <i>in situ</i> .	50
Figura 7	Correlação entre células do infiltrado inflamatório das lesões e a extensão da úlcera.	51
Figura 8	IHQ para o estudo imunofenotípico <i>in situ</i> .	52
Figura 9	Quantificação de vasos CD31+ <i>in situ</i> .	53
Figura 10	Avaliação do número de amastigotas <i>in situ</i> .	54
Figura 11	Monitoramento do peso corporal dos camundongos.	55
Figura 12	Monitoramento do surgimento da lesão cutânea em modelo experimental de infecção com L.b.	56
Figura 13	Avaliação comparativa da carga parasitária em modelo experimental de infecção por L.b.	57
Figura 14	Níveis séricos de citocinas durante infecção experimental por L.b com e sem tratamento com MET.	58
Figura 15	Avaliação da viabilidade celular de macrófagos Raw 264.7 expostos a diferentes concentrações de MET.	59
Figura 16	Curva dose resposta de macrófagos Raw 264.7 expostos a MET.	60
Figura 17	Curva de crescimento parasitário <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de MET.	61
Figura 18	Quantificação da infecção de macrófagos Raw 264.7 por L.b tratados com MET.	62
Figura 19	Análise comparativa da viabilidade parasitária intracelular em macrófagos Raw 264.7 infectados com L.b.	63

- Figura 20 Níveis de *ROS* no sobrenadante da cultura de macrófagos Raw 264.7 tratados com MET e infectados com L.b. 64
- Figura 21 Médias da dosagem intracelular de *ROS* em macrófagos Raw 264.7 infectados com L.b e tratados ou não com MET. 65
- Figura 22 Modelo proposto da imunomodulação induzida por metformina durante a infecção por *L. braziliensis* em macrófagos. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de Anticorpos Primários	32
Tabela 2	Condições experimentais de desafios e tratamento de macrófagos	40
Tabela 3	Variáveis demográficas e clínicas dos voluntários	44
Tabela 4	Análises anatomopatológicas dos pacientes LC e LC DM	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-coenzima A carboxilase
ADP	Difosfato de adenosina
AGEs	Produtos finais da glicação avançada
Akt	Proteína cinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPC-PKA	Monofosfato de adenosina cíclico – proteína cinase A
AMPK	Monofosfato de adenosina-proteína cinase ativada
ATP	Trifosfato de adenosina
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
Ca ²⁺	Cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCL2	Ligante 2 de quimiocina subfamília CC
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CN	Controle negativo
CoA	Coenzima A
CP	Controle positivo
DAB	Diaminobenzidina
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	<i>Dulbecco modification of Minimum Essential Media</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose
GTP	Trifosfato de guanosina

Hcl	Hidrocloridrato
HCV	Vírus da hepatite C
HE	Hematoxilina-eosina
HGM-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-coenzima A
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMGB1	<i>High-mobility group box 1 protein</i>
HRP	Peroxidase
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon-gama
IHQ	Imuno-histoquímica
IKK β	Inibidor do fator nuclear kappa β
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de interleucina 1
iNOS	Óxido nítrico sintase
IRAK	Cinase associada ao receptor de interleucina-1
JNK1	Cinase de estresse c-Jun N-terminal 1
K ⁺	Potássio
L.b	<i>Leishmania braziliensis</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
mROS	Espécies reativas de oxigênio mitocondrial
MET	Metformina
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

mTOR	complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NH ₂ OH	Hidroxilamina
NK	<i>Natural killer</i>
NLRP3	<i>Nod-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PMN	Polimorfonuclear
Rab-GAP	Protéina ativadora de GTPase família Rab
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
Sb ₊₅	Antimoniais pentavalentes
Ser	Serina
SFB	Soro bovino fetal
SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura ambiente
TBC1	Proteína membro da família 1 do domínio TBC1
TCLE	Termo de Consentimento livre e esclarecido
Th	<i>T helper</i>
<i>Thr</i>	Treonina
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 DIABETES MELLITUS	18
1.2 EFEITOS CLÁSSICOS DAS BIGUANIDAS	19
1.3 AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DA METFORMINA	20
1.4 DIABETES MELLITUS COMO FATOR DE RISCO PARA INFECÇÕES	21
1.5 LEISHMANIOSES	23
1.5.1 Ciclo parasitário e desenvolvimento da doença	23
1.5.2 Resposta imune na leishmaniose cutânea	24
1.5.3 Tratamento para leishmaniose	25
2 JUSTIFICATIVA	26
3 HIPÓTESE	27
4 OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5 METODOLOGIA	28
5.1 MODELO DE ESTUDO	28
5.2 LOCAL DE ESTUDO	28
5.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO	28
5.4 OBTENÇÃO DE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS	29
5.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	29
5.6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	30
5.6.1 Obtenção das biópsias	30
5.6.2 Histopatologia qualitativa	30
5.6.3 Imuno-histoquímica	30
5.6.4 Histopatologia quantitativa	32
5.6.5 Imuno-histoquímica quantitativa	33
5.7 MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	34
5.7.1 Tratamento com hidrócloridrato de metformina	35

5.7.2 Infecção com <i>L. braziliensis</i>	36
5.7.3 Dosagem sérica de citocinas	36
5.7.4 Quantificação da carga parasitária	37
5.7.5 Considerações éticas	37
5.8 MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	38
5.8.1 Ensaio de viabilidade celular	38
5.8.2 Ensaio de crescimento celular	38
5.8.3 Crescimento de <i>L. braziliensis</i> com metformina	39
5.8.4 Infecção de macrófagos Raw 264.7 com <i>L. braziliensis</i>	39
5.8.5 Taxa de infecção e quantificação de parasitos intracelulares	40
5.8.6 Avaliação da viabilidade parasitária intracelular	40
5.8.7 Dosagem de ROS no sobrenadante da cultura	41
5.8.8 Quantificação de metabólitos derivados do oxigênio intracelular	41
5.9 Análises estatísticas	42
6 RESULTADOS	43
6.1 ANÁLISES DOS ASPECTOS CLÍNICOS DOS PACIENTES E AVALIAÇÕES <i>IN SITU</i>	43
6.1.1 Avaliação demográfica e clínica dos pacientes com LC e DM	43
6.1.2 Pacientes diabéticos apresentam leishmaniose cutânea com úlceras atípicas	44
6.1.3 Hiperglicemia não interfere no tamanho da úlcera leishmaniótica	45
6.1.4 Pacientes diabéticos diferem nas alterações histológicas em comparação com pacientes sem DM na frequência de necrose na LC	46
6.1.5 Avaliação imunofenotípica do infiltrado inflamatório in situ revela menor frequência de células CD8+	49
6.1.6 Correlação negativa entre células Granzima B+ e área de ulceração e positiva entre macrófagos CD68+ nas biópsias de pacientes diabéticos com LC	51
6.1.7 Úlceras de pacientes com DM não diferem na microdensidade vascular na LC comparando com os pacientes controles	53
6.1.8 DM não interferiu na carga parasitária dos pacientes com LC	54
6.2 RESULTADOS DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS IN VIVO</i>	55

6.2.1 Avaliação do peso corporal dos animais como monitoramento físico	55
6.2.2 MET retarda o surgimento da pápula e modifica curva de lesão leishmaniótica	56
6.2.3 Tratamento prévio com MET promove o aumento da carga parasitária na lesão e em linfonodo ipsilateral	56
6.2.4 MET inibe a produção sistêmica de TNF e IL-12p70	57
6.3 RESULTADOS DOS EFEITOS DA METOFRMINA EM CULTURA DE CÉLULAS COM E SEM INFECÇÃO POR L.b.	59
6.3.1 MET não apresenta efeito citotóxico e inibe o crescimento de macrófagos Raw 264.7	59
6.3.2 Baixas concentrações de MET aumentam o crescimento de promastigotas de L.b, mas com altas doses não interfere	61
6.3.3 Tratamento com MET <i>in vitro</i> contribuiu para o aumento da taxa de infecção e carga parasitária em macrófagos Raw 264.7	61
6.3.4 MET suprime a liberação de ROS no meio extracelular e produção de ROS intracelular em macrófagos Raw 264.7 durante a infecção por L.b	63
7 DISCUSSÃO	67
8 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	81
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	81
ANEXO 2 - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	82
ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	83
ANEXO 4 - ARTIGO 1 PUBLICADO DURANTE O MESTRADO NO PGPAT	85
ANEXO 5 - ARTIGO 2 PUBLICADO DURANTE O MESTRADO NO PGPAT	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue, ocasionando danos teciduais sobretudo em coração, olhos, rins e nervos decorrentes das lesões vasculares (DeFRONZO et al., 2015). DM é classificada em diabetes tipo 1 ou 2. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) ou denominada diabetes juvenil ou diabetes insulino-dependente, é uma condição crônica em que o pâncreas produz níveis baixos ou ausência da insulina. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) apresenta-se através da resistência à insulina ou produção insuficiente na vida adulta (ALBERTI, ZIMMET, 1998). Estima-se que 422 milhões de adultos convivem com DM e sendo considerado um importante problema de saúde pública mundial (OMS, 2016). No Brasil, há pelo menos 7 milhões pessoas diabéticas e aproximadamente 80 mil mortes por ano por complicações da DM (IDF, 2015; OMS, 2016).

A elevada taxa de glicose circulante resulta em produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End-Products* – AGEs). AGEs são gerados pela ligação do grupamento carbonila da glicose com um grupamento amina das proteínas. A glicólise e a autoxidação de glicose interagem com aminoácidos para formar AGEs de forma alternativa. A glicosidação gera espécies reativas de oxigênio (*ROS*), levando ao estresse oxidativo e danos estruturais e funcionais às macromoléculas, aumento da expressão de mediadores inflamatórios, desenvolvimento e a progressão das complicações diabéticas (JAKUS, RIETBROCK, 2004). Monócitos, macrófagos e células dendríticas após estímulo inflamatório produzem mieloperoxidases e NADPH oxidase que induzem a formação de mais AGEs por meio da oxidação de aminoácidos, ocasionando inflamação adicional. AGEs são associados a doenças macrovasculares, micro e macrovasculares diabéticas, nefropatia, neuropatia e retinopatia. (HUEBSCHMANN et al., 2006).

A absorção aumentada de glicose altera o metabolismo celular a fosforilação oxidativa para glicólise e desativa AMP-proteína cinase ativada (AMPK), um sensor crítico de nutrientes e energia celular, ativando assim complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e consequente supressão da autofagia. A ativação de capases via inflamassoma desencadeia inflamação e apoptose, como também, associado ao estresse metabólico e disfunção vascular em diabéticos,

diminui a eliminação de patógenos e contribui assim para um risco maior de infecção nos diabéticos (KRAKAUER, 2015). Ativação dependente de *ROS* do inflamassoma *nod-like receptor family pyrin domain containing 3* (NLRP3) em células endoteliais, em condições de hiperglicemia, se estabelece como mecanismo inicial causando disfunção endotelial e liberação de *high-mobility group box 1 protein* (HMGB1) induzindo mais inflamação pela ação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs). Estes efeitos contribuem para o início precoce da lesão endotelial em DM (CHEN et al., 2016).

1.2 EFEITOS CLÁSSICOS DAS BIGUANIDAS

A metformina é uma biguanida derivada da planta *Galega officinalis*, utilizada desde a Idade Média na Europa para tratamento da poliúria em diabéticos. Seu uso oficial como fármaco para controle DM só ocorreu a partir do século XX, e atualmente é considerado um tratamento de primeira linha para DM 2 (SANTOMAURO et al., 2008; ÁLVAREZ, 2011). Seu efeito hipoglicemiante tem sido atribuído ao aumento da sensibilidade à insulina no tecido muscular esquelético, diminuição também da produção hepática de glicose por inibir a gliconeogênese e a glicogenólise, aumenta a expressão dos receptores de insulina e os níveis séricos do GLP-1, e ainda, promove perda de peso por ter propriedades anorexígenas e diminui a absorção intestinal de glicose (SANTOMAURO et al., 2008; ÁLVAREZ, 2011; MORANTES-CABALERO et al., 2016; CRESPO, 2009). Associado a isso, evidências demonstram que a metformina diminui os triglicérides e ácidos graxos livres ao inibir a lipólise, reduz a pressão arterial sistólica e diastólica e melhora a função endotelial (SANTOMAURO et al., 2008).

O mecanismo de ação da metformina no tratamento da DM 2 tem sido associado à inibição do complexo 1 da cadeia mitocondrial, causando aumento do monofosfato de adenosina (AMP) e levando à ativação da AMPK, proteína envolvida na regulação metabólica, que é ativada quando há depleção do trifosfato de adenosina (ATP). Os mecanismos modulatórios são associados a supressão das vias anabólicas, induzindo o catabolismo, resultando na restauração do balanço energético celular (HARDIE, 2016). O aumento do AMP promovido pela metformina inibe a proteína cinase ativada por AMPc (AMPc-PKA), proteína responsável pela via de sinalização do glucagon, hormônio indutor da elevação dos níveis plasmáticos de glicose, e a frutose-1,6-bifosfatase, enzima que atua na transformação do lactato e do glicerol em frutose-6-fosfato, que

posteriormente é convertida em glicose que é liberada do fígado para a corrente sanguínea através do transportador GLUT-2, inibindo assim a gliconeogênese (ADAK et al., 2018).

O aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético é proporcionado pela ação da AMPK em fosforilar a proteína membro da família 1 do domínio TBC1 (TBC1D1) ativadora da Rab-GTPase (Rab-GAP). A TBC1D1 e a proteína membro da família 4 do domínio TBC1 (TBC1D4) possuem ações semelhantes, porém a primeira é predominante no músculo, enquanto que a segunda está presente em adipócitos. Essa proteína se liga às vesículas contendo o transportador de glicose GLUT-4 e seus domínios Rab-GAP atuam como GTPases, que quando ligados ao GDP impedem a translocação do GLUT-4 para membrana plasmática. AMPK fosforilando a proteína TBC1D1 promove sua ligação a proteínas que inibem a atividade GTPase, levando ao aumento da concentração de GLUT-4 na membrana e melhorando a captação de glicose. A capacidade da AMPK de elevar a sensibilidade do músculo à ação da insulina é mediada pela fosforilação da *Ser237*, local fosforilado juntamente com *Thr596* pela via da Akt ativada pela insulina (HARDIE, 2014).

A ação da metformina sobre o metabolismo lipídico ocorre através da β -oxidação sobre a síntese de ácidos graxos, que decorre da inibição da fosforilação pelas ACC1 e ACC2 via AMPK, reduzindo os níveis de malonil-CoA, um intermediário da síntese de ácidos graxos e inibidor da absorção dos ácidos graxos pela mitocôndria (HARDIE, 2014). Associado a isso, a AMPK também diminui a síntese de triglicérides e de colesterol por inibir as enzimas HGM-CoA redutase (SANTOMAURO et al., 2008).

Os efeitos adicionais da metformina são na modulação negativa do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, resultando em uma diminuição na concentração de ATP celular e um aumento nas relações ADP/ATP e AMP/ATP, o que reflete um nível de baixa energia. Esta depleção de energia é responsável pela ativação AMPK a fim de restaurar a homeostase energética (DAUGAN et al., 2016).

1.3 AÇÃO IMUNOMODULATÓRIA DA METFORMINA

A metformina desencadeia ações anti-inflamatórias pela inibição de IL-1 β , TNF e MCP- 1 *in vitro* e *in vivo* (VASAMSETTI et al., 2015). Os efeitos anti-inflamatórios da metformina

inerentes à diferenciação e polarização de macrófagos são associados para prevenção e tratamento de lesão vascular, aterosclerose e câncer (HATTORI, HATTORI, HAYASHI, 2015). Efeitos pleiotrópicos descritos são parcialmente mediados pela ativação de AMPK. Os ativadores AMPK atenuam a diferenciação de monócitos em macrófagos e eventos pró-inflamatórios através de AMPK-1 α regulando transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). STAT3 desempenha um papel na regulação da diferenciação celular e AMPK regula negativamente a fosforilação de STAT3 inibindo sua ativação (VASAMSETTI et al., 2015).

Nos modelos de infecção com patógenos intracelulares como , por exemplo, a *Legionella pneumophila*, observou-se redução na expressão de IL-1 β e TNF, interleucina (IL)-12 (IL-12) e interferon-gama (IFN- γ), citocinas que amplificam a inflamação através da ativação dos macrófagos e aumento da atividade citotóxica por células *natural killer* (NK) e linfócitos T. A metformina modula também o balanço ADP/ATP mitocondrial induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mROS) em macrófagos, reduzindo assim o crescimento de patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (KAJIWARA et al., 2017; SINGHAL et al., 2014). De modo semelhante, o efeito da metformina tem sido observado em outras infecções como pelo vírus da hepatite C (HCV), *Helicobacter pylori* e *Pseudomonas aeruginosas*, revelando seu papel benéfico na resposta imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (DEL CAMPO et al., 2018; TSENG, 2018; ABBAS, ELSHERBINI, SHALDAM, 2017).

1.4 DIABETES MELLITUS COMO FATOR DE RISCO PARA INFECÇÕES

Os mecanismos que levam a maiores riscos de infecção em diabéticos não estão totalmente elucidados, no entanto, hiperglicemia e hiperlipidemia em diabéticos não só contribuem para alterações no metabolismo, assim como, a glicose e os ácidos graxos livres podem ativar diretamente a inflamação e a produção da interleucina-1 β (IL-1 β) (KRAKAUER, 2015). As alterações bioquímicas como os níveis glicêmicos e lipídicos são ativadores das cinases como forma de estresse metabólico ocasionando resistência à insulina e disfunção das células β do pâncreas. As cinases de estresse c- Jun N-terminal 1 (JNK1) e inibidor do fator nuclear kappa β (IKK β) induzem citocinas pró- inflamatórias como IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e interleucina-8 (IL-8) induzindo um ambiente de inflamação (SOLINAS, KARIN, 2010).

Pacientes diabéticos tem aumento do risco para o desenvolvimento de infecções em comparação com a população geral. DM associada a um paciente com mais de 70 anos e obesidade mórbida resulta em um risco ainda maior para infecções e pior prognóstico culminando em hospitalização (CAREY, 2018). A maior frequência de infecções em pacientes com DM é causada pelo ambiente hiperglicêmico que favorece modificações na função neutrofílica, indução de apoptose dos polimorfonucleares, inibição do sistema antioxidante (CASQUEIRO, CASQUEIRO, ALVES, 2012; KUWABARA et al., 2018). A diabetes, devido à hiperglicemia no plasma, ativa previamente os leucócitos e tornando-os pró-inflamatórios. Esse estímulo crônico pelo estado metabólico alterado nessa doença pode levar ao aparecimento de leucócitos tolerantes ou anérgicos que não são capazes de responder totalmente a um estímulo infeccioso, permitindo a disseminação do microorganismo (KUWABARA et al., 2018).

Os países tropicais apresentam aumento no número de pessoas com DM2. Por sua vez, DM é um fator de complicação para doenças infecciosas e endêmicas como, por exemplo, tuberculose, melioidose, dengue e outras arboviroses. Todavia, os mecanismos imunopatológicos associados à interação diabetes e infecções tropicais não estão totalmente esclarecidos, até o momento. Os pacientes com diabetes que vivem em países tropicais provavelmente enfrentam riscos aumentados de infecções comuns e associados as falhas dos cuidados a saúde. (CREVEL, VIJVER, MOORE, 2016). Portanto, é relatado um aumento na gravidade das manifestações clínicas em doenças devido a inflamação metabólica crônica decorrente do excesso de glicose e lipídios exógenos na pele em pacientes com diabetes (OUMEISH, 2008).

DM2 gera uma disfunção imunológica que interfere no controle da carga parasitária, conforme sugerido pelo aumento observado do risco de desenvolvimento da malária com a elevação da concentração de glicose (DANQUAH, ADDO, MOCKENHAUPT, 2010). Os pacientes imunocomprometidos com HIV, doenças autoimunes, uso crônico de álcool ou com DM, que é considerada uma causa de imunodeficiência secundária, apresentam maior risco, pior prognóstico e maior taxa de recidiva, também relatado na leishmaniose visceral (LV) (SCHWETZ et al., 2017; FLETCHER, ISSA, LOCKWOOD, 2015). Os fatores imunológicos defeituosos do hospedeiro causados por DM em paciente com leishmaniose cutânea (LC) podem provocar uma resposta diminuída das células T aos antígenos de *Leishmania*, levando a características morfológicas incomuns na lesão cutânea (OLIVIER et al., 2009).

1.5 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças antropozoonóticas predominantes em países tropicais e subtropicais causadas por tripanossomatídeos do gênero *Leishmania spp*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (SWAH, 1994; DESJEUX, 1996; ALVAR et al., 2012). Estes parasitas são transmitidos aos seres humanos através do repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* infectado. As leishmanioses são classificadas em visceral (LV) e cutânea (LC). A LC se apresenta na forma clínica localizada (LCL), forma disseminada (LCD) ou ao acometer mucosas, mucocutânea (LMC). A leishmaniose cutânea antrópica, endêmica no Brasil, é predominantemente urbana e periurbana (CARVALHO, 2012). A leishmaniose tegumentar constituiu um problema de saúde pública em 85 países dos continentes americano, europeu, africano e asiático, com notificação de 0,7 a 1,3 milhões de casos novos por ano (Brasil, 2019). A OMS classifica a leishmaniose tegumentar como uma das seis mais relevantes doenças infecciosas devido ao elevado coeficiente de detecção e a ocorrência de deformidades (ALVAR et al., 2012). No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é mais associada ao complexo *Leishmania (Viannia) braziliensis* e mais frequentemente relacionada à doença cutânea no homem (BRASIL, 2010). Em 2015, foram registrados no Brasil 19.395 casos, sendo a Bahia o terceiro estado em maior número de casos com 2.175 registros de LTA (Brasil, 2017). No ano de 2017, foram computados no Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN) 2.840 casos no Estado da Bahia, classificando-o como segundo em maior número de casos, sendo o Estado do Pará o primeiro do ranking com 3.210 casos confirmados e o Estado do Mato Grosso em terceira colocação com 2.239 casos (SINAN, 2019).

1.5.1 Ciclo parasitário e desenvolvimento da doença cutânea

O parasita tem um ciclo de vida dimórfico, o estímulo extracelular dentro do trato digestivo do vetor promove multiplicação e desenvolvimento em forma promastigota procíclica. As promastigotas diferenciam-se e migram ao probóscide do vetor e podendo ser inoculadas no hospedeiro através do repasto sanguíneo e na forma infectante denominada promastigota metacíclica (SACKS, 2001). Após a inoculação das promastigotas no hospedeiro, ocorre a fagocitose por macrófagos e, no interior do fagolisossomo, as promastigotas transformam-se em formas arredondadas, não flageladas e replicativas denominadas amastigotas. (HERWALDT, 1999; SCOTT, NOVAIS, 2016).

Após a infecção ocorre um eritema cutâneo que se desenvolve no local da picada do flebotomíneo infectado. O eritema evolui-se em uma pápula acneiforme com elevada carga de amastigotas no interior dos vacúolos parasitóforos e moderada inflamação. Com a evolução da carga parasitária desenvolve-se um nódulo e o desenvolvimento posterior de uma úlcera cutânea com bordas elevadas, fundo granuloso e a análise histopatológica revela moderado número de amastigotas e uma acentuada inflamação crônica difusa (SALDANHA et al., 2017). Antes do surgimento da úlcera, ocorre o desenvolvimento frequente de linfadenopatia nos gânglios linfáticos ipsilateral que drenam o local da infecção. Progressivamente durante um período de 2 semanas a 6 meses a lesão ulcerada característica de LCL é formada (REITHINGER et al., 2007). LCL clássica resulta em uma ulceração da pele devido a resposta inflamatória e em alguns casos, a lesão pode curar espontaneamente ou evoluir para outras formas clínicas (COSTA et al., 2009).

1.5.2 Resposta imune na leishmaniose cutânea

As características clínicas da infecção por *Leishmania* dependem da espécie e do grau da imunidade do hospedeiro (CARVALHO, 2012). Após o inóculo do parasito, são recrutados neutrófilos para sítio da infecção, contudo a eliminação do patógeno depende da espécie de *Leishmania* (PETERS et al., 2008). Neutrófilos contribuem para a eliminação de *L. braziliensis* através da interação com macrófagos infectados (NOVAIS et al., 2014.). Contudo, a fagocitose de corpos apoptóticos dos neutrófilos suprimem a atividade microbicida dos macrófagos e células dendríticas e podem contribuir para a proliferação parasitária intracelular (SAVILL et al., 2002; van ZANDBERGEN et al., 2004).

As amastigotas intracelulares se multiplicam dentro dos vacúolos fagolisossomal dos macrófagos. A resposta imune desencadeada por linfócitos *cluster of differentiation* (CD) 4^+ T-*helper* (Th) 1 é associada um perfil de resistência ao avanço da carga parasitária, sendo o perfil de resposta observado experimentalmente por camundongos C57BL/6, como modelo de resistência a infecção por *L. braziliensis*. Linfócitos Th1 secretam IFN- γ e TNF, contribuindo para ativação de macrófagos, indução de ROS, expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e liberação de óxido nítrico (NO) para eliminação das amastigotas intracelulares (MOUGNEAU, BIHL, GLAICHENHAUS, 2011). ROS intracelulares ativam inflamassoma NLRP3 liberando IL-1 mantendo a resposta inflamatória local. A citotoxicidade via linfócito TCD8 $^+$ parece contribuir

com a destruição das células infectadas, contribuindo também com a destruição tecidual e possivelmente permitindo a disseminação parasitária (OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; SCOTT, NOVAIS, 2016).

Camundongos BALB/c apresentam-se como modelo experimental de desenvolvimento da doença e cura espontânea com reposta Th1 de menor intensidade, resposta com susceptibilidade mediada pelas citocinas do perfil Th2 IL-4, IL-5 e IL-10 que modulam o macrófago para uma ativação alternativa, permitindo o crescimento parasitário intracelular e progressão da doença (AWASTHI, MATHUR, SAHA, 2004; SCOTT, NOVAIS, 2016).

1.5.3 Tratamento para leishmaniose

Drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}). Sb^{+5} são leishmanicidas, que interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania* inibindo a glicólise e oxidação dos ácidos graxos resultando na redução de ATP e trifosfato de guanosina (GTP). Como segunda escolha para o tratamento, a anfotericina B e as pentamidinas são utilizadas. Anfotericina B é um antibiótico poliênico, leishmanicida e atua nas formas promastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo*. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática do parasita (BRASIL, 2010). Pentamidinas são diamidinas aromáticas que interferem na síntese de poliaminas e ligam-se ao ácido desoxirribonucleico (BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Há um consenso na literatura sobre a resposta imune inflamatória contra a infecção por *L. braziliensis* a qual contribui para o controle parasitário, mas também importante para a patogênese da formação da úlcera mucocutânea e possivelmente na disseminação do parasito. Controlar o excesso inespecífico da inflamação pode contribuir com a cura, se associado como terapia adjuvante às drogas leishmanicidas. Em áreas endêmicas para *L. braziliensis* observou-se que pacientes com DM tinham úlceras atípicas quando comparadas as lesões de pacientes não diabéticos. As informações que metformina, um hipoglicemiante muito utilizado por pacientes com DM, poderia alterar a ulceração através da modulação das citocinas inflamatórias e controle do infiltrado celular, estimulou o desenho deste estudo tomando estratégias distintas para avaliar os aspectos histopatológicos das biópsias de pacientes com DM e leishmaniose em um estudo de casos tipo caso-controle, assim como, outras abordagens experimentais *in vivo* e *in vitro* em camundongos e macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com metformina para observar o efeito deste hipoglicemiante, sem a participação adicional do glucantime.

A categorização da DM como fator de risco para pior prognóstico das manifestações clínicas de doenças infecciosas cutâneas, revela que mais pesquisas são necessárias para avaliar a susceptibilidade, interferência na resposta imune do hospedeiro e efeito das drogas hipoglicemiantes na formação da resposta imunológica na presença das duas comorbidades. Portanto, infecções cutâneas causadas por patógenos endêmicos no Brasil como *L. braziliensis*, causador da leishmaniose cutânea, representa um modelo de estudo para avaliar associação entre DM, uso de metformina, fármaco de primeira escolha para o tratamento da DM e mais amplamente utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS), e interferências na resposta imune contra o protozoário. Assim como, na elucidação dos mecanismos celulares imunomodulados pelo tratamento com metformina que interferem no recrutamento da resposta celular, nas diferenças fenotípicas do infiltrado inflamatório, regulação de mediadores microbicidas como ROS, que interferem diretamente na carga parasitária do hospedeiro e nas mudanças dos aspectos clínicos das lesões cutâneas.

3 HIPÓTESE

A DM é capaz de modificar a apresentação clínica das úlceras leishmanióticas, assim como, a administração da metformina em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* é capaz de modular a inflamação e diminuir a carga parasitária induzida por *L. braziliensis*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as diferenças clínicas e histopatológicas de pacientes com LC com e sem DM e o efeito imunomodulador da metformina em modelos experimentais de infecção por *L. braziliensis*

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar comparativamente os aspectos clínicos e histopatológicos das úlceras cutâneas leishmanióticas de pacientes sem e com DM;
2. Quantificar amastigotas de *L. braziliensis* e o perfil de infiltrado celular nas lesões cutâneas;
3. Avaliar o efeito da metformina na carga parasitária de camundongos infectados por *L. braziliensis*;
4. Dosar os níveis sérios de citocinas durante o tratamento com metformina e infecção por *L. braziliensis*;
5. Quantificar a taxa de infecção e viabilidade parasitária intracelular em macrófagos Raw 264.7 infectados com *L. braziliensis* e tratados com metformina;
6. Avaliar o efeito da metformina na produção de ROS em macrófagos Raw 264.7 infectados com *L. braziliensis*.

5 METODOLOGIA

5.1 MODELO DE ESTUDO

O presente estudo tem duas estratégias de investigação. A avaliação das biópsias foi realizado um estudo de caso-controle, amostra de conveniência, de caráter investigativo e descritivo de cada caso identificado comparando biópsias de pacientes com LC com e sem DM. E o modelo experimental *in vivo* e *in vitro* para avaliar os efeitos da metformina na infecção por *L. braziliensis* de forma isolada.

5.2 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi executado no Instituto Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz (IGM – Fiocruz BA), Salvador, Bahia, Brasil e no Centro de Saúde de Corte de Pedra, sede do Programa de Controle de Leishmaniose Tegumentar e estando localizado no município Presidente Tancredo Neves, Bahia, Brasil.

5.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Pacientes diagnosticados com LC foram divididas em dois grupos:

Grupo 1 (n=10): pacientes com LC, diagnosticados através dos critérios clínicos, da intradermorreação de Montenegro (IDRM), cultura e/ou reação em cadeia da polimerase positiva para *L. braziliensis*, sem diagnóstico de DM e utilização de hipoglicemiante oral não relatada.

Grupo 2 (n=22): pacientes com LC, diagnosticados através dos critérios supracitados e com diagnóstico de DM e em uso de hipoglicemiante (metformina, glibenclamida, glicazida, glimeperida, insulina).

Os critérios de exclusão estabelecidos para os grupos foram: a) pacientes em tratamento para LC, b) portadores de vírus da imunodeficiência humana (HIV), c) em uso de corticosteroides, d) mulheres grávidas.

O tamanho amostral para esse estudo foi estipulado em coerência com o tempo, os custos, viabilidades dos ensaios laboratoriais e o surgimento de biopsias de pacientes com DM e LC atendidos no ambulatório do estudo. Todos os voluntários que foram elegíveis para participar do estudo foram atendidos consecutivamente no centro de saúde do município de Corte de Pedra.

5.4 OBTENÇÃO DE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Após identificação da população de estudo e concordância em participação no projeto através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou Termo de Assentimento (TA), foi consultado o prontuário, com o objetivo de determinar dados demográficos, histórico clínico, estado de saúde e imunológico, resultados de exames clínicos e laboratoriais, local e tamanho da lesão, estimativa do período da lesão fornecida pelo paciente e uso de medicamentos. Os pacientes de LC foram identificados quanto à presença ou ausência de linfadenopatia, para realização do cálculo do diâmetro da circunferência para medir o tamanho da úlcera e da endureção na IDR, que foi considerada positiva com área de endureção cutânea superior a 5 mm no local de aplicação antigênica intradérmica. Os valores referentes a estes dados foram expressos em mm². Os dados foram armazenados em banco de dados para as análises e correlações propostas e em seguida submetidos as análises estatísticas.

5.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IGM, conforme previsto na Resolução 466/12. A execução do mesmo ocorreu apenas após emissão do parecer final aprovando a pesquisa com CAAE: 70752317.9.0000.0040. Os indivíduos envolvidos foram informados sobre o projeto, sua importância para a comunidade científica e para a saúde pública. Todos os participantes atestaram a sua concordância com o estudo através da assinatura do TCLE e TA. A equipe de execução do presente projeto se comprometeu em efetuar o repasse das informações ao CEP em relação a adequações e suspensões do mesmo, assim como, as respectivas justificativas para a execução das ações descritas.

5.6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

5.6.1 Obtenção das biópsias

As biópsias foram obtidas utilizando um *punch* de 4 mm sob anestesia local. Estes fragmentos foram fixados, em paraformaldeído (PFA) 12% para transporte e processamento no Serviço de Histotecnologia do IGM, onde foram realizados cortes histológicos para coloração com hematoxilina-eosina (H.E) para análise anatomopatológica e secções teciduais para a técnica de imuno-histoquímica (IHQ).

5.6.2 Histopatologia qualitativa

Os aspectos histopatológicos da epiderme e derme foram avaliados em secções histológicas coradas pelo H&E. Os grupos propostos para o estudo foram analisados randomicamente e sem conhecimento prévio para descrição das alterações da epiderme e derme. As biópsias foram classificadas em LC (n=10) provenientes de pacientes com LC sem DM e LC DM (n=8) de pacientes com LC e diagnosticados com DM. A avaliação qualitativa do estudo histopatológico foi efetuada por um médico patologista em conjunto com o autor da dissertação. A área total do tecido foi quantificada pelo *software Image-Pro Plus 3D Suite v. 7.0* (Media Cybernetics) para avaliação do cálculo da porcentagem da área de inflamação.

5.6.3 Imuno-histoquímica

O método IHQ foi realizado para a caracterização de células envolvidas nas detecções da LC humana. No setor de histotecnologia do IGM, os fragmentos foram processados, emblocados em parafina e cortados em micrótomo (Leica Biosystems), em secções de 3 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro com carga positiva (Easy Path, Brasil). Foram analisadas 06 biópsias para cada grupo LC e LC DM, respectivamente.

O protocolo padronizado para IHQ foi realizado para as etapas de desparafinização em duas imersões em xilol por 10 minutos (min), desidratação em duas imersões em álcool absoluto por 10 min e hidratação em uma imersão final em água destilada por 1 minuto. As reações de imunomarcção foram realizadas utilizando o kit *EnVision FLEX Mini Kit, High pH* (Dako Omnis). A etapa de recuperação antigênica foi realizada utilizando *EnVision™ FLEX Target Retrieval*

Solution (Dako Omnis) em banho-maria a 98° C por 20 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada por 1 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em três ciclos de 1 min com *EnVision™ Peroxidase-Blocking Reagent* (Dako). As etapas de lavagens foram realizadas por duas vezes com água destilada por 1 min e três vezes utilizando *EnVision™ FLEX Wash Buffer 1x* (DAKO). Logo após, os cortes de tecido foram submetidos ao bloqueio proteico utilizando *Protein Block serum-free* (Dako Omnis) por 20 min e, em seguida, lavados por uma vez com *EnVision™ FLEX Wash Buffer 1x* (DAKO).

Em seguida, os anticorpos primários (Tabela 1) foram diluídos em *Diluent antibody* (Dako Cytomation, EUA) e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente (T.A.) ou *overnight* a 4° C, conforme recomendações dos fabricantes e protocolos internos do laboratório. A lista de anticorpos e suas especificações seguem na Tabela 1 abaixo. Após a incubação os cortes foram lavados durante cinco ciclos de 1 min com *EnVision™ FLEX Wash Buffer 1x* (DAKO). A reação antígeno-anticorpo específica foi detectada utilizando *EnVision™ FLEX/HRP detection reagent* que consiste numa estrutura base de dextrano à qual foi associado um vasto número de moléculas de peroxidase (HRP) e moléculas de anticorpos secundários incubados por 30 min a T.A. É permitido a ligação de, no máximo, 100 moléculas de HRP e de até 20 moléculas de anticorpo primário por estrutura base. Em seguida, foram feitas três lavagens com *EnVision™ FLEX Wash Buffer 1x*(DAKO). O sistema de substrato foi realizado com 50 µL de *EnVision™ FLEX DAB + Chromogen*, uma solução de diaminobenzidina (DAB) concentrada e contendo peróxido de hidrogénio, sendo diluído em 1000 µL de *EnVision™ FLEX Substrate Buffer*.

O substrato precipita o produto final de cor castanho no local da reação antígeno-anticorpo. Logo após, os cortes foram lavados com água destilada por 1 min. A contração foi realizada utilizando *EnVision™ FLEX Hematoxylin* por 15 min para atribuir coloração nuclear azul clara. Por fim, as lâminas foram lavadas em água destilada por 1 min, submersas em álcool absoluto para desidratação, xilol por duas vezes para clarificação e montadas com 50 µL de Entellan (Merck) e lamínula para conservação do material.

Tabela 1. Lista de Anticorpos Primários

Anticorpo	Reatividade	Marca	Diluição
Monoclonal anti-CD68	Macrófagos CD68+	Dako	1:1000
Monoclonal anti-CD20	Linfócitos B CD20+	Dako	1:400
Monoclonal anti-CD8	Linfócitos T CD8+	Cell Marque	1:400
Monoclonal anti-Granzima B	Células citotóxicas	Cell Marque	1:50
Policlonal anti- <i>Leishmania</i>	Amastigota <i>Leishmania sp.</i>	<i>In house</i> USP - SP	1:1000

5.6.4 Histopatologia quantitativa

As secções coradas pelo H&E foram digitalizadas utilizando o microscópio óptico (Olympus BX51) com sistema de câmara digital acoplado (Olympus Q5) nas objetivas de 10x a 40x. As imagens das secções foram registradas em aumento digital 0,8x, mediante visualização utilizando o *software* OlyVIA 2.7 (Olympus Corporation). A análise semiautomática foi realizada com o auxílio do *software* *Image-Pro Plus 3D Suite* v. 7.0 (Media Cybernetics). As medidas da área total do corte histológico e áreas de infiltrado inflamatório e necrose na derme foram seleccionadas para mensuração, como exemplificado na figura 1 abaixo. A extensão total do fragmento e o somatório das áreas de inflamação foram apresentados em mm². Sendo assim, foi descrito a proporção em percentagem (%) da inflamação por área total do fragmento mensurado.

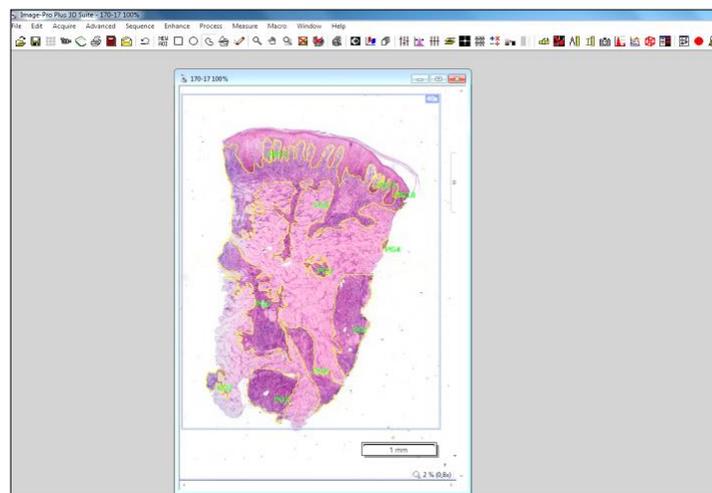


Figura 1. Quantificação semiautomática das áreas de inflamação *in situ* no *software* *Image-Pro Plus 3D Suite* v. 7.0.

5.6.5 Imuno-histoquímica quantitativa

A quantificação dos cortes histológicos foi realizada de forma semiautomática, com auxílio *software Image-Pro Plus 3D Suite v. 7.0* (Media Cybernetics). A seleção e demarcação dos campos para contagem foi feita com o *software OlyVIA 7.0* (Olympus). Foram contabilizadas células imunomarcadas pelos anticorpos anti-CD8, anti-CD20, anti-CD31, anti-CD68 e anti-Granzima B. Para todos os marcadores, exceto anti-CD31, foram selecionados 10 campos aleatórios da região de derme de cada corte, os quais foram demarcados com retângulos feitos no aumento 20x com uso da ferramenta “*Drawing*” do *software OlyVIA*, e posteriormente copiados para o *Image Pro Plus*.

Para a contagem, foram criados filtros no próprio *software (Image Pro Plus)*, que foram comparados à contagem manual de um campo selecionado objetivando uma semelhança de quantificação com variação de até 10%. Dessa forma, os filtros foram ajustados para terem o máximo de semelhança com a contagem manual, sendo salvos posteriormente para utilização na quantificação das lâminas com a intenção de padronizar as análises. A acurácia dos filtros variou de 90 a 95%. Os filtros foram desenvolvidos utilizando como parâmetros o tamanho e a cor das células marcadas. Foram selecionados com a ferramenta conta gotas do *Image Pro Plus* os tons variados de castanho das marcações de cada reação com anticorpo específico e foi utilizado o intervalo do tamanho do perímetro de 50 a 50.000 pixels, no aumento 20x previamente copiado do *OlyVIA* como exemplificado na figura 2 abaixo.

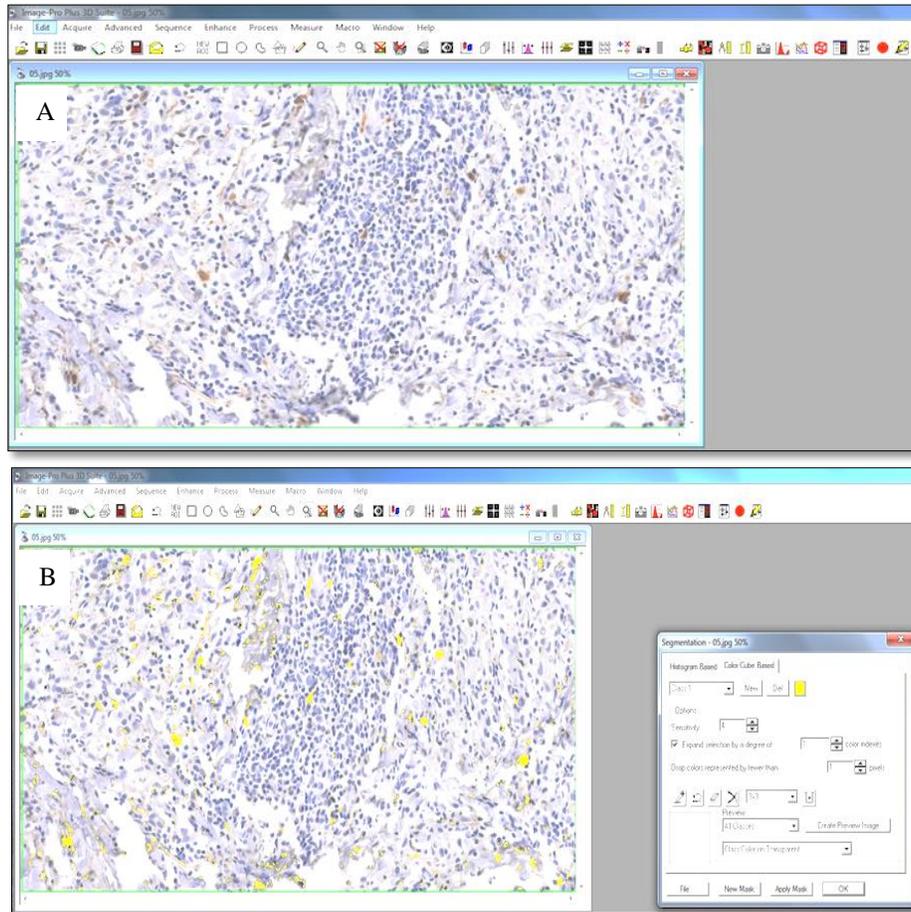


Figura 2. Quantificação semiautomática das imunomarcações no software *Image-Pro Plus 3D Suite* v. 7.0. Visualização das células imunomarcadas (A). Quantificação das células positivas (B).

A quantificação dos vasos marcados pelo anticorpo anti-CD31 foi realizada de forma manual. Para cada corte selecionado, foram contados os vasos totais (contagem total) e vasos de uma área de borda de úlcera e de uma área de borda normal objetivando avaliar a microdensidade vascular *in situ*. As áreas foram demarcadas no *software* OlyVIA com a estratégia de delimitação em retângulos com a ferramenta “*Drawing*”, no aumento digital de 8x.

5.7 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Camundongos isogênicos BALB/c (*Mus musculus*), machos, com 6 semanas de idade, obtidos do biotério do IGM, foram mantidos em condições físicas controladas (temperatura 22 ± 2 °C, umidade 50%), ciclo luz/escuro de 12 horas e divididos em grupos conforme tratamento com metformina e infecção por *L. brazilienses*.

Grupo 1 (n=5): camundongos infectados com *L. braziliensis*;

Grupo 2 (n=5): camundongos tratados com metformina;

Grupo 3 (n=5): camundongos tratados com metformina e infectados com *L. brasilienses*.

O tamanho amostral para esse estudo foi estipulado em coerência com os estudos utilizando um número de 12 animais (VASAMSETTI et al., 2015), 07 animais (KATO et al., 2014), 10 e 15 (FILHO et al., 2008) animais submetidos ao tratamento com metformina. Assim como, o cálculo amostral para o estudo foi realizado atribuindo a fórmula abaixo e para um modelo experimental para testar uma hipótese formal e comparando dados entre dois grupos (DELL, HOLLERAN, RAMAKRISHNAN, 2002). Considerando, o poder para o teste de 90% e nível de significância 0,05, considerando um desvio máximo (s) de 0,2 (20%) e uma diferença esperada entre os grupos (d) de 0,5 (50%):

$$n = 1 + [2 C^* (s/d)^2]$$

$$n = 1 + [2^* 10,51^* (0,2/0,5)^2]$$

$$n = 4,36 \cong 5,0$$

Portanto, levando em consideração estudos anteriores, cálculo amostral, tempo de estudo, os custos e a viabilidade dos ensaios laboratoriais. O número amostral para o estudo consistiu em 05 animais para cada grupo, totalizando 15 animais para o projeto.

5.7.1 Tratamento com Hidrocloridrato de Metformina

Os camundongos dos grupos 2 e 3 receberam um pré-tratamento em uso contínuo com solução oral preparada com hidrocloridrato (Hcl) de metformina (Galena Biopharma, Índia) a uma dose de 500 mg/kg diário em água disponível no bebedouro por 6 semanas (VASAMSETTI et al., 2015; TAJIMA et al., 2013; MATSUI et al., 2010). Após 6 semanas, foram realizadas as infecções nos grupos 1 e 3 e dado a continuidade do tratamento com metformina aos grupos 2 e 3. O peso corporal foi mensurado semanalmente para avaliação do estado físico dos animais. O quantitativo de 5 animais em mesmo ambiente não garante que todos fizeram a ingestão da mesma dose diária de metformina, sendo uma limitação da metodologia escolhida.

5.7.2 Infecção com *L. braziliensis*

Os grupos 1 e 3, após 6 semanas do início do pré-tratamento, foram infectados por via intradérmica na orelha esquerda com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788) pós cultivo em meio Schneider (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco, USA), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100mg/ml) a 23 °C por 5 a 7 dias quando os parasitas atingiram a fase estacionária.

Os camundongos foram infectados, segundo protocolo de procedimento 006/2009 (IGM), na orelha esquerda, utilizando seringas com agulhas de 30G com 10µl de 2×10^5 promastigotas na fase estacionária de *L. braziliensis*.

Após a infecção, a espessura do local da infecção foi medido semanalmente com auxílio de um paquímetro digital. Os dados expressos em milímetros (mm) foram utilizados para confecção da curva de crescimento da lesão cutânea e comparando-se entre os animais.

5.7.3 Dosagem sérica de citocinas

Sangue foi obtido por punção na órbita ocular dos animais, para avaliar o efeito em resposta ao tratamento com metformina e a infecção com *L. braziliensis*. Com esse objetivo, animais foram anestesiados e submetidos a punção no plexo retro-orbital com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. O volume de sangue obtido por capilaridade foi transferido para microtubos identificados e, logo após, foram submetidos a centrifugação a 3000 rpm por 10 min para separação do soro. O soro foi armazenado em freezer a -20 °C para as análises posteriores. As avaliações séricas foram realizadas antes do início do tratamento com metformina (T0), 6 semanas após a administração da droga (T1) e 6 semanas após a infecção com *L. braziliensis* e dia da eutanásia (T3).

O soro foi utilizado para dosagens de citocinas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA). A técnica se baseia no uso de esferas de poliestireno marcadas com anticorpos específicos para captura das citocinas em diferentes graus de fluorescência, conforme especificações do fabricante. A este complexo ligam-se anticorpos anti-citocinas conjugados com fluorocromo ficoeritrina (PE). Em seguida, o ensaio foi adquirido por citometria de fluxo no equipamento BD *FACSArray*TM

Bioanalyzer. Os reagentes utilizados foi o *Mouse Inflammation Kit* (BD, Pharmingen, EUA), para dosagem das citocinas e quimiocinas IL-6, IL-10, CCL2, IFN- γ , TNF, e IL-12p70. O protocolo seguido foi o descrito pelo fabricante.

5.7.4 Quantificação da carga parasitária

A carga parasitária foi determinada nos grupos 1 e 3 pelo ensaio de diluição limitante, como previamente descrito por BELKAID, et al. (1998). Ao final da 6ª semana após a infecção, os animais foram submetidos a eutanásia e foram retirados os linfonodos ipsilateral e orelhas infectadas. Após extração em condições de esterilidade, os órgãos foram macerados em utilizando peneira celular de (tamanho de poro de 40 μ m) com adição de 2 mL de meio RPMI suplementado 10% SFB, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100mg/ml) e posteriormente centrifugados a 1500 rpm, a 4 °C, durante 10 min. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de meio Schneider suplementado e 20 μ L foi diluído de forma seriada em placa de 96 poços com fundo chato, contendo 180 μ L/poço de meio Schneider suplementado. A diluição foi realizada em triplicata e nos poços A ao H, totalizando 8 condições em triplicata. As placas foram seladas e incubadas a 25 °C em estufa incubadora Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D) durante 10 dias. Os cultivos foram observados em microscópio óptico invertido (Nikkon), aumento 20x, com leitura diária a partir do 3º dia de cultivo, para o registro das diluições que continham promastigotas viáveis.

5.7.5 Considerações Éticas

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) do IGM. A execução do mesmo aconteceu apenas após emissão do parecer final aprovando a pesquisa no protocolo 013/2017. Após os experimentos, os camundongos foram submetidos à eutanásia conforme o protocolo de procedimento 002/2009 do IGM com uma dose elevada de anestésico intraperitoneal (cloridrato de quetamina na dose de 50 mg/kg e cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg). Os sinais como ausência de movimento respiratório (apneia), ausência de batimentos cardíacos (assistolia), ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal foram avaliados para confirmação da morte por profissional qualificado para este fim.

5.8 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

5.8.1 Ensaio de viabilidade celular

Macrófagos Raw 264.7 foram adicionados na concentração de 1×10^5 células/poço em placa de 96 poços fundo plano (CELLSTAR®) contendo meio DMEM (Gibco™) suplementado com 10% SFB (Gibco), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100mg/ml) no volume de 200 μ L/poço. O experimento foi realizado em triplicata nas condições de controle positivo (células viáveis em meio DMEM), controle negativo (células cultivadas em PBS 1x), controle branco (meio DMEM) e macrófagos incubados por 24 horas nas concentrações de 2 mM, 2,5 mM, 5mM e 10 mM de metformina a 37° C, 5% CO₂. Após o período de tratamento, foram coletados 20 μ L do volume de cada poço, adicionado 20 μ L do reagente *Alamarblue™ Cell Viability* (ThermoFisher Scientific) e incubado por 4 horas nas condições supracitadas e protegido da luz. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro em 570 nm e 600 nm e seguido o protocolo do fabricante para interpretação dos resultados.

5.8.2 Ensaio de crescimento celular

As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (CELLSTAR®). Cerca de 1×10^5 macrófagos Raw 264.7 em 8 mL de DMEM (Gibco™) suplementado para avaliação da interferência da metformina na proliferação celular. As células foram cultivadas sem metformina, 2mM de metformina, 5 mM de metformina e 10 mM de metformina. Após 96 horas de cultivo a 37° C e 5% CO₂, as células foram retiradas das garrafas por ação enzimática com 2 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) por 1 minuto a 37° C e ação mecânica através da homogeneização com micropipeta de 1000 μ L. Em seguida, o volume aspirado foi inativado com DMEM completo e centrifugado a 1200 rpm, 10 min a 4° C para obtenção do *pellet* de células. As células foram ressuspensas em 1 mL de DMEM suplementado, diluídas na proporção de 1:10 em *Trypan Blue solution* (Sigma-Aldrich) e contadas em câmara de Neubauer para contabilização das células viáveis.

A concentração de escolha para os experimentos posteriores foi de 2 mM de metformina, sendo assim, foi realizado um ensaio em triplicata em placa de 24 poços (CELLSTAR®), com

adição de 1×10^5 macrófagos/poço e confeccionado um cinética do crescimento celular nas condições sem metformina, tratados com 2 mM de metformina e células pré-tratadas por 6 dias com metformina de forma contínua em meio DMEM suplementado. As contagens foram realizadas com 24, 48, 72 e 96 horas pós-cultivo.

5.8.3 Crescimento de *L. braziliensis* com metformina

Para avaliar o efeito direto da metformina no parasito, foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (CELLSTAR®) e incubadas em B.O.D. a 23°C a concentração de 5×10^5 /mL promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* por 5 mL de meio Schneider suplementado, em duplicata, os cultivos nas condições sem metformina, 2 mM de metformina, 5 mM de metformina e 10 mM de metformina foram adicionados ao meio. Diariamente por 6 dias foi contabilizado o crescimento das promastigotas em microscópio óptico E200 (Nikon) retirando-se 10 µL de cada garrafa e transferindo para contagem e avaliação da morfologia das promastigotas em câmara de Neubauer.

5.8.4 Infecção de macrófagos Raw 264.7 com *L. braziliensis*

Macrófagos foram plaqueados na concentração de 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços (CELLSTAR®) em 300 µL de meio DMEM suplementado. O experimento foi executado em duplicata e as condições experimentais abaixo (Tabela 2) em quadruplicata. No poço foram adicionadas lamínulas circulares com 13 mm de circunferência para adesão dos macrófagos e posterior coloração e realização da quantificação da taxa de infecção da triplicata. As células das condições CI, CIII, CIV e CV foram pré-tratadas com Hcl metformina por 5 dias antes do desafio e dado continuidade durante a infecção. A infecção e desafios nas condições tabeladas abaixo foram realizadas durante 4 horas a 37° C e 5% CO₂.

Tabela 2. Condições experimentais de desafios e tratamento de macrófagos

Macrófagos Raw 264.7 10⁵ células/poço	Dose de tratamento Hcl Metformina	Infecção <i>L. braziliensis</i> parasitos/macrófago	LPS
Controle negativo (CN)	-	-	
Controle positivo (CP)	-	-	100 ng/mL
Condição I (C I)	2mM		
Condição II (C II)	-	10:1	
Condição III (CIII)	2mM	10:1	
Condição IV (CIV)	2mM	-	100 ng/mL
Condição V (CV)	2mM	10:1	100 ng/mL

5.8.5 Taxa de infecção e quantificação de parasitos intracelulares

As lamínulas dos experimentos de infecção de macrófagos Raw 264.7 com *L. braziliensis* foram lavadas com 1mL PBS 1x por 3 vezes e em seguida, foram submetidas a coloração panótico rápido (Laborclin). 300 µL do panótico rápido número 1 foi adicionado nos poços e armazenado por 10 min na geladeira de 2 a 8° C, 300 µL panótico número 2 por 1 minuto em T.A., 300 µL panótico número 3 por 10 segundos em T.A. e, por fim, lavadas com 1mL de água destilada por 3 vezes, com auxílio de uma micropipeta de 1000 µL para todo o processo. As lamínulas foram montadas com Entellan (Sigma-aldrich) sob lâminas de vidro 26x76 mm para posterior avaliação no microscópio óptico (Nikon) no aumento de 100x. Foram contadas a quantidade de células infectadas (presença de amastigota no meio intracelular) em 100 células contadas, com os valores expressos em porcentagem, assim como, contabilizado o número de amastigotas na porcentagem de células infectadas. As lamínulas foram digitalizadas em microscópio óptico (Olympus BX51) com sistema de câmera digital acoplado (Olympus Q5) nas objetivas de 40X para seleção de células representativas da taxa de internalização das promastigotas.

5.8.6 Avaliação da viabilidade parasitária intracelular

Em placa de 96 poços (CELLSTAR®) foram plaqueados 5×10^4 /poço macrófagos Raw 264.7 em 200 µL de meio DMEM suplementado nas condições C II e CIII descritas na tabela 2. Após 4 horas de infecção, os poços foram lavados com 300 µL solução fisiológica 0,9% NaCl a 37° C por 3 vezes para retirar as promastigotas que não foram internalizadas. Em seguida, foi adicionado 200 µL/poço de meio Schneider suplementado, a placa foi tampada e vedada, como

também, alocada na incubadora B.O.D a 23° C por 96 horas. No período de 48 e 96 horas foi retirado 10 µL de cada poço para prosseguir com a contagem em câmara de Neubauer das promastigotas que foram provenientes do meio intracelular.

5.8.7 Dosagem de ROS no sobrenadante da cultura

Os sobrenadantes dos cultivos realizados nos experimentos de infecção de macrófagos Raw 264.7 com *L. braziliensis* e nas condições descritas na tabela 2, com exceção da condição CV, foram distribuídas em triplicata em placa de 96 poços com fundo plano (Greiner Bio-One). Para mensurar ROS no sobrenadante foi utilizado uma metodologia alternativa com o *Griess reagent* (Sigma-Aldrich). O teste *Griess assay* permite através de uma reação colorimétrica mensurar a produção de óxido nítrico (ON) com a dosagem de nitrito e nitrato que foi convertido em nitrito pela técnica de espectrofotometria. Contudo, foram realizadas duas placas, sendo uma placa sem hidroxilamina (NH₂OH) e outra placa com NH₂OH nos poços nas condições experimentais descritas na Tabela 2. Os valores em densidade óptica e transformados em concentração (µM) da placa 1 foi subtraído do valor mensurado na placa 2, permitindo assim, uma avaliação indireta de ROS no sobrenadante do cultivo, devido a inibição da reação de nitrificação pela presença do substrato intermediário NH₂OH.

5.8.8 Quantificação de metabólitos derivados do oxigênio intracelular

As células cultivadas no experimento de infecção de macrófagos Raw 264.7 com *L. braziliensis* foram submetidas ao ensaio *CellROX Oxidative Stress Reagent* (ThermoFisher Scientific). Os poços com os macrófagos foram lavados por 3 vezes com PBS 1x, acrescentado 300µL/poço de meio DMEM suplementado e reagente *CellROX*, encubadas no escuro a 37° C, 5% CO₂ por 30 min. Em seguida, os poços foram lavados por 3 vezes com PBS 1x, as lamínulas com as células foram fixadas com PFA 3,7% por 15 min e montadas sob lâmina de vidro 23x76 mm com 5µL de 4',6-diamino-2-fenil-indol (DAPI) em *antifade mounting medium*. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência (Leica) na faixa de 485/520 nm. Foram capturadas imagens contendo 8 células para quantificação do coeficiente de fluorescência total corrigido (CTCF) no *software* OlyVIA 7.0 (Olympus). A estratégia de análise consiste na mensuração da fluorescência na área ocupada por uma célula, cálculo da média das 8

células analisadas e a subtração da média do *background* da fluorescência de 5 espaços extracelulares.

5.9 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram avaliados através do *software* GraphPad Prism v.7 (GraphPad Software, San Diego, CA). A avaliação da normalidade dos dados foi executada levando em consideração o tamanho amostral e aplicando em concordância os testes D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk para classificação da distribuição das amostras como paramétricas e não paramétricas. Uma vez classificadas como não paramétricas, para comparações entre grupos, o teste de Mann-Witney ou Kruskal-Wallis foi utilizado para dois ou mais de dois grupos, respectivamente. Como também, foi aplicado o Teste T ou *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) para amostras paramétricas. As análises de correlação entre variáveis foram executadas utilizando o teste de Spearman. O comparativo entre dois grupos para avaliação da presença e ausência das alterações epiteliais foi efetuado utilizando o teste exato de Fisher. O nível de significância considerado foi de 95% ($\alpha=0,05$), considerando o valor de p significativo menor ou igual a 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISES DOS ASPECTOS CLÍNICOS DOS PACIENTES E AVALIAÇÕES *IN SITU*

6.1.1 Avaliação demográfica e clínica dos pacientes com LC e DM

Os pacientes foram pareados para execução do estudo de casos pela idade e gênero com objetivo de minimizar viés de análises, contudo, em decorrência da amostra de conveniência e conforme a demanda espontânea de pacientes com LC diabéticos atendidos na unidade de saúde não foi possível estabelecer uma população sem diferença estatística em relação a idade. A população foi alocada em dois grupos sendo explanados na Tabela 3 abaixo, sendo os grupos: portadores de LC e pacientes com LC e DM (LC DM).

A escolha dos pacientes levou em consideração a positividade dos métodos diagnósticos explicitados nos critérios de inclusão do estudo, sendo assim, a frequência de positivo foi de 100% para a IDRM. A consulta aos prontuários e avaliações clínicas complementares não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes para as avaliações clínicas tabuladas abaixo (Tabela 3). Os pacientes do estudo possuem tratamento para DM com uma única droga ou com terapia associada com os fármacos listados na tabela 3.

Tabela 3. Variáveis demográficas e clínicas dos voluntários

Variável	LC (n=10)	LC DM (n=22)	p valor
Idade, anos	26 (14-45)	47 (22-75)	0,0001^a
Sexo, n (%)			
Masculino	4 (40)	6 (27,3)	0,47 ^b
Feminino	6 (60)	16 (72,7)	
IDRM, n (%)			
Pos	10 (100)	11 (100)	0,9 ^d
Neg	0 (0)	0 (0)	
IDRM, área (mm ²)	181 (100-360)	181 (36-960)	0,91 ^c
Tamanho da lesão (mm ²)	200 (25-840)	258 (35-3885)	0,44 ^c
Tempo de cura	130 (30-240)	93,5 (20-150)	0,28 ^{ce}
Tempo de evolução	42.5 (30-60)	30 (20-120)	0,15 ^c
Número de lesões	1 (1-4)	1 (1-4)	0,92 ^c
Tratamento DM, n (%)			
Glibenclamida	-	8 (36,4)	
Glicazida	-	5 (22,7)	
Glimepirida	-	1 (4,5)	
Insulina	-	6 (22,3)	
Metformina	-	11 (50)	
Tratamento LC, n (%)			
Glucantime	10 (100)	22 (100)	
Falha	6 (60)	11 (52,4)	0,9 ^{df}
Sucesso	4 (40)	10 (47,6)	

LC: leishmaniose cutânea; DM: diabetes mellitus; IDRM: intradermorreação de Montenegro; Pos: positivo; Neg: negativo.

^a Teste T

^b Teste *Chi-square*

^c Teste de Mann-Whitney

^d Teste Exato de Fisher

^e Análise com 20 pacientes

^f Análise com 21 pacientes

6.1.2 Pacientes diabéticos apresentam leishmaniose cutânea com úlceras atípicas

Os pacientes foram avaliados em relação ao tamanho das úlceras cutâneas e suas características dermatológicas para identificar se as condições metabólicas da diabetes ou o tratamento hipoglicemiante interferem na manifestação dermatopatológicas da leishmaniose. Apesar de não ter havido diferença estatística, os pacientes diabéticos apresentam área de ulceração

cutânea com mediana e valor mínimo e máximo de 258 (35 - 3.885) mm² em comparação com os grupos LC que foi de 200 (25 - 840) mm² (Figura 3A).

As evidências dermatológicas direcionaram o estudo para uma investigação da resposta imune *in situ* nos fragmentos de pele objetivando caracterizar as diferenças no infiltrado celular, alterações epiteliais e mensuração da carga parasitária.

Os indivíduos do grupo LC apresentaram úlcera com bordas elevadas e delimitadas e fundo granuloso, característica de LCL clássica. O grupo LC DM tem ulcerações que não diferem em extensão, mas possuem menor profundidade e e bordas irregulares, assim como, 06 pacientes tem úlceras atípicas, sem bordas elevadas, profundidade reduzida e com crosta mais proeminente (Figura 3B).

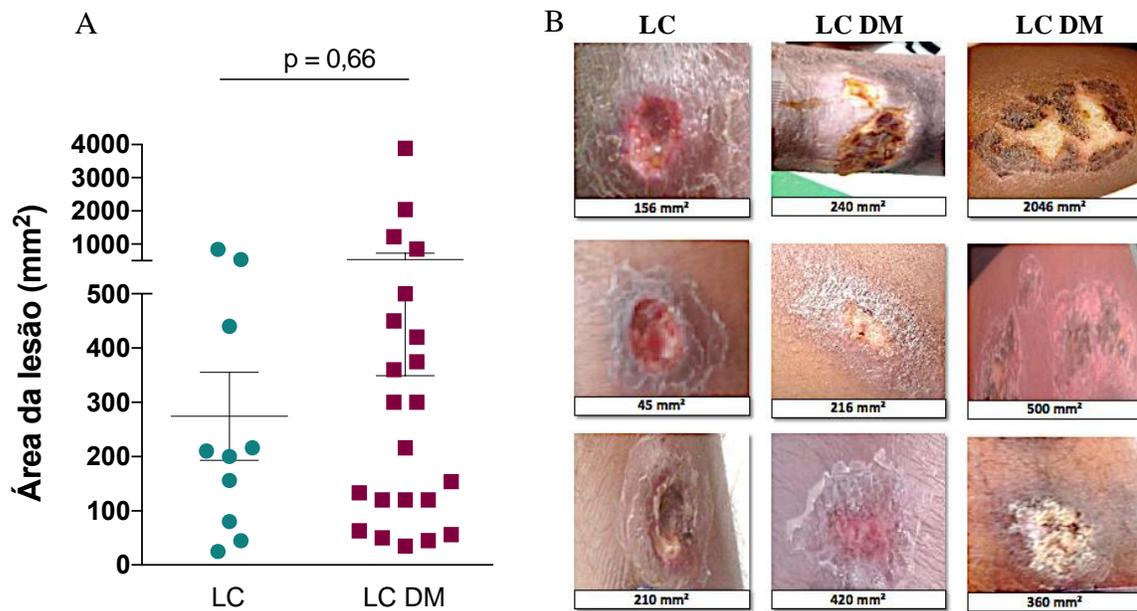


Figura 3. Úlceras cutâneas de pacientes com LC. Avaliação comparativa entre os grupos LC (n=10) e LC DM (n=22) das áreas ulceradas. Teste Mann-Whitney ($p = 0,66$) (A). Imagens das úlceras antes da biópsia de pele (B).

6.1.3 Hiperglicemia não interfere no tamanho da úlcera leishmaniótica

Os resultados laboratoriais nesses pacientes foram analisados em relação aos níveis séricos de glicose em jejum e/ou pós-prandial. A glicemia nos pacientes do grupo LC DM foi superior a 100 mg/dL (Figura 4A). As avaliações entre os grupos mostraram diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0,0001$), comparando a glicose sérica com pacientes LC sem DM.

Com objetivo de verificar se há associação entre níveis glicêmicos e tamanho das úlceras, os dados foram analisados pelas correlações de Spearman. Para o grupo LC DM os níveis glicêmicos apresentaram correlação negativa com tamanho de úlcera ($p = 0,03$ e $r = -0,45$) e pacientes do grupo LC não tiveram correlação com tamanho da lesão, devido a homogeneidade dos níveis glicêmicos e dimensões da úlcera no grupo ($p = 0,16$; $r = 0,59$) (Figura 4B).

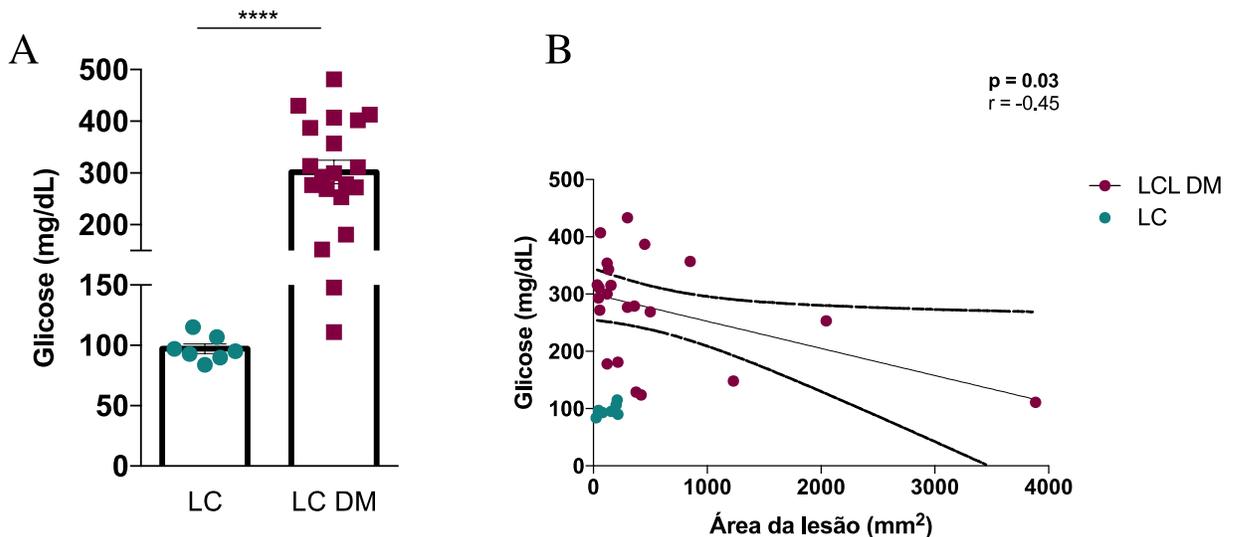


Figura 4. Comparação dos níveis de glicose sérica jejum e/ou pós-prandial nos pacientes com leishmaniose. Glicose sérica nos grupos LC (n=07) e LC DM (n=20) (A). Correlação de Spearman entre nível glicêmico e tamanho da úlcera no grupo LC e LC DM (B). **** teste Mann-Whitney $p < 0,0001$; Análise com n=07 pacientes no grupo LC.

6.1.4 Pacientes com LC diabéticos diferem nas alterações histológicas em comparação com pacientes com LC sem DM na frequência de necrose

Após análise clínica dos pacientes com LC e DM, foram selecionados os pacientes que tinham sido biopsiados previamente. Nesses casos foram realizadas análises anatomopatológicas

de biópsias de pacientes LC (n=10) com seus dados clínicos descritos na tabela 3 e biópsias de pacientes LC associada a DM (n = 8) selecionadas da população caracterizada clinicamente na tabela 3. Os pacientes biopsiados no grupo LC DM possuem tempo de evolução em dias com mediana 32,5 (20-90), tempo de cura 115 (40-150) dias e área da lesão de 320 mm² (35-2046). Essa análise, mostrou que biópsias de pacientes com LC e DM tinham menos necrose, só 50% das biópsias tinham algum foco de necrose (p = 0,02). Já em pacientes com LC 100% dos fragmentos tinham focos de necrose (Tabela 4). No entanto, o quantitativo de biópsias com a presença de amastigotas no tecido em ambos os grupos foram semelhantes.

Tabela 4. Análises anatomopatológicas dos pacientes LC e LC DM

Análise Anatomopatológica	LC (n=10) n (%)	LC DM (n=8) n (%)	p valor^a
Análise da epiderme			
Acantose	6 (60)	6 (75)	0.60
Crosta fibrinoleucocitária	5 (50)	2 (25)	0.36
Espongiose	3 (30)	1 (12.5)	0.58
Exocitose	2 (20)	1(12.5)	0.9
Hiperceratose	9 (90)	5 (62.5)	0.27
Hiperplasia	4 (40) ^b	5 (62.5) ^c	0.9
Análise da derme			
Inflamação difusa	10 (100)	7 (87.5)	0.44
Infiltrado neutrofílico	0 (0)	2 (25)	0.18
Focos de necrose	10 (100)	4 (50)	0.02
Fibrose	2 (20)	3 (37.5)	0.60
Vasculite	0 (0)	2 (25)	0.18
Granuloma	1 (10)	0 (0)	0.99
Amastigotas de <i>Leishmania sp.</i>	10 (100)	6 (75)	0.18

^a. Teste exato de Fisher

^b. Análise com 5 pacientes

^c. Análise com 6 pacientes

As alterações teciduais foram analisadas seguindo a divisão em epiderme e derme. A epiderme foi analisada quanto a presença do espessamento da camada (acantose), presença de crosta com infiltrado com polimorfonucleares (PMN) e debris celulares na superfície da úlcera (crosta fibrinoleucocitária), edema intercelular no estrato espinhoso (espongiose), invasão de

células inflamatórias na epiderme (exocitose), aumento da camada córnea (hiperceratose) e presença de hiperplasia. Portanto a epiderme em ambos os grupos foi hiperkeratótica, espongiótica e acantótica.

Após as avaliações da epiderme, as camadas de derme e hipoderme foram também analisadas. O estudo anatomopatológico evidenciou alterações sem diferenças estatísticas significantes entre os grupos, exceto a frequência de necrose que foi menor no grupo LC DM (50%) que pacientes sem DM (100%). A presença de inflamação difusa, infiltração neutrofilica, crosta fibrinoleucocitária foram observadas em 25% das biópsias do grupo LC DM. Assim como, presença de um infiltrado inflamatório crônico histiolinfoplasmocitário. Fibrose foi mais evidente na hipoderme em associação com tecido adiposo. Só foi observado em 10% das biópsias do grupo LC uma inflamação crônica do tipo granulomatosa, com presença de múltiplos granulomas, presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos epitelioides. Em 25% das biópsias de pacientes diabéticos foram observadas alterações vasculares com proliferação fibromuscular e endotelial sugerindo um quadro de arteriosclerose, contudo, em nenhuma biópsia do grupo de pacientes LC sem DM foram observadas essas alterações vasculares. Em 100% dos fragmentos de pele do grupo LC e 75% do grupo LC DM detectou-se amastigotas de *Leishmania spp.*

A análise quantitativa da extensão da inflamação através da histomorfometria não evidenciou diferenças estatísticas ($p = 0,27$), embora tenha-se observado que a extensão da inflamação nas biópsias das bordas de úlcera de LC em pacientes diabéticos é menor 53,16 % (34,17 – 85,58 %) (Figura 5) em comparação aos não diabéticos 67,3% (40,9 - 80,27 %).

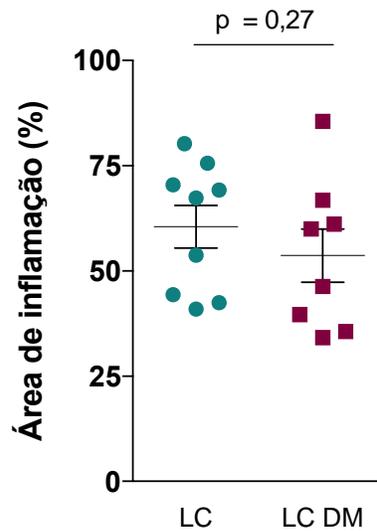


Figura 5. Extensão do infiltrado inflamatório relativo à área total do fragmento cutâneo. Análise com biópsias no grupo LC (n=09) e no grupo LC DM (n=08). Teste Mann-Whitney ($p = 0,31$).

6.1.5 Avaliação imunofenotípica do infiltrado inflamatório *in situ* revela menor frequência de células CD8⁺

As avaliações foram realizadas através de imunomarcações pela reação de IHQ (Figura 8) e foram selecionadas 06 biópsias para cada grupo LC e LC DM, conforme a disponibilidade de tecido parafinado para processamento de todos os marcadores selecionados. Os dados mostram que não há diferença na frequência de macrófagos CD68⁺ (Figura 6 A), linfócitos CD20⁺ (Figura 6 B) e células granzima B⁺ (Figura 6 D). Nas biópsias de pacientes com LC foram detectadas 2.489 variando de 1.220 a 3.194 células CD8⁺ ($p = 0,02$). Já nas biópsias de pacientes com DM foram quantificadas 715 variando de 359 a 1309 células CD8⁺ (Figura 6 C). Dados apresentados em mediana e intervalo interquartil (IQ). Foram realizadas as reações para os marcadores CD20, granzima B e CD31 no grupo LC DM em 05 biópsias, devido a disponibilidade de tecido parafinado necessário para os cortes histológicos. 04 biópsias do grupo LC DM foram classificadas como lesões clínicas atípicas e 02 biópsias como lesões típicas de leishmaniose.

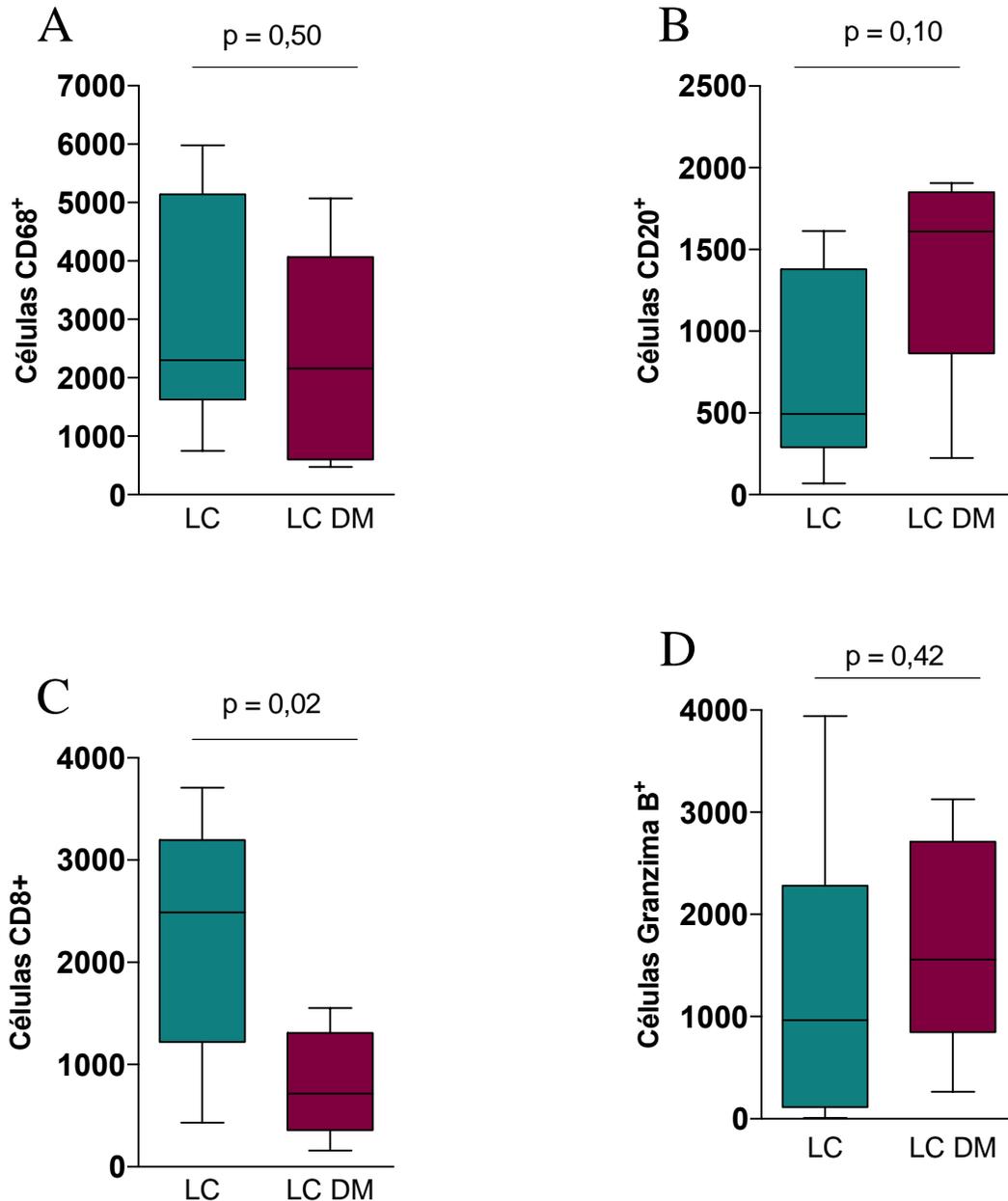


Figura 6. Avaliação imunofenotípica do infiltrado inflamatório *in situ*. Quantitativo de células imunomarcadas por IHQ para CD68⁺ (A), CD20⁺ (B), CD8⁺ (C) e Granzima B⁺ (D). Foram analisadas biópsias no grupo LC DM (n=04) provenientes de úlceras atípicas e biópsias como úlceras típicas de leishmaniose (n=02). As análises para os marcadores CD20 e granzima B no grupo LC DM foram realizadas em n=05 biópsias, sendo biópsias de úlceras atípicas (n=04) e biópsia de úlcera típica de leishmaniose (n=01). ns: não significante; teste Mann-Whitney ($p > 0,05$). *Teste Mann-whitney $p = 0,02$.

6.1.6 Correlação negativa entre células Granzima B⁺ e área de ulceração e positiva entre macrófagos CD68⁺ nas biópsias de pacientes diabéticos com LC.

As biópsias de pacientes imunomarcadas para células CD68⁺ mostram que quanto maior o infiltrado de macrófagos, maior a extensão da úlcera cutânea ($r = 0,73$) (Figura 7A). Nesses casos analisados as quantidades de células CD8⁺ e CD20⁺ não mostraram correlação com o tamanho das úlceras ($r = -0,45$ e $r = -0,48$, respectivamente) (Figura 7 B e C). A correlação negativa entre a quantidade de células granzima B⁺ e a extensão da úlcera (Figura 7D) sugere que o crescimento da lesão, nos casos de LC com DM, não é dependente de granzima B⁺ ($r = -0,84$; $p = 0,03$). As análises estatísticas de correlação de Serman possuem valor de p e r referentes ao grupo LC DM.

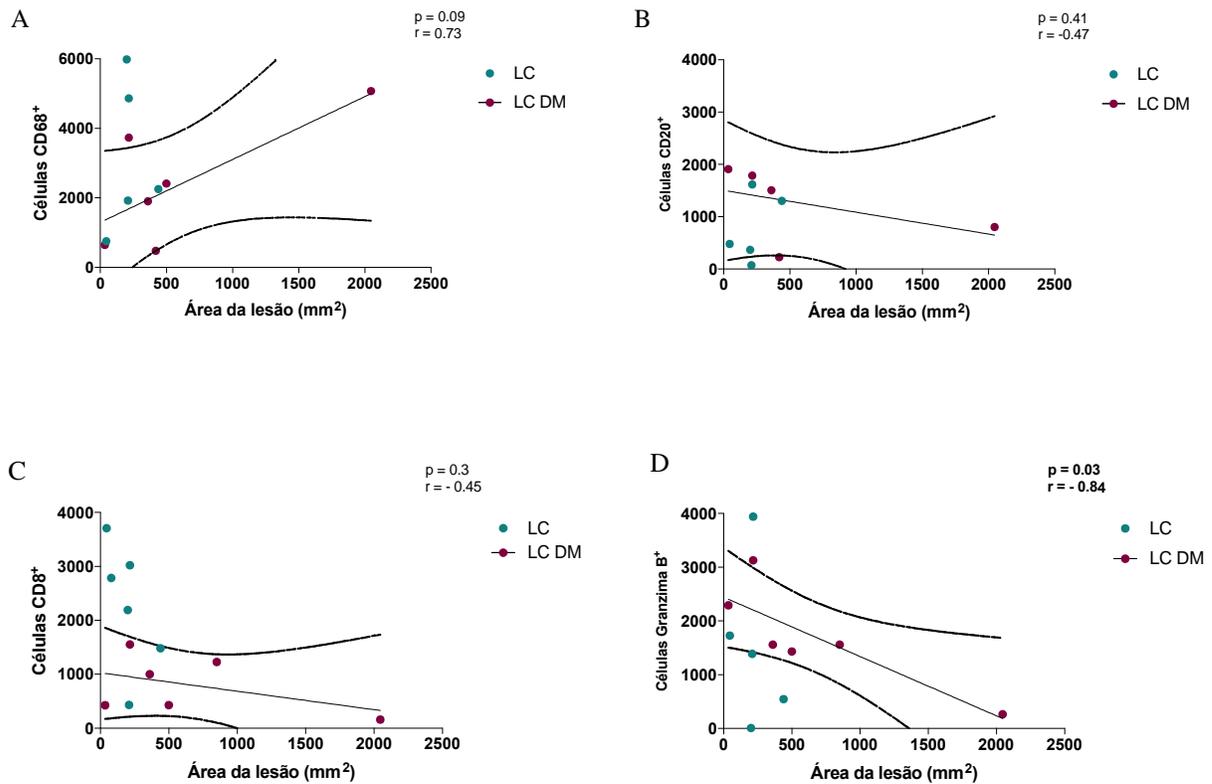


Figura 7. Correlação entre células do infiltrado inflamatório das lesões e a extensão da úlcera. Correlações de Serman para células CD68⁺ (A), CD20⁺ (B), CD8⁺ (C) e granzima B⁺ (D). Foram analisadas biópsias no grupo LC DM provenientes de úlceras atípicas (n=04) e biópsias como úlceras típicas de leishmaniose (n=02). As análises para os marcadores CD20 e granzima B no grupo LC DM foram realizadas em n=05 biópsias, sendo biópsias de úlceras atípicas (n=04) e biópsia de úlcera típica de leishmaniose (n=01).

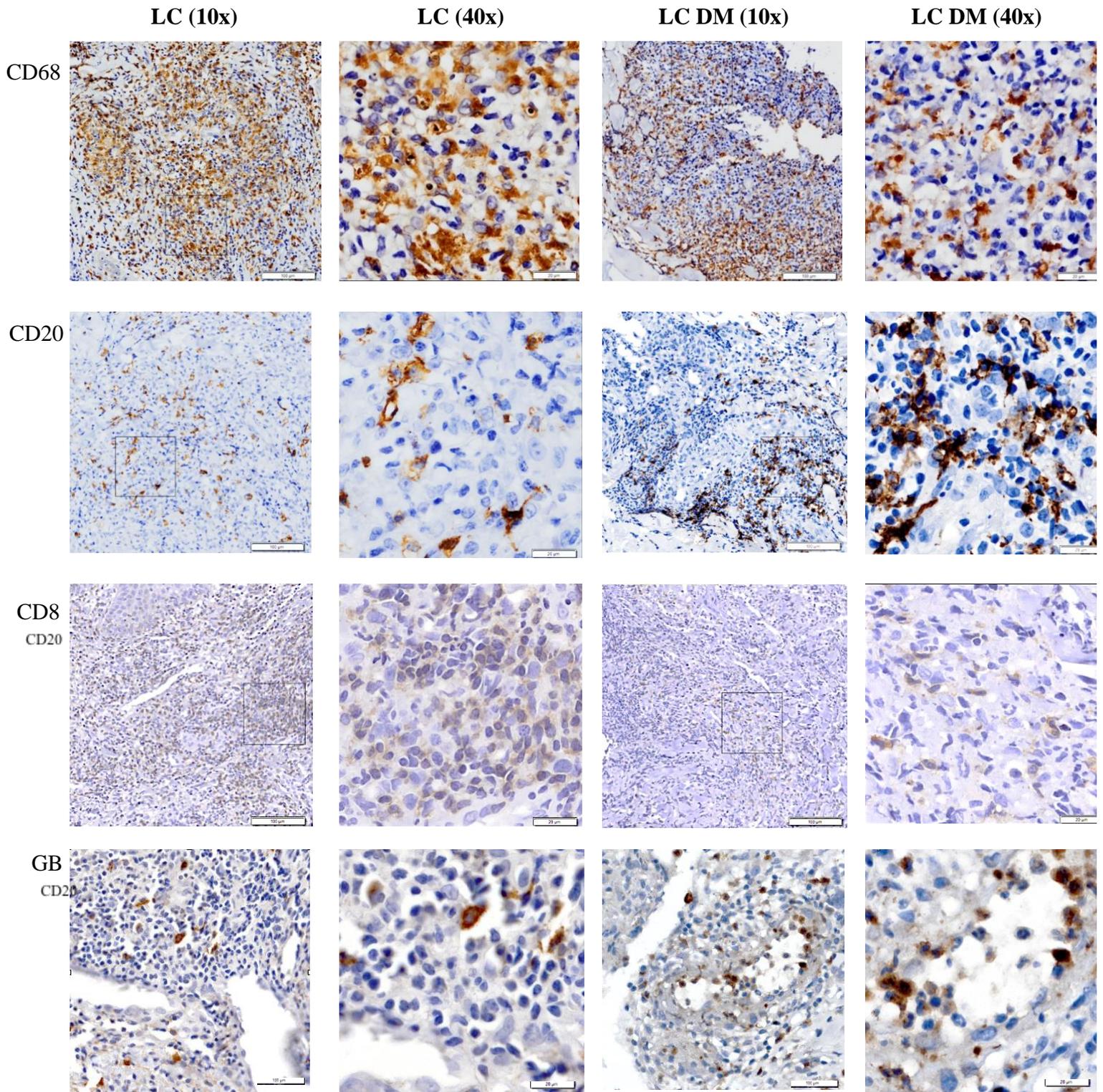


Figura 8. IHQ para o estudo imunofenotípico *in situ*. 10x e 40x: aumento digital no *software* OlyVIA.

6.1.7 Úlceras de pacientes com DM e LC não diferem na microdensidade vascular de pacientes sem DM na LC

As alterações dérmicas apontam para 25% dos pacientes diabéticos avaliados com arteriolosclerose. Com intuito de avaliar a vascularização da lesão, foram imunomarcados e quantificado vasos CD31⁺ por IHQ (Figura 9 C) com objetivo de mensurar a frequência de vasos na extensão total do fragmento (Figura 9 A), na região de borda normal do tecido e borda de úlcera, tendo em vista a coleta do material de pele na periferia da lesão (Figura 9 B). Os dados encontrados não mostram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$), contudo, há uma tendência de menor frequência de vasos nos pacientes diabéticos (LC DM) quando comparados ao grupo LC.

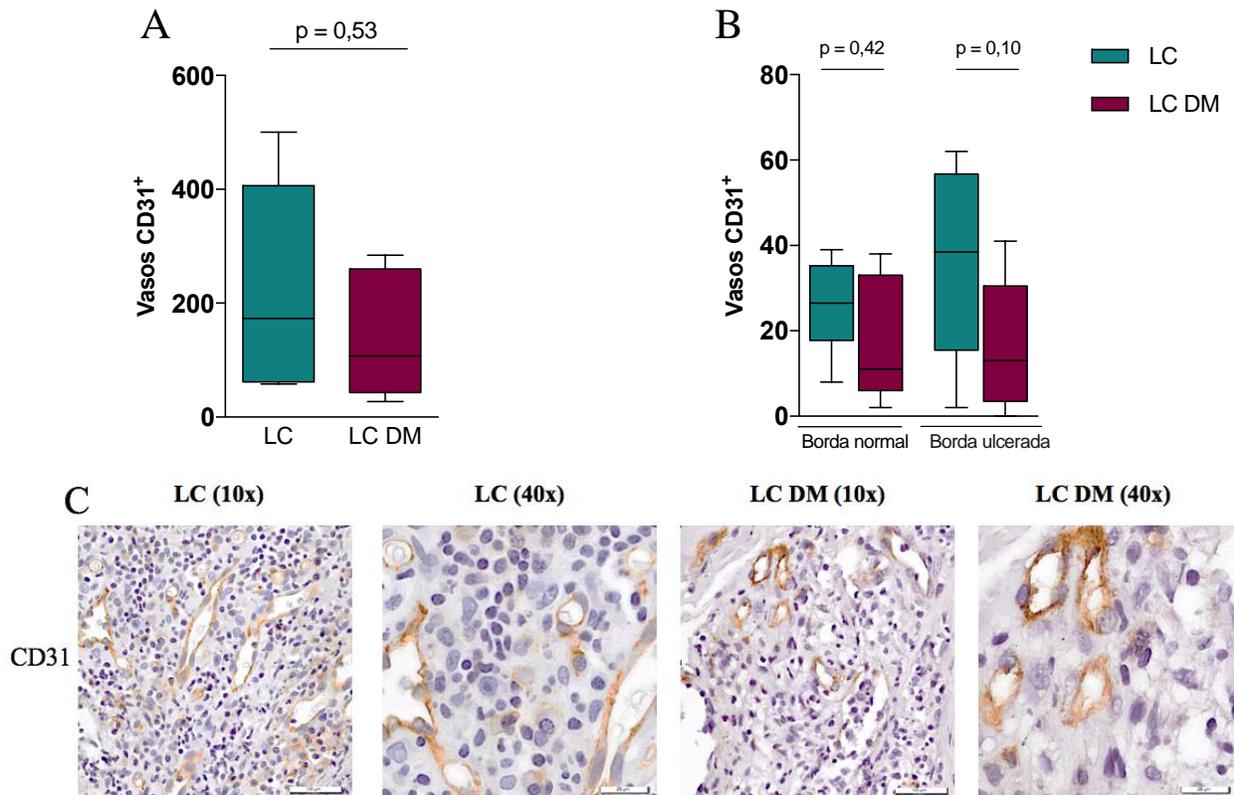


Figura 9. Quantificação de vasos CD31⁺ *in situ*. Microdensidade total na extensão do tecido (A) e avaliação em borda normal e borda ulcerada (B). Comparativo entre os grupos LC e LC DM. As análises foram realizadas no grupo LC DM em n=05 biópsias, sendo biópsias de úlceras atípicas (n=04) e biópsia de úlcera típica de leishmaniose (n=01). Fotomicrografias representativas das imunomarcações para avaliação da microdensidade vascular (C). ns: não significante; teste Mann-Whitney ($p > 0,05$). 10x e 40: aumento digital no software OlyVIA.

6.1.8 DM não interferiu na carga parasitária dos pacientes com LC

Os cortes histológicos foram imunomarcados com anticorpo *anti-Leishmania* objetivando avaliar a carga parasitária entre os grupos (Figura 10 C). Os resultados evidenciam que ambos os grupos tem quantidade semelhante de parasitos. LC (n = 06) e LC DM (n = 06) possuem carga parasitária semelhante ($p > 0,05$) (Figura 10 A). Os grupos LC (n = 06) e LC DM (n = 06) mostram correlação positiva entre quantitativo de amastigotas e área lesionada ($r = 0,83$) (Figura 10 B).

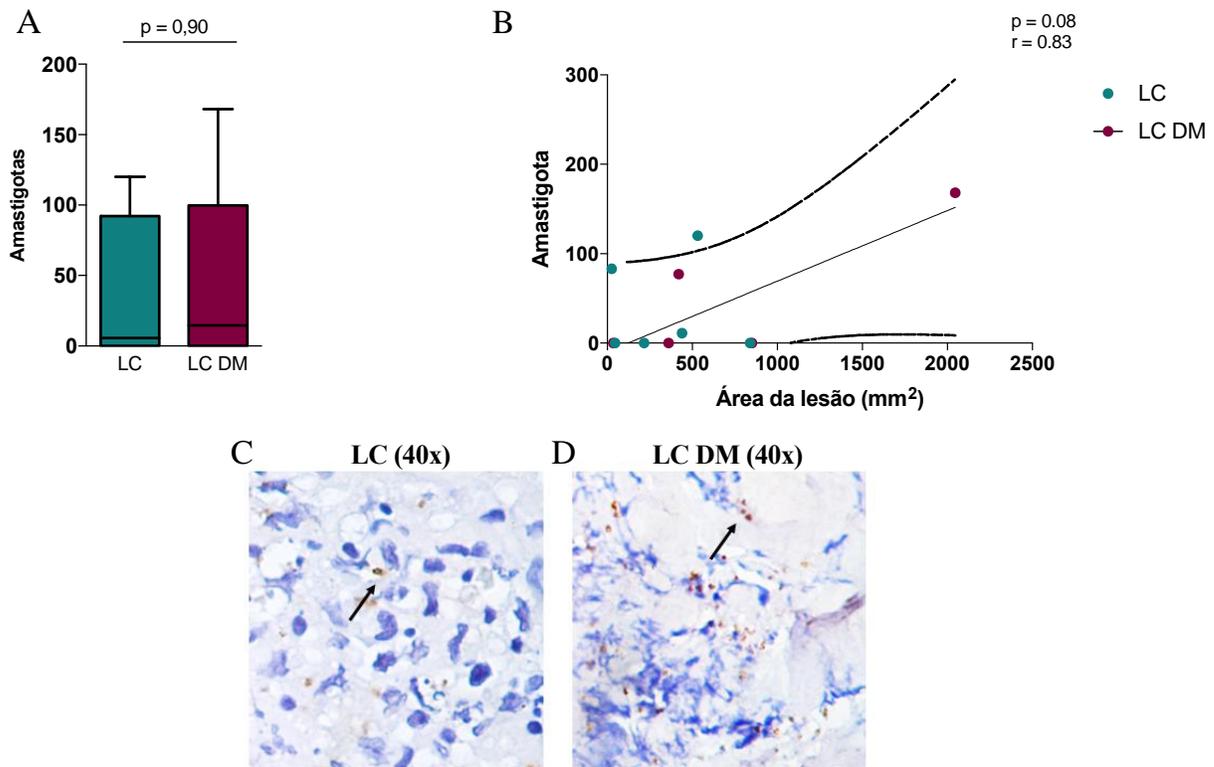


Figura 10. Avaliação do número de amastigotas *in situ*. Comparando-se os grupos LC e LC DM (A). Correlação de Spearman entre a área da lesão e o quantitativo de amastigotas (B). Fotomicrografias representativas das imunomarcações para amastigotas de *Leishmania spp.* em biópsia do grupo LC (C) e grupo LC DM (D). Foram analisadas biópsias no grupo LC DM provenientes de úlceras atípicas (n=04) e biópsias como úlceras típicas de leishmaniose (n=02). ns: não significativo; teste Mann-Whitney ($p > 0,05$). 40x: aumento digital no *software* OlyVIA.

6.2 RESULTADOS DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *L. BRAZILIENSIS* *IN VIVO*

6.2.1 Avaliação do peso corporal dos animais como monitoramento físico

Diante do efeito imunomodulador ocasionado pelos fármacos hipoglicemiantes utilizados no tratamento para DM e a metformina (MET) o fármaco mais amplamente prescrito, foi realizado um modelo experimental de infecção com *L. braziliensis* (L.b) para avaliar os efeitos isolados do fármaco na patogênese da LC. Para monitorar o estado dos animais após tratamento com a MET, três grupos de camundongos BALB/c foram comparados: G1 (infectados com L.b Ba788); G2 (apenas tratados com MET e G3 (tratados com MET e infectados). Camundongos foram pré-tratados por 6 semanas com Hcl metformina por via oral (*ad libitum*). Para avaliar o efeito na nutrição, avaliamos o peso em gramas (g). Antes do tratamento (T0), os animais G1 apresentaram média do peso de 28,5g ($\pm 1,6$), 30,8g ($\pm 1,4$) em G2 e 29,6g ($\pm 1,5$) para G3. Após 6 semanas de tratamento e no dia da infecção com L.b (T1), os grupos 2 e 3 tiveram uma diferença de 9,1% (29,9g ($\pm 1,5$) e 29,9g ($\pm 1,5$), respectivamente, quando comparados com o grupo 1 com 32,9g ($\pm 1,4$). Na 12ª semana, ou seja, 6 semanas após infecção para G1 e G3 e 12 semanas de tratamento para G2 e 3 (T2), os animais infectados e tratados apresentaram média de 31,5g ($\pm 1,8$), diferença de 6,2% em comparação com o grupo 1 e 7,3% com grupo 2 (Figura 11).

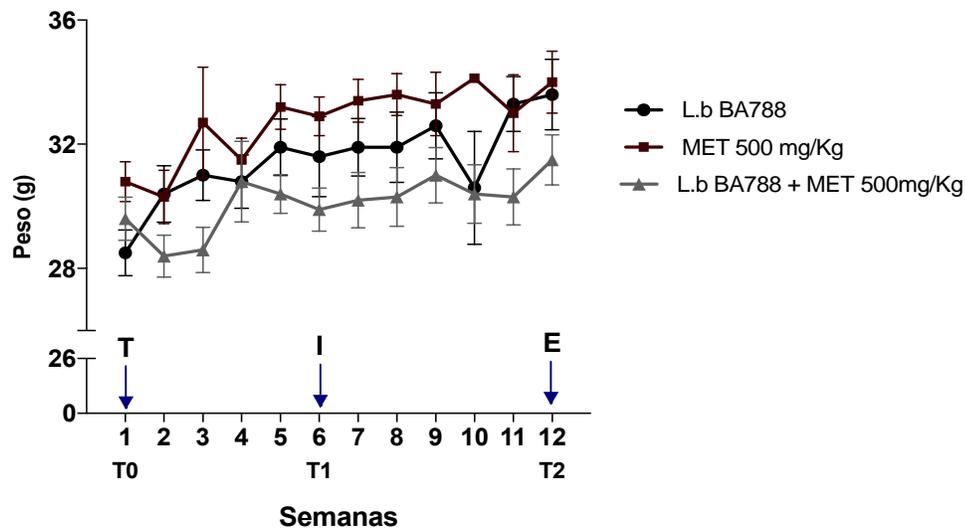


Figura 11. Monitoramento do peso corporal dos camundongos. Tempos de avaliações classificados em T0: início do tratamento com MET (T), T1: semana da infecção com L.b (I) e T2: semana da eutanásia (E) indicados com as setas azuis. Teste *one-way ANOVA* $p > 0,05$.

6.2.2 MET retarda o surgimento da pápula e modifica curva de evolução da lesão leishmaniótica

Animais após infecção, foram fotografados e monitorados semanalmente em relação a espessura da lesão da orelha. Após três semanas de infecção os animais G1 (apenas infectados) apresentaram 20% a mais na espessura da orelha com média 0,7 mm ($\pm 0,07$; $p = 0,0048$) e, após a 4ª semana, a pápula ulcerada com aspecto acneiforme e hiperemia cutânea diminuiu. Já o G3 (tratados com MET e infectados) diminuiu 3,4% em comparação com o grupo 2 (não infectado) de 0,56 mm ($\pm 0,055$), ou seja, demonstrando ausência de dano tecidual. Na 4ª semana de infecção o grupo 1 (infectado) reduziu em 5,7% e o grupo 3 (infectado e tratado com MET) aumentou 15,1% e surgiu pápula acneiforme sem ulceração. Seis semanas após a infecção, a avaliação da curva da lesão demonstra ausência de úlcera nos animais não tratados com MET (G1) com média 0,58 mm ($\pm 0,084$) com diferença de apenas 0,8% do grupo não infectado (Figura 12 A e B).

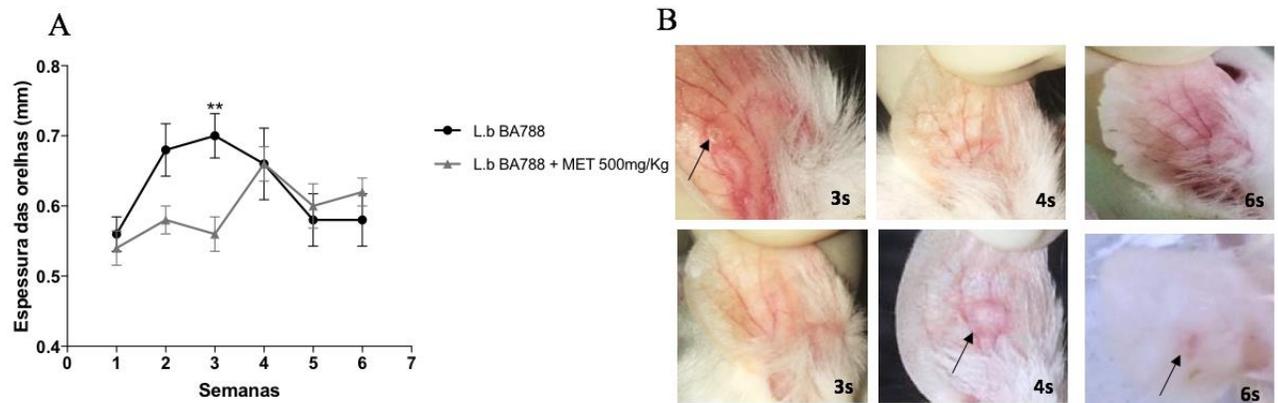


Figura 12. Monitoramento do surgimento da lesão cutânea em modelo experimental de infecção com L.b. Gráfico da curva da lesão nos animais infectados (A). Documentação fotográfica da orelha esquerda do grupo infectado com L.b e não tratado com MET e infectado com L.b e tratado com MET, respectivamente, durante a terceira (3s), quarta (4s) e sexta semana (6s) de infecção (B). ***one-way ANOVA* $p = 0,0048$.

6.2.3 Tratamento prévio com MET promove o aumento da carga parasitária na lesão e em linfonodo ipsilateral

Na 6ª semana de infecção, os animais foram eutanasiados, a orelha esquerda e linfonodos cervicais em G1 (infectados com L.b) e G3 (infectados com L.b e tratados com MET) foram

retirados para análises. Os órgãos foram macerados, diluídos em meio e cultivados para mensuração da carga parasitária. No local da infecção (Figura 13 A) e no linfonodo cervical (Figura 13 B), o G3 apresentou maior carga parasitária de 5×10^6 parasitos/ml na diluição limitante, ou seja, 10^3 mais promastigotas em comparação com G1 ($p = 0,02$; $p = 0,01$, respectivamente).

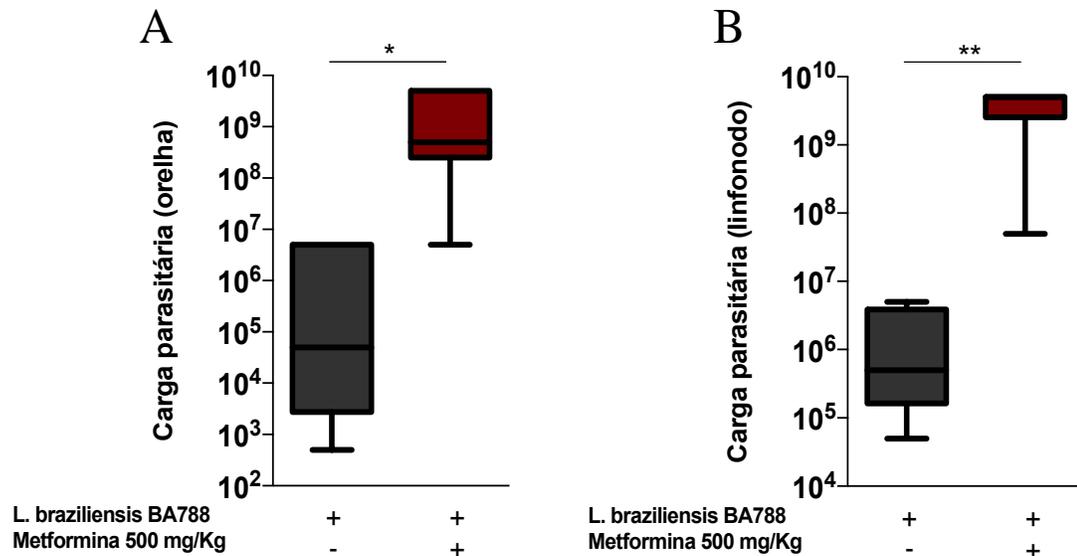


Figura 13. Avaliação comparativa da carga parasitária em modelo experimental de infecção por *L.b.* Representação gráfica e comparativa entre os grupos infectados com *L.b* e não tratados com MET e infectados com *L.b* e tratados com MET na orelha esquerda (A) e no linfonodo (B). * teste Mann-Whitney $p = 0,02$; ** $p = 0,01$.

6.2.4 MET inibe a produção sistêmica de TNF e IL-12p70

Nos tempos TO, T1 e T2 de tratamento e/ou infecção, foram coletadas alíquotas de sangue para obtenção do soro. Citocinas inflamatórias e regulatórias da resposta imune inata e adaptativa foram dosadas pela técnica CBA (BD). Os dados obtidos ressaltam o efeito modulador de MET nos níveis sistêmicos em G3 de TNF ($p = 0,006$) (Figura 14 A) e IL-12p70 ($p = 0,02$) (Figura 14 B) em T1, quando comparados com o G1. MET tem efeito inibidor nos níveis de TNF em G3 e T2 mesmo após a infecção por *L.b* ($p = 0,03$), quando comparado com G1 em T1. MET não interferiu nos índices sistêmicos e não houve diferença nos tempos e entre os grupos para as citocinas IL-6, IFN- γ , IL-10 e quimiocina CCL2 (Figura 14 C-F) ($p > 0,05$).

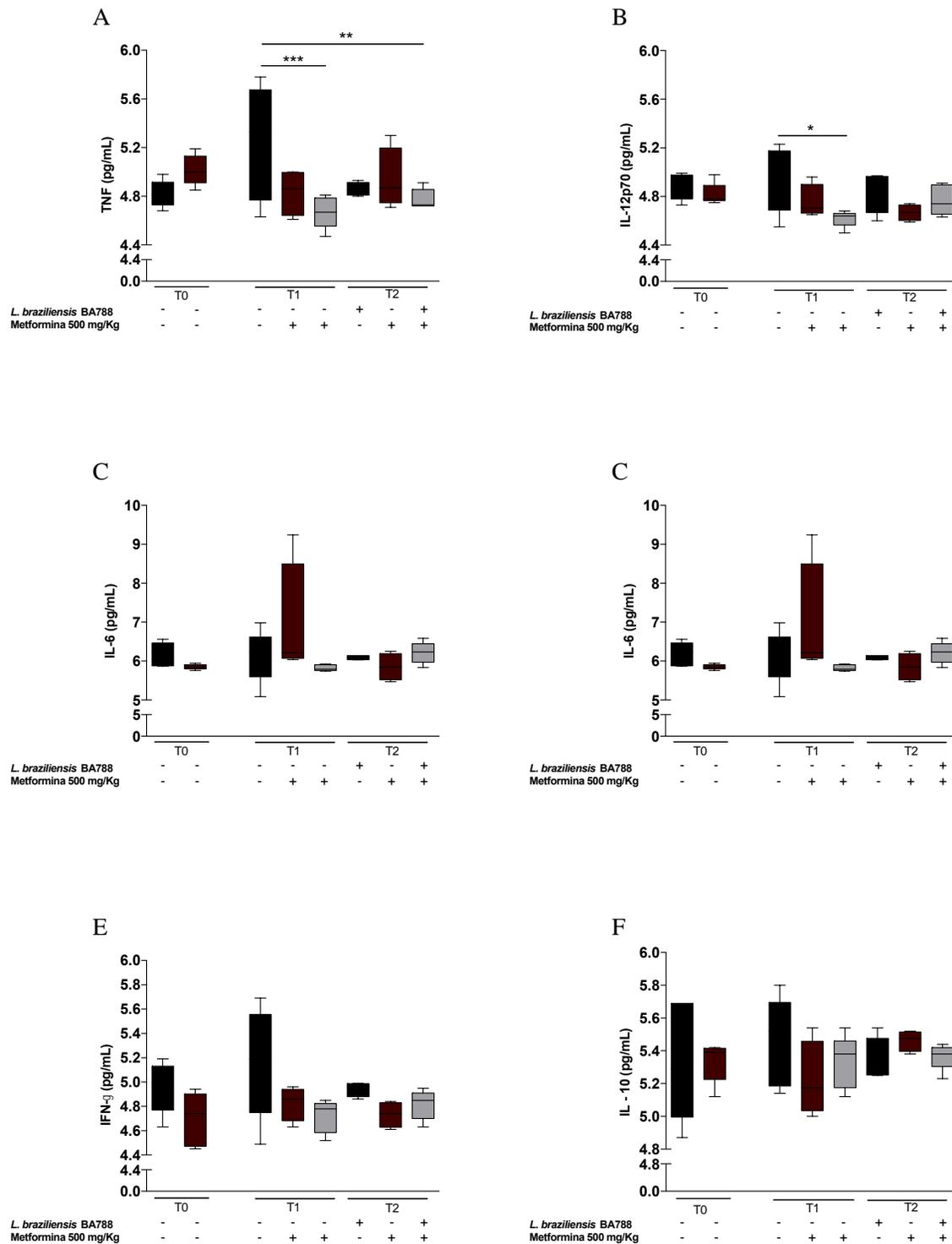


Figura 14. Níveis séricos de citocinas e quimiocina durante infecção experimental por *L.b* com e sem tratamento com MET. Quantificação e comparativo entre os grupos para as citocinas TNF (A), IL-12p70 (B), IL-6 (C), CCL2 (D), IFN- γ (E), IL-10 (F).****one-way ANOVA* $p = 0,006$; ** $p = 0,03$; * $p = 0,02$.

6.3 RESULTADOS DOS EFEITOS DA METOFORMINA EM CULTIVO DE CÉLULAS COM E SEM INFECÇÃO POR L.b.

6.3.1 MET não apresenta efeito citotóxico e inibe o crescimento de macrófagos Raw 264.7

A viabilidade celular de macrófagos Raw 264.7 não é alterada pela exposição a diferentes concentrações de MET (Figura 15). Como esperado, os resultados revelam que MET em 24 horas não é citotóxico para as células. A viabilidade celular variou de 85 a 100% em comparação ao controle positivo (MEIO), ou seja, cultura de macrófagos sem MET em meio DMEM suplementado.

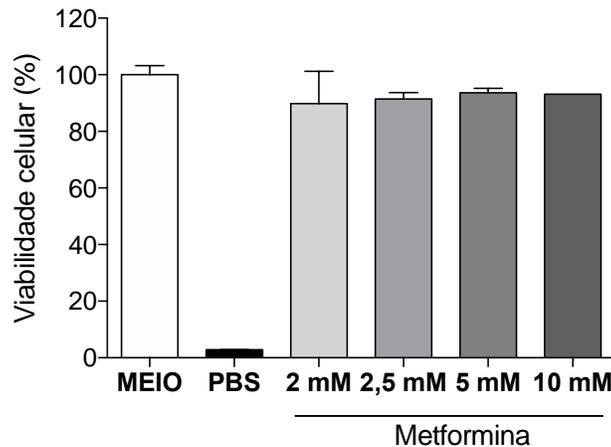


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos Raw 264.7 expostos a diferentes concentrações de MET. PBS: Tampão fosfato-salino.

Para a escolha das concentrações nos experimentos posteriores, foi realizado o cultivo de 1×10^5 macrófagos Raw 264.7/garrafa em diferentes concentrações e condições experimentais para avaliação do efeito de MET na proliferação celular. Macrófagos cultivados em 2 mM de MET em meio DMEM em placas de 96 poços crescem menos 36,8% em comparação aos cultivados sem MET ($4,5 \times 10^6$ células), após 96 horas de cultivo. Já células cultivadas em meio com 5mM crescem 98,9% menos em comparação com as células não tratadas, após 96 horas, ou seja, $1,3 \times 10^5$ células/garrafa. Em 10 mM, macrófagos crescem também menos 99,7% relativo as células não tratadas e tiverem um crescimento celular de $2,7 \times 10^4$ células/garrafa, em 96 horas de exposição (Figura 16 A).

Tendo em evidência a concentração de 2mM de MET com o menor efeito na inibição da proliferação dos macrófagos, foi realizado o ensaio com 1×10^5 células/poço para quantificar o número de células viáveis em 24, 48, 72 e 96 horas de exposição a MET comparando células pré-tratadas por 6 dias em MET e células sem exposição prévia a droga. Os resultados demonstram que a cultura sem exposição prévia a MET tem um crescimento médio de $4,3 \times 10^5$ células, ou seja, 22,5% superior em relação às células pré-tratadas. A cultura sem MET atingiu $5,9 \times 10^6$ células, após 96 horas, representando uma proliferação 27,1% maior em relação aos macrófagos expostos a MET pela primeira vez ($p = 0,0024$) e 81,3% a mais em comparação com as células anteriormente tratadas ($p = 0,0016$) (Figura 16 B).

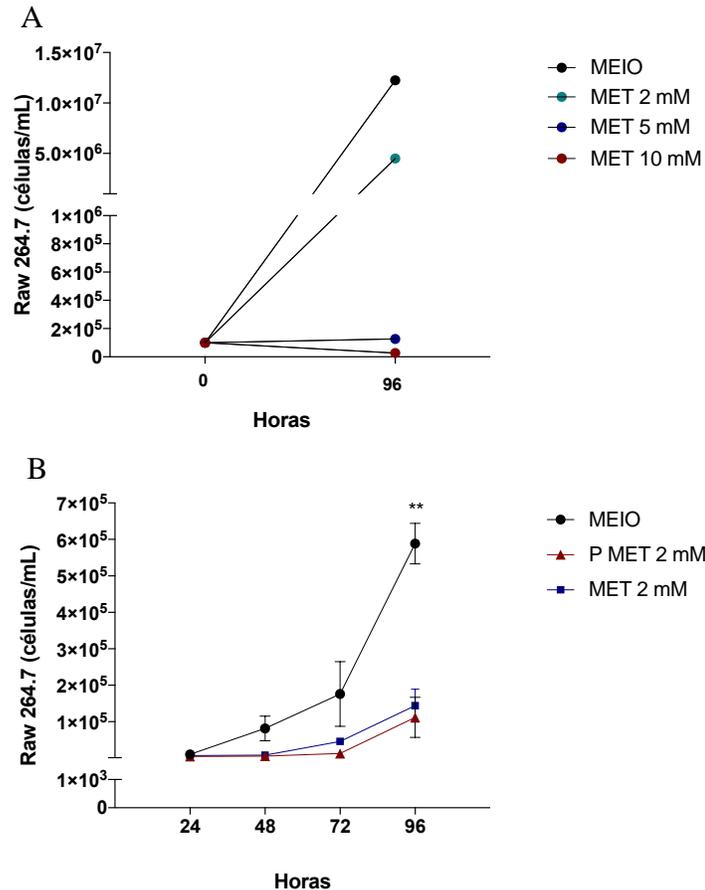


Figura 16. Cultivo de macrófagos Raw 264.7 expostos a MET. Avaliação do crescimento em diferentes concentrações de MET (A). Crescimento celular comparativo entre células não tratadas (MEIO), pré-tratadas (P MET 2mM) por 6 dias com MET e inicialmente tratadas com MET (B).

** *one-way ANOVA* $p = 0,0024$ entre MEIO e 2 mM; $p = 0,0016$ entre MEIO e P MET 2 mM.

6.3.2 Efeito de MET no crescimento da cultura de promastigotas de *L.b in vitro*

Após verificar que diferentes doses de MET interferem no crescimento de macrófagos *in vitro*, avaliamos o efeito direto da MET no cultivo de promastigotas de *L.b in vitro*. Cerca de 5×10^5 promastigotas metacíclicas/mL em 5mL de meio. O cultivo foi quantificado diariamente por 6 dias, até o decréscimo na proliferação na curva de crescimento. No 6º dia de cultura, observou-se que em comparação com a cultura sem o fármaco, houve um crescimento 34,3% maior em 2 mM de MET com média de $1,7 \times 10^8$ parasitos/mL, demonstrando permanência na fase logarítmica (log) de crescimento, apesar de não haver diferenças estatísticas. Em condição com 5 mM de MET houve 0% de diferença e com média de 6×10^7 parasitos/mL, quando comparado com o cultivo sem droga. Ao passo que, houve 8,5% a menos de proliferação em 10 mM de MET com média de $5,5 \times 10^7$ parasitos/mL (Figura 17).

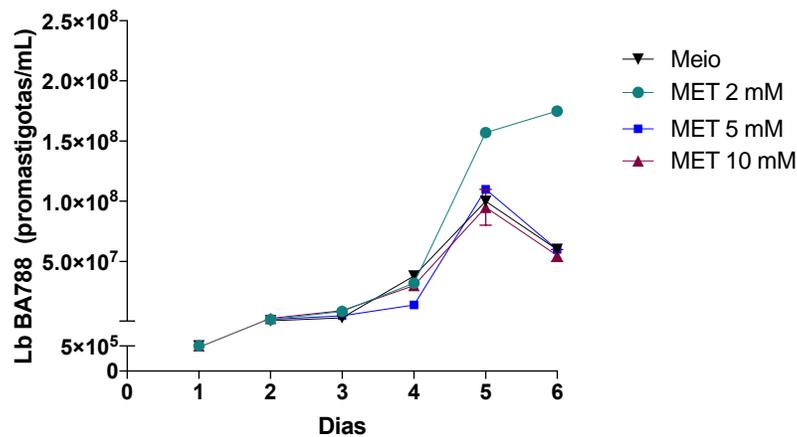


Figura 17. Curva de crescimento parasitário *in vitro* em diferentes concentrações de MET. *teste Kruskal-Wallis $p = 0,04$.

6.3.3 Tratamento com MET *in vitro* contribuiu para o aumento da taxa de infecção e carga parasitária em macrófagos Raw 264.7

Após a padronização da concentração de MET e os efeitos isolados na cultura de macrófagos e dos parasitos, realizou-se o desafio com a infecção em MOI 10:1. Após o período de infecção de 4 horas, foram contabilizados os percentuais de células infectadas (Figura 18 C) e o número de parasitos internalizados por células (Figura 18 D). As células positivas nas condições

experimentais (Tabela 2) descritas em CII (infectadas com L.b) e CIII (infectadas com L.b e tratadas com MET) estão representadas abaixo, respectivamente (Figura 18 A-B). A modulação das células com MET na cultura interfere no quantitativo de macrófagos infectados ($p = 0,006$) e quando analisado de forma comparativa com os macrófagos não tratados com MET. A quantidade de parasitos/células é 46,8% ($p = 0,002$).

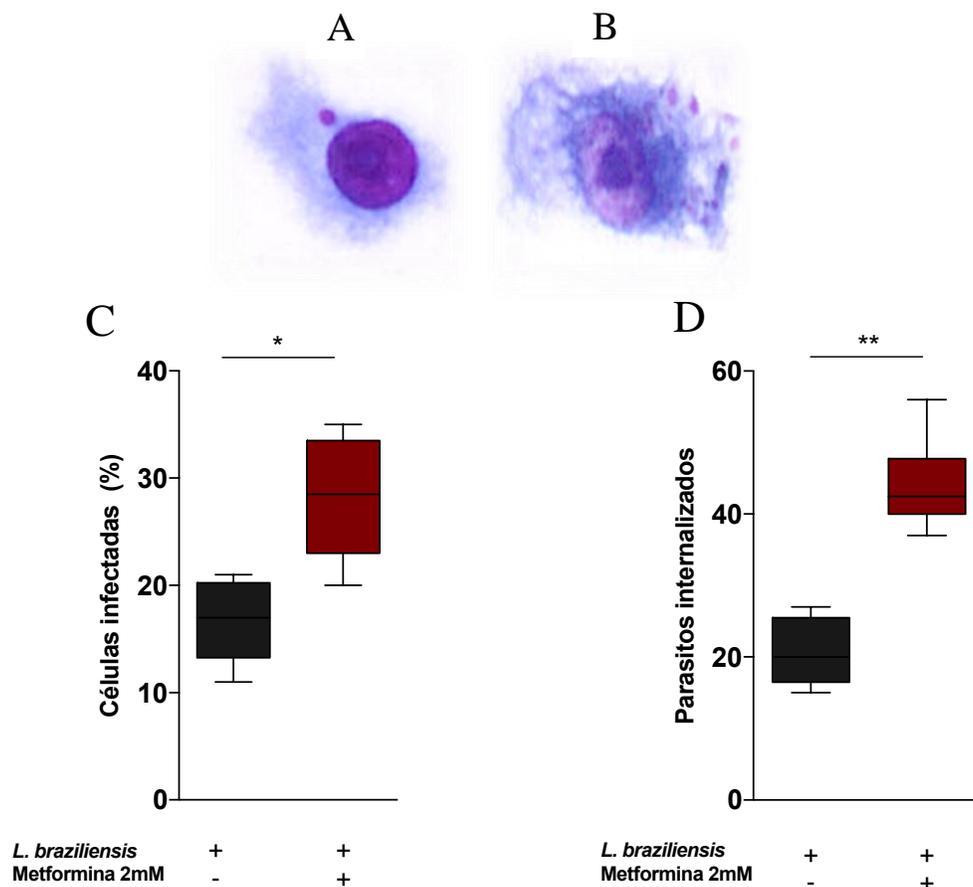


Figura 18. Quantificação da infecção de macrófagos Raw 264.7 por *L.b* tratados com MET. Célula infectada com *L.b* e não tratada com MET (A). Célula infectada com *L.b* e tratada com MET (B). Representação gráfica da taxa de infecção em 100 células contadas (C). Contagem de parasitos internalizados na frequência de células infectadas (D). *Teste Kruskal-Wallis: $p = 0,006$; **Teste Kruskal-Wallis: $p = 0,02$.

Em paralelo a avaliação da taxa de infecção e contagem de parasitos, foi realizado a análise da viabilidade parasitária intracelular, permitindo assim, identificar modificações no potencial microbicida dos macrófagos. A avaliação foi realizada em 48 e 96 horas. A análise dos resultados evidencia um aumento da viabilidade parasitária em 96 horas para macrófagos infectados com L.b e tratados com MET (CIII), em comparação com os infectados com L.b e não tratados em 24 horas (CII) ($p = 0,001$) e CIII em 24 horas ($p = 0,01$) (Figura 19). Os dados supracitados ressaltam, em termos de, taxa de infecção e número de parasitos internalizados, que as células tratadas com MET apresentam um redução da capacidade microbicida na infecção por L.b.

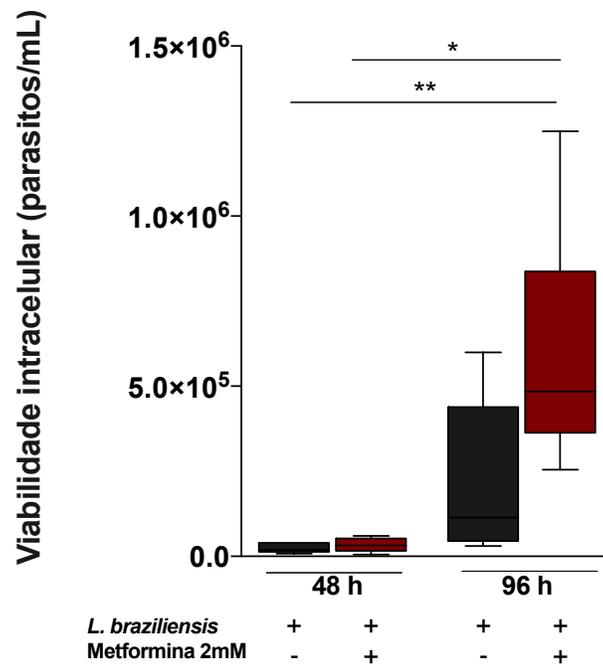


Figura 19. Análise comparativa da viabilidade parasitária intracelular em macrófagos Raw 264.7 infectados com L.b. Teste Kruskal-Wallis: ** $p = 0,001$; * $p = 0,01$. LPS: lipopolissacarídeo.

6.3.4 MET suprime a liberação de ROS no meio extracelular e produção de ROS intracelular em macrófagos Raw 264.7 durante a infecção por L.b

Macrófagos expostos a MET tiveram a produção de reativos derivados do oxigênio liberados no sobrenadante reduzida 89,6% ($p = 0,007$), após a infecção com L.b, quando comparados com os macrófagos tratados com MET e sem infecção por L.b (Figura 20).

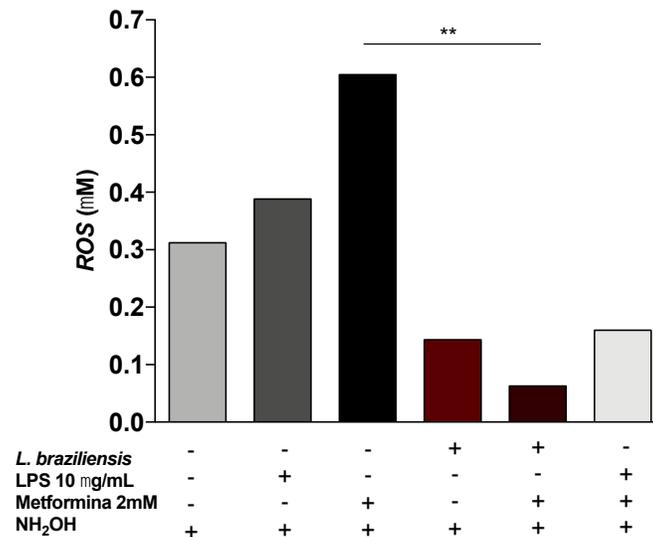
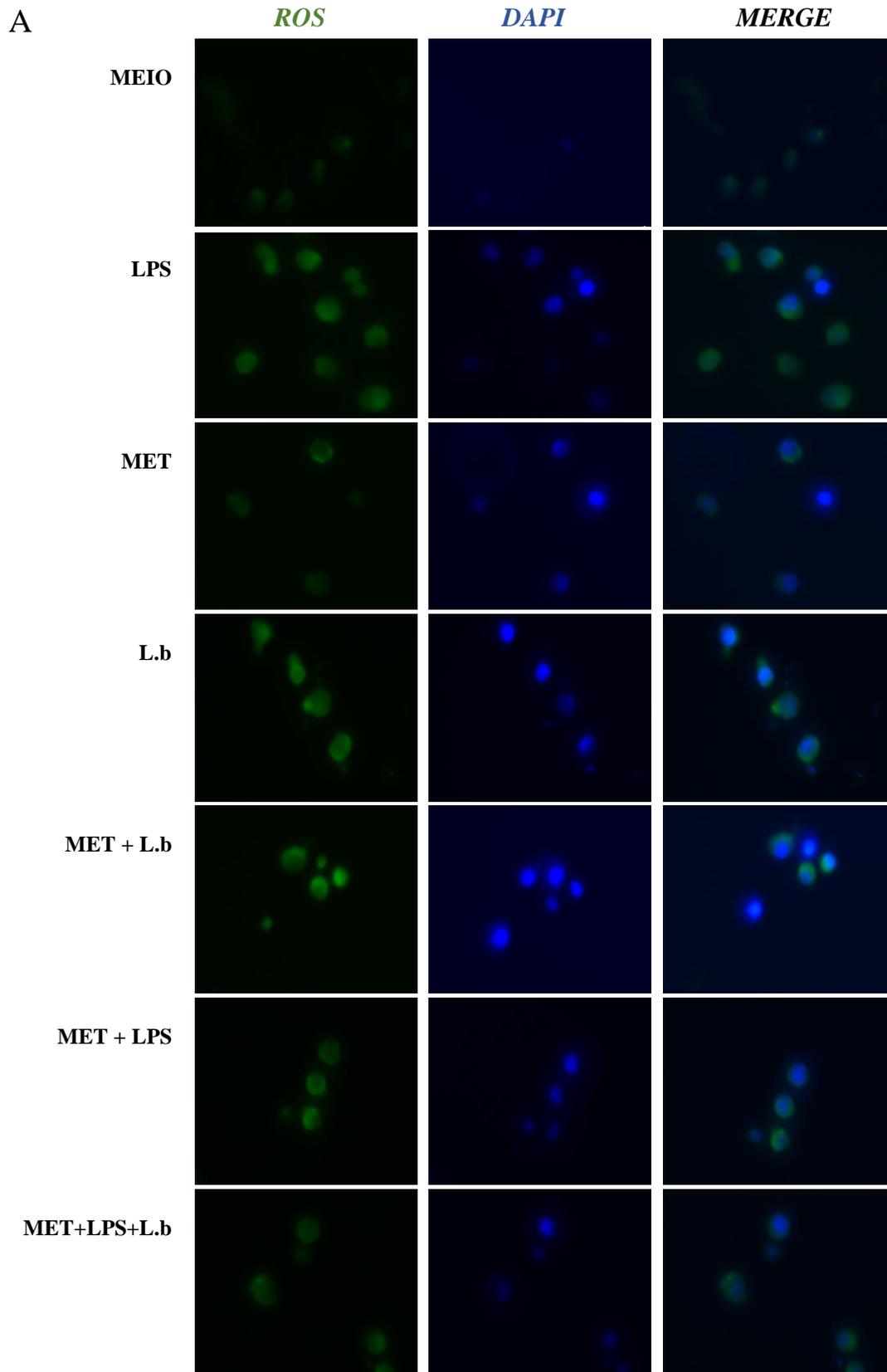


Figura 20. Produção de ROS no sobrenadante da cultura de macrófagos Raw 264.7 tratados com MET e infectados com L.b. **Teste Kruskal-Wallis $p = 0,007$. LPS: lipopolissacarídeo. NH₂OH: hidroxilamina.

As dosagens de ROS nos sobrenadantes funcionaram como método de triagem para confirmação das alterações bioenergéticas intracelulares. Para quantificar as ROS intracelulares, os macrófagos foram analisados conforme a intensidade de fluorescência celular total corrigida. Os campos microscópicos são representativos das culturas e permitem a verificação qualitativa da área celular fluorescente para ROS, DAPI e a sobreposição (*Merge*) (Figura 21 A). Os dados mostram o aumento significativo na produção de ROS nas células infectadas com L.b (CII), evidenciando o efeito da L.b na ativação macrófagica em comparação com células não infectadas (CN) ($p < 0,0001$). L.b induz um efeito superior ao estímulo com LPS (CP) ($p = 0,01$) e metformina (CI) ($p = 0,0008$), assim como, representa efeito superior na produção de ROS em comparação com células estimuladas com LPS e tratadas com MET (CIV) ($p = 0,01$). As análises salientam as diferenças na indução da produção dos mediadores reativos, em comparação com CN, utilizando os estímulos em macrófagos tratados com MET e infectados com L.b (CIII) ($p = 0,008$), macrófagos tratados com MET e estimulados com LPS (CIV) ($p = 0,03$) e macrófagos tratados com MET, infectados com L.b e estimulados com LPS (CV) ($p = 0,006$). Apesar de não haver diferença estatística, verificamos que MET reduziu 34,1% na indução de radicais do oxigênio intracelular na infecção por L.b (CIII) em comparação com macrófagos apenas infectados (Figura 21 B).



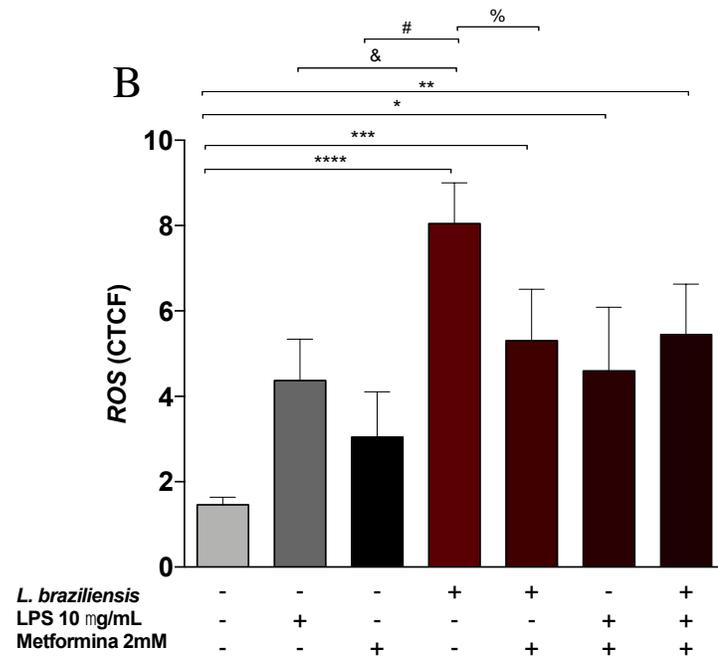


Figura 21. Dosagem intracelular de ROS em macrófagos Raw 264.7 infectados com L.b e tratados ou não com MET. Imagens representativas da marcação celular por imunofluorescência (A) e quantificação do coeficiente de fluorescência total corrigido (B). Teste Kruskal-Wallis ****p = 0,0001; ***p = 0,008; *p = 0,03; **p = 0,006; & p = 0,01; #p = 0,0008; %p = 0,01. LPS: lipopolissacarídeo.

7 DISCUSSÃO

As alterações metabólicas decorrentes da diabetes como a hiperglicemia e formação dos AGEs contribuem para complicações como arteriosclerose que contribui para formação de úlceras cutâneas nos pacientes com DM (MACEDO, NUNES, BARRETO, 2016). Fármacos hipoglicemiantes são utilizados para o tratamento da DM e já são descritas ações pleotrópicas no sistema imune dos indivíduos que modulam a inflamação, o potencial microbicida dos fagócitos e a resposta celular adaptativa (LIU et al., 2014; KAJIWARA et al., 2017; SINGHAL et al., 2014). Esses achados estimulam investigar quais os efeitos inflamatórios crônicos e sistêmicos da DM e a possível modulação farmacológica da metformina e outros fármacos como a gliburida na patogênese da leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*.

As avaliações histopatológicas das biópsias de pacientes com LC diabéticos revelaram frequência da necrose tecidual 50% menor que em biópsias de pacientes não diabéticos, o que pode correlacionar os pacientes diabéticos com ulceração cutânea menos profundas, caracterizando uma lesão superficial crostosa e com menor dano tecidual visível, observadas clinicamente. A não identificação de amastigotas nos 25% do grupo LC DM não excluiu o diagnóstico de LC, pois os pacientes tiveram histologia compatível, IDRM positivo, melhora clínica com uso de glucantime, assim como, PCR e/ou cultivo positivos para *Leishmania spp.*

Pela caracterização do infiltrado celular nas bordas das úlceras dos pacientes com LC observou-se uma diminuição de 35,2% da quantidade de células CD8⁺ em úlceras de pacientes com ambas as doenças (LC e DM). Na literatura há fortes evidências que células CD8⁺ contribuem para dano tecidual nas úlceras de pacientes com leishmaniose (MACHADO et al., 2002; RUIZ, BECKER 2007; SANTOS et al., 2013; DANTAS et al., 2013). Redução na frequência de células CD8⁺ nos pacientes diabéticos pode ter relação com menor frequência de necrose *in situ* e modificações no aspecto clínico. Os achados em outros trabalhos atribuem que as células T CD8⁺ em pacientes com LC como células efetoras citotóxicas que migram para a lesão e participam na formação da necrose. Células CD8⁺ Granzyme B⁺ causam o dano tecidual, já as células CD4⁺ produtoras de IFN- γ contribuem para eliminação dos parasitos (SANTOS et al., 2013).

A quantificação de células granzima B⁺ demonstrou que quanto maior a extensão das lesões em pacientes LC DM temos a menor frequência de células produtoras de granzima B. Estudos realizados por Kumar et al. (2014) evidenciaram a diminuição na população de células T CD8⁺ Granzima B⁺ em pacientes diabéticos com tuberculose, concluindo que os pacientes diabéticos possuem uma diminuição na expressão de moléculas citotóxicas em células CD8⁺. A hiperglicemia pode estar modulando a expressão de moléculas citotóxicas em células CD8⁺ (KUMAR et al., 2014).

Observou-se uma correlação negativa entre os níveis glicêmicos e a extensão da lesão leishmaniótica ($r = - 0,75$; $p = 0,007$) em pacientes com DM em uso de metformina, quando comparados aos pacientes sem DM. O oposto também foi observado ($r = 0,6$; $p > 0,9$) entre glicemia e área da úlcera entre os pacientes portadores de DM em uso de outras drogas hipoglicemiantes. Os dados sugerem que a extensão e aspecto da úlcera cutânea em pacientes diabéticos são modulados pela metformina.

O infiltrado inflamatório crônico presente nas úlceras de LC são caracterizados pela presença de muitos macrófagos CD68⁺. Neste estudo encontrou-se uma correlação positiva ($r = 0,83$) entre a extensão da lesão e número de macrófagos *in situ*, independente, da presença ou não de DM. Resultados semelhantes por Saldanha et al. (2017) corroboram com os dados encontrados aqui. Macrófagos mesmo no início na LCR e forma crônica na LCC possuem correlação com a extensão da área ulcerada e área de necrose na LCR ($r = 0,55$) e LCC ($r = 0,53$). Concluindo que macrófagos podem estar diretamente envolvidos na patogênese da úlcera por Lb em lesões recentes de LC (SALDANHA et al., 2017). CAMPOS et al. (2017) ressalta que o aumento da frequência de células inflamatórias e atividade citotóxica na LC por Lb interfere na aparência e desenvolvimento da úlcera cutânea (CAMPOS et al., 2017).

Saldanha et al. (2017) e Shirian et al. (2014) evidenciaram para correlação negativa entre o número de amastigotas e extensão da área de ulceração na LC. Resultados encontrados no presente estudo em biópsias de pacientes revelaram 29,1% mais amastigotas no grupo com DM e correlação positiva ($r = 0,83$) entre tamanho da úlcera e número de amastigotas. A biópsia do paciente diabético com maior área de lesão (2046 mm²) possuiu cerca de 28,6% mais amastigotas quando comparado ao paciente sem DM. Os achados corroboram com a hipótese que a DM altera a

suscetibilidade às infecções, possivelmente interferindo na função dos neutrófilos, diminuição dos mecanismos antioxidantes e imunidade humoral (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012) e complicações na LC (NICLOT et al., 2014).

Os achados do presente comparativo com biópsias de pacientes foram fundamentais para outro estudo incluído nesta dissertação para avaliar no modelo experimental o efeito da metformina na infecção por *L.b.* Sabe-se que mesmo com DM, o uso da medicação é irregular, também nos pacientes com diabetes e leishmaniose e os pacientes também foram submetidos ao tratamento para leishmaniose com glutamine. Assim, para avaliar qual o efeito da metformina na evolução da infecção neste modelo mais controlado de vieses, se avaliou o efeito isolado do tratamento com MET na LC experimental em BALB/c. Estudos como de Qing et al. (2019) evidenciam os mecanismos moleculares da MET em induzir o eixo AMPK/mTOR promovendo a inibição de NLRP3 como evento crucial na indução de macrófagos M2 e promovendo um avanço para a cicatrização tecidual (QING et al., 2019). Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o tratamento com MET em camundongos infectados com *L.b.* retarda o aparecimento da pápula leishmaniótica, mas não impede a ulceração, após 6 semanas de infecção. O estudo realizado por Ochoa-Gonzalez et al. (2016), afirmou que MET bloqueia ação de mTOR, diminuiu o ciclo celular, reduz a proliferação celular de queratinócitos *in vitro* reduzindo a cicatrização em modelo experimental e interferindo negativamente na clínica dos pacientes com úlcera do pé diabético, sugerindo que o uso de MET interfere no remodelamento tecidual, no tamanho da lesão e no tempo de cicatrização das lesões (OCHOA-GONZALEZ et al., 2016).

MET induz AMPK modulando o balanço ADP/ATP mitocondrial o que resulta na produção de ROS em macrófagos, que aumenta o potencial microbicida dos macrófagos em infecções por *M. tuberculosis* (SINGHAL et al., 2014), *L. pneumophila* (KAJIWARA et al., 2017). Interferindo no metabolismo mitocondrial e na imunidade adaptativa em infecções por *Plasmodium*, sugerindo também um efeito protetor da MET na malária (BRIDGES et al., 2014; MIYAKODA et al., 2018). Tratamento com MET no modelo experimental de infecção por *L.b.* proposto na presente dissertação resultou um aumento 1.000 vezes o número de parasitos no local de infecção e nos linfonodos drenantes. Sugere-se avaliar a carga parasitária dos animais em diferentes tempos de infecção, pois a curva da lesão no momento da análise evidencia a fase de remissão da doença para os animais não tratados com MET e o aumento da lesão e carga parasitária no para os animais

tratados com MET. Esses achados sugerem para a hipótese, que MET exacerba a produção de ROS, um estresse oxidativo celular e resulta no aumento da susceptibilidade para L.b. Novais et al. (2014) avaliou que embora as *Leishmanias* sejam sensíveis as ROS, a explosão respiratória que ocorre nos macrófagos, não ativados pela imunidade adaptativa após a infecção, é insuficiente para matá-los. Fukai et al. (2011) afirmam que alguns parasitas podem induzir respostas antioxidantes como um mecanismo de escape. Khouri et al. (2009) ressaltaram que em macrófagos humanos infectados por *L. amazonensis* ocorrem aumentos significativos na expressão e atividade da superóxido desmutase-1 (SOD-1), o que favorece diretamente a sobrevivência do parasito.

A imunidade inata regula positivamente o perfil de citocinas de ativação da resposta adaptativa Th1 contra a L.b em modelos de infecção (OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). A administração de MET por 6 semanas em camundongos BALB/c diminuiu TNF e IL-12. O pré-tratamento dos animais permitiu reproduzir possivelmente os indivíduos diabéticos em uso de hipoglicemiante ao serem infectados com L.b. Animais infectados, sob efeito da MET, com menores níveis de TNF e IL-12 facilita a infecção por L.b. Rocha et al. (2007) demonstra que a infecção com L.b em camundongos TNF^{-/-} favorecem lesões cutâneas não cicatrizantes. Carvalho et al. (2008), relatam que as células dendríticas infectadas contribuem para o controle do parasito através da produção aumentada de TNF- α . Portanto, a utilização de MET na infecção experimental modificou a dinâmica de infecção por L.b, proporcionou o aumento de carga parasitária e modulou níveis circulantes de TNF e IL-12, sendo IL-12, citocina crítica para indução da ativação celular no contexto da infecção por L.b (VARGAS-INCHAUSTEGUI, XIN, SOONG, 2008).

O aumento na carga parasitária dos camundongos e modulação das citocinas inflamatórias produzidas principalmente de células da resposta imune inata, levaram a suposta elucidação dos mecanismos da imunidade inata, que quando modulados por MET, são capazes de modificar o seu potencial microbicida e perfil de ativação no modelo *in vitro*.

Sabe-se também que efeitos pleiotrópicos de MET atenua a diferenciação de monócitos em macrófagos e eventos indutores da inflamação, como a produção de TNF (VASAMSETTI et al., 2015). Os achados preliminares da dissertação com uso de MET no macrófago revelam a capacidade em inibir a proliferação de macrófagos em condições experimentais com doses de 5 e 10 mM de MET e independente de exposição prévia ao fármaco, contudo, sem interferir na

viabilidade celular. O efeito na inibição da proliferação foi restrito ao macrófago e mantendo o crescimento de *L.b* com 2 mM de MET na fase estacionária de crescimento, mas o que não ocorre com doses maiores ou ausência de MET. Wang et al. (2018) mostraram os efeitos de MET no câncer, onde há muita proliferação celular, modifica o microambiente inibindo a proliferação de células neoplásicas, pela diminuição da angiogênese e modificação no fenótipo do macrófago associado ao tumor que suporta o desenvolvimento tumoral. Em carcinoma hepatocelular, Del Campo et al. (2018) e Jonggi et al. (2015) corroboraram com os achados reafirmando a ação direta de MET na indução de AMPK, inibição de mTOR, suprimindo o ciclo celular e consequente proliferação das células tumorais.

Diante das avaliações do efeito de MET nos cultivos isolados de macrófagos, investigou-se MET na infecção por *L.b in vitro*. O aumento no número de células infectadas e também da carga parasitária, contudo, foi observado que apenas 30% de aumento na viabilidade dos parasitos intracelulares nas células tratadas com MET em 24 horas após a infecção e aumentaram 36% em 96 horas. Sabendo que um dos principais mecanismos de morte intracelular dos patógenos é através produção de *ROS* (NOVAIS et al., 2014) e que MET interfere na produção de *mROS* (KAJIWARA et al., 2017; SINGHAL et al., 2014) formulamos a hipótese que durante o curso da infecção por *L.b* ocorre uma interferência nos níveis de *ROS* induzidos pela infecção e MET que ativam mecanismos de evasão do parasito via ação antioxidante que promovem o aumento da viabilidade parasitária intracelular. As evidências na liberação de *ROS* no sobrenadante das culturas de macrófagos demonstram que MET aumenta a liberação de *ROS*, contudo, ocorre uma diminuição significativa na liberação, quando as células são tratadas com o fármaco e infectadas com *L.b*. A técnica para quantificação das *ROS* extracelular foi executada com a utilização de NH_2OH , que possuiu atividades microbicidas descritas (JULIÁN et al., 2015) e os ésteres provenientes de NH_2OH são associados por inibir o crescimento de amastigota e promastigota de *L. donovani* (KHOMUTOV et al., 2010), portanto, pode ser atrelado as baixas concentrações de *ROS* extracelular durante a infecção com *L.b*.

O cultivo de macrófagos com MET induziu um aumento de 48,1% na média de produção de *ROS* intracelular, assim como, o estímulo proporcionado pela infecção promove uma síntese 37,8% superior a indução por MET. A adição de MET nos cultivos de macrófagos infectados diminuiu 34% a produção de *ROS* intracelular. Carvalho et al. (2017) descreve que, em excesso,

as *ROS* são altamente prejudiciais para os parasitas e para as células hospedeiras. Portanto, para contornar o estresse oxidativo, as células hospedeiras produzem antioxidantes, como a SOD-1, que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (FUKAI, USHIO-FUKAI, 2011). Os mecanismos elucidados na literatura, correlacionam que alguns parasitos podem induzir respostas antioxidantes como um mecanismo de escape. Em macrófagos humanos, a infecção por *L. amazonensis* é seguida por aumentos dramáticos na expressão e atividade da SOD-1, que tem mostrado favorecer diretamente a sobrevivência do parasito (CARVALHO et al., 2017).

Os dados discutidos no trabalho permitem propor (Figura 22) que a utilização de MET diminuiu a proliferação celular, na infecção por *L.b*, suprime a liberação e produção de TNF e IL-12p70, boqueia a liberação de *ROS* para o meio extracelular, como também, a produção de *ROS*, quando infectadas por *Leishmania*. MET através do aumento de AMPK-p pode gerar um elevado estresse oxidativo celular, quando somado a produção de *ROS* viabilizada via fagocitose do parasito. A condição gerada promove a indução de SOD do hospedeiro e isoformas descritas do parasito (GHOSH; GOSWAMI; ADHYA, 2003), as quais irão implementar a detoxificação de *ROS* e permitir o aumento da carga parasitária no interior dos vacúolos parasitóforos.

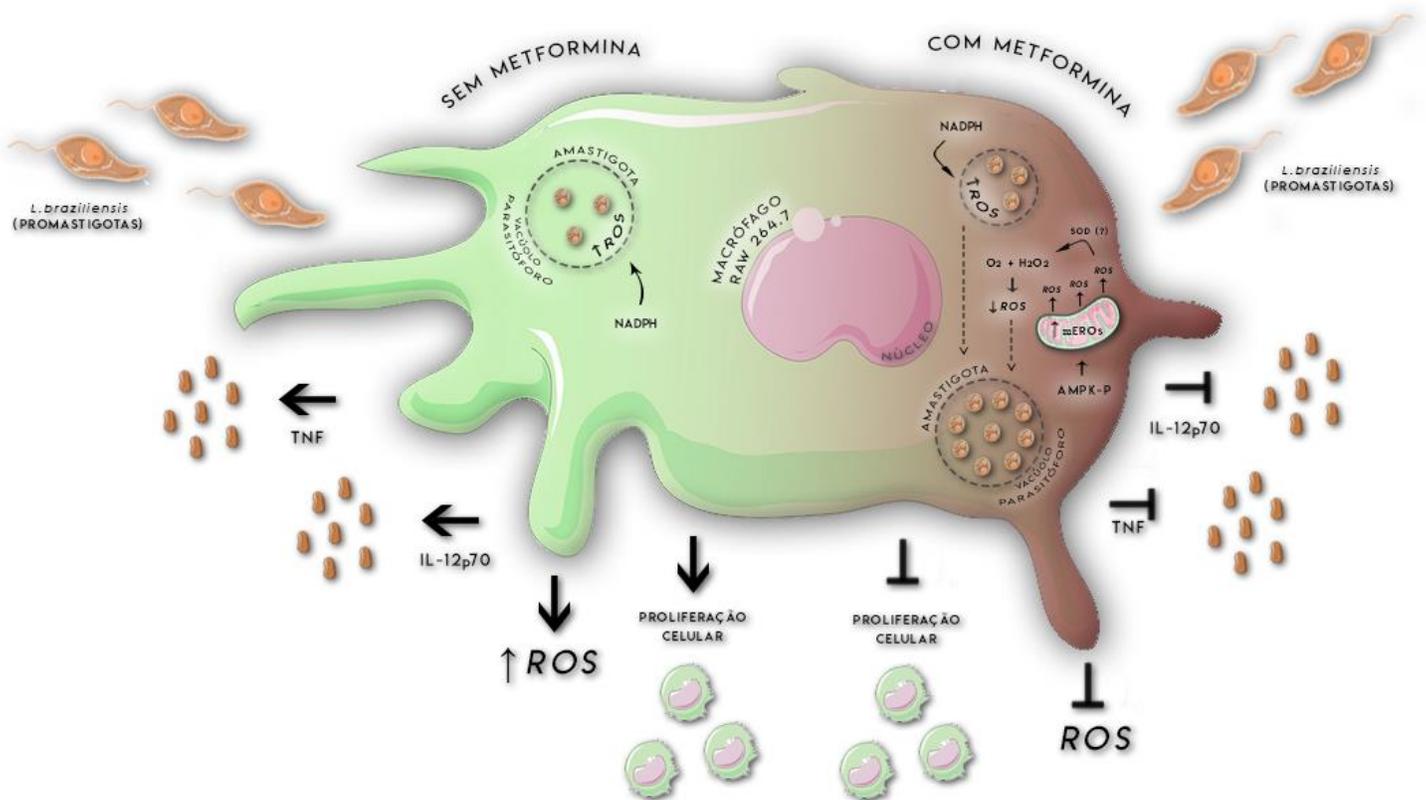


Figura 22. Modelo proposto da imunomodulação induzida por metformina durante a infecção por *L. braziliensis* em macrófagos. Durante a infecção na ausência de MET, a produção de TNF e IL-12p70 permite a manutenção do perfil inflamatório do macrófago, assim como, o processo de fagocitose desencadeia a produção de ROS via NADPH oxidase no interior do vacúolo parasitóforo, logo que a ausência de MET também não interfere na proliferação das células e garante um maior controle da carga parasitária por não haver subversão dos mecanismos microbicidas do macrófago. Diante da introdução da MET, ocorre a ativação de AMPK-p que inibe a produção de TNF e IL-12p70, suprime a proliferação celular e proporciona o aumento de mROS. A fagocitose induz ROS via NADPH oxidase e em adição com mROS geradas via AMPK-p proporcionam um ambiente de elevado estresse oxidativo intracelular. A condição gerada ativa a via de detoxificação por SOD da célula hospedeira e isoformas do parasito, reduzindo ROS intracelulares e viabilizando o crescimento parasitário no interior do vacúolo parasitóforo.

8 CONCLUSÃO

Pacientes previamente diabéticos com LC desenvolvem úlceras leishmanióticas que são atípicas, com menos necrose e menos células CD8⁺ no local da lesão. Muitos dos pacientes com LC DM usavam Metformina para controle da glicemia. Nesta tese avaliamos também a utilização experimental de metformina *in vivo* em animasi infectados com Lb como fármaco imunomodulador MET diminuiu os níveis de TNF e IL-12p70, interfere no tempo de ulceração com L.b e aumenta a carga parasitária no sítio de infecção e lifonodo ipsilateral. Já no modelo tratamento *in vitro* com MET há a redução na proliferação celular, independente, de exposição prévia a MET e não interfere na viabilidade celular. Baixas concentrações de MET adicionadas no cultivo de L.b favoreceu a fase estacionária de crescimento da L.b. Já a presença de MET durante a infecção *in vitro*, elevou o número de células infectadas e o número de parasitos por células. A associação da MET durante infecção com L.b reduz as produções de ROS induzidas por L.b e MET de forma isolada. Os achados encontrados sugerem que DM interfere na apresentação clínica das úlceras na LC, por interferir no padrão de resposta celular do hospedeiro, diminuindo células CD8⁺ e favorecendo a carga parasitária, mesmo com o tratamento com glucantime. Já os estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* revelam que só o uso da metformina, principal droga hipoglicemiante incluída no tratamento da diabetes, não controla a infecção e favorece a doença.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. A.; ELSHERBINI, A. M.; SHALDAM, M. A. Repurposing metformin as a quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. **Afr. Health. Sci.**, v. 17, n. 3, p. 808–19, 2017.
- ADAK, T. et al. A reappraisal on metformin. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 92, p. 324–32, 2018.
- ALBERTI, K.G.M.M., ZIMMET, P.Z. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. **Diabet. Med.**, v. 15, p. 539–553, 1998.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.
- ÁLVAREZ, S. Y. Uso de la metformina en la diabetes mellitus tipo II. **Rev. Cuba. Farm.**, v. 45, n. 1, p. 157–66, 2011.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian. J. Med. Res.**, v. 119, n. 6, p. 238–258, 2004.
- BELKAID, Y. et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 10, p. 1941–53, 1998.
- BEZERRA, R.J.S.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v. 40, n. 2, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2a.ed. Brasília, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica – Dados. Disponível: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>. Acesso: fev 2017.
- BRIDGES, H. R. et al. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. **Biochem. J.**, v. 462, p. 475–487, 2014.
- CAMPOS, T. M. et al. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.112, n. 11, 2017.

CARVALHO, E.M. Parasite, vectors and reservoirs as determinantsof tegumentar leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 4, p. 423-424, 2012.

CARVALHO, G. Q. et al. Heme Drives Oxidative Stress-Associated Cell Death in Human Neutrophils Infected with *Leishmania infantum*. **Front. Immunol.** v. 8, p. 1620, 2017.

CASQUEIRO, J.; CASQUEIRO, J.; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian J. Endocrinol. Metab.**, v. 16, n. 1, 2012.

CHEN, Y. et al. Contribution of redox-dependent activation of endothelial Nlrp3 inflammasomes to hyperglycemia induced endothelial dysfunction. **J. Mol. Med.**, v. 94, n. 12, p. 1335-1347, 2016.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gaz. Méd. Bahia**, p. 70–83, 2009.

CRESPO, S. Metformina, a 50 años de su uso: Eficacia, tolerancia, seguridad y nuevas indicaciones. **Rev. Cient. Cienc. Med.**, v. 12, n. 2, p. 23–5, 2009.

CREVEL, R. v.; VIJVER, S. de.; MOORE, D. A. J. The global diabetes epidemic: what does it mean for infectious diseases in tropical countries?. **Lancet Diabetes Endocrinol.**, 2016.

DANTAS, M. L. et al. CD8+ T cells *in situ* in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 46, n. 6, 2013.

DAUGAN, M. et al. Metformin: An anti-diabetic drug to fight câncer. **Pharmacol. Res.**, v. 113, p. 675-685, 2016.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKY, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Front. Immunol.**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.

DEL CAMPO, J. A. et al. Simvastatin and metformin inhibit cell growth in hepatitis C virus infected cells via mTOR increasing PTEN and autophagy. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2018.

DELL, R.B.; HOLLERAN, S.; RAMAKRISHNAN, R. Sample size determination. **ILAR. J.**, v. 43, n. 4, p. 207-13, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 417-423, 1996.

FILHO, A. V. da C; LUCAS, I. C; SAMPAIO, R. N. R. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 41(4):424-427, 2008.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 15, n. 6, p. 1583–606, 2011.

GHOSH, S.; GOSWAMI, S.; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **Biochem. J.**, v. 369(Pt 3), p. 447-52, 2003.

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: A key regulator of energy balance with many roles in human disease. **J. Intern. Med.**, v. 276, n. 6, p. 543–59, 2014.

HATTORI, Y.; HATTORI, K.; HAYASHI, T. Pleiotropic Benefits of Metformin: Macrophage Targeting Its Anti-inflammatory Mechanisms. **Diabetes**, v. 64, p. 1907–1909, 2015.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HUBBARD, L.L.N.; MOORE, B.B. IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis. **Infect. Dis. Rep.**, v. 2, n. 1, e. 9, 2010.

HUEBSCHMANN et al. Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products, **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420-1432, 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Bringing Research in Diabetes to Global Environments and Systems, 2015. Disponível: <<http://www.idf.org/BRIDGES/map/brazil>>. Acesso: fev 2017.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. **Physio. Res.**, v. 53, p. 131-142, 2004.

JONGGI, C.; ROBERTS, L. R. Statins and Metformin for Chemoprevention of Hepatocellular Carcinoma. **Clin. Liver. Dis.**, v. 8, n. 2, 2016.

JULIÁN, E. et al. Methyl-Hydroxylamine as an Efficacious Antibacterial Agent That Targets the Ribonucleotide Reductase Enzyme. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, e0122049, 2015.

KAJIWARA, C. et al. Metformin Mediates Protection against *Legionella* Pneumonia through Activation of AMPK and Mitochondrial Reactive Oxygen Species. **J. Immunol.**, 2017.

KATO, K. C. et al. Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb (III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 1 p. 481– 488, 2014.

KHOMUTOV, M. A. et al. Novel convenient synthesis of biologically active esters of hydroxylamine. **Amino Acids**, v. 38, p. 509–517, 2010.

KHOURI, R et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 182, n. 4, p. 2525–31, 2009.

- KRAKAUER T. Inflammasome, Mtorc1 activation, and metabolic derangement contribute to the susceptibility of diabetics to infections. **Med. Hypotheses**, v. 85, p. 997-1001, 2015.
- KUMAR, P. N. et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with altered CD8⁺ T and natural killer cell function in pulmonary tuberculosis. **Immunol.**, v. 144, p. 677–686, 2014.
- LAMKANFI, M. et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 Inflammasome. **J. Cell. Biol.**, v. 187, n. 1, p. 61–70, 2009.
- LIU et al. Sulphonylurea Usage in Melioidosis Is Associated with Severe Disease and Suppressed Immune Response. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 4, e2795, 2014.
- MACEDO, G.M.C.; NUNES, S.; BARRETO, T. Skin disorders in diabetes mellitus: an epidemiology and physiopathology review. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v. 8, n. 63, 2016.
- MACHADO P. et al. Evidence of in situ cytotoxicity in american cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Dermatol.**, v. 12, p. 449-451, 2002.
- MATSUI, Y. et al. Metformin Reduces Body Weight Gain and Improves Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. **Biol. Pharm. Bull.**, vol. 33, n. 6, p. 963— 970, 2010.
- MIYAKODA, M. et al. Metformin Promotes the Protection of Mice Infected With *Plasmodium yoelii* Independently of $\gamma\delta$ T Cell Expansion. **Front. Immunol**, v. 9, p. 2942, 2018.
- MORANTES-CABALLERO, J.A. et al. Metformin: beyond the glycemic target. **Medicas. UIS.**, v. 30, n.1, p. 57-71, 2017.
- MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol. Rev.**, v. 240, p. 286-296, 2011.
- NICLOT, J. et al. Des ulcérations de cheville et du pied chez un diabétique révélant une leishmaniose cutanée. **J. Mal. Vascul.**, v. 39, n. 6, p. 430–433, 2014.
- NOVAIS, F. O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **J. Infect. Dis.**, v. 209, p. 1288–1296, 2014.
- OCHOA-GONZALEZ, F. et al. Metformin Induces Cell Cycle Arrest, Reduced Proliferation, Wound Healing Impairment *In Vivo* and Is Associated to Clinical Outcomes in Diabetic Foot Ulcer Patients. **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0150900, 2016.
- OUMEISH, O. Y. Skin disorders in patients with diabetes. **Clin. Dermatol.**, v. 26, p. 235-242, 2008.
- PETERS, N. C. et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Sci.**, v. 321, n. 5891, p. 970-4, 2008.

- QING, L. et al. Metformin induces the M2 macrophage polarization to accelerate the wound healing via regulating AMPK/ mTOR/NLRP3 inflammasome signaling pathway. **Am. J. Transl. Res.**, v. 11, n. 2, p. 655-668, 2019.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- ROCHA, F. J. et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 3823–3832, 2007.
- RUIZ, J. H., BECKER, I. CD8 cytotoxic t cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 29, p. 671-678, 2007.
- SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell. Microbiol.**, v. 3, n. 4, p. 189-196, 2001.
- SALDANHA, M. G. et al. Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 3, p. 16-0536, 2017.
- SANT'ANNA, J.R. et al. Assessment of *In Vivo* and *In Vitro* Genotoxicity of Glibenclamide in Eukaryotic Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, e0120675, 2015.
- SANTOMAURO, J.A. C et al. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 52, n. 1, p. 120–5, 2008.
- SANTOS, C. S. et al. CD8 (+) Granzyme B (+) - mediated tissue injury vs. CD4 (+) IFN γ (+) - mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 133, p. 1533-1540, 2013.
- SAVILL, J. et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 12, p. 965-75, 2002.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 581–592, 2016.
- SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, n.3, p. 471-478, 1994.
- SINGHAL, A. et al. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. **Sci. Transl. Med.**, 2014.
- SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **FASEB J.**, v. 24, n. 8, p. 2596-2611, 2010.
- TAJIMA, K. et al. Metformin prevents liver tumorigenesis induced by high-fat diet in C57Bl/6 mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 305, n. 8, p. 987-998, 2013.

TSENG, C. H. Metformin and risk of hepatocellular carcinoma in patients with type 2 diabetes. **Liver. Int.**, v. 38, n. 11, p. 2018-2027, 2018.

van ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, v.173, n. 11, p. 6521-5, 2004.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. **J. Immunol.**, v. 180, p. 7537-7545, 2008.

VASAMSETTI, SB et al. Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. **Diabetes.** v. 64, n. 6, p. 2028-41, 2015.

WANG, J. C. et al. Metformin's antitumour and anti-angiogenic activities are mediated by skewing macrophage polarization. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 22, p. 3825–3836, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes country profiles, 2016. Disponível: <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/bra_en.pdf?ua=1>. Acesso: fev 2017.

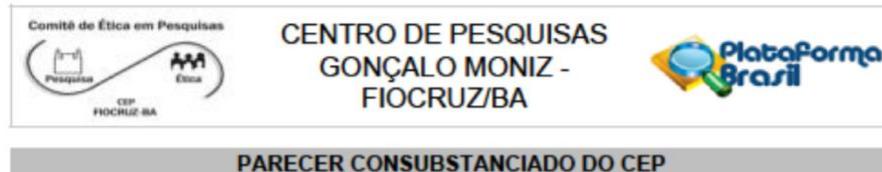
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes programme. Disponível: <<http://www.who.int/diabetes/en/>>. Acesso: fev 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. France, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível: <<http://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>>. Acesso: fev 2017.

ANEXOS

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM BIÓPSIAS DE PACIENTES DIABÉTICOS COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA

Pesquisador: Sérgio Marcos Arruda

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 70752317.9.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.434.208

Apresentação do Projeto:

Um estudo de caso-controle será realizado utilizando biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) atendidos no Centro de Saúde de Corte de Pedra. Os grupos de pacientes com LCL serão categorizados conforme diagnóstico de DM e quanto ao uso de hipoglicemiante oral objetivando caracterizar comparativamente os aspectos histopatológicos. O proponente afirma que os resultados podem contribuir com estratégias para melhor prognóstico do paciente e no surgimento da ulceração cutânea. Assim como, corroborar para o estudo dos mecanismos da DM e seus medicamentos nos processos de defesa do hospedeiro contra infecção e doença por um parasito e no estabelecimento da inflamação. DM apresenta-se por favorecer um pior prognóstico das manifestações clínicas de doenças infecciosas cutâneas, sendo assim, pesquisas são necessárias para avaliar a susceptibilidade à doença, interferência na resposta imune do hospedeiro e efeito da medicação hipoglicemiante na formação da resposta inflamatória. Níveis elevados de glicose são associados a glicação de proteínas, interferências funcionais e estruturais na célula e indução da resposta inflamatória. Os hipoglicemiantes possuem ação anti-inflamatória.

Objetivo da Pesquisa:

- Objetivo Primário:

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
 Bairro: Candeal CEP: 40.295-710
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

ANEXO 2 - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 013/2017

PROJETO: "AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE METFORMINA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA TECIDUAL EM MODELO MURINO DE OBESIDADE E DIABETES TIPO 2 INFECTADOS COM L. braziliensis"

COORDENADOR: Dr. Sérgio Arnuda

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo Balb/c	30
Camundongo C57BL/6	30

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotada pela Lei 11.794/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 22/08/2017, e tem validade até 22/08/2019.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at: 08/22/2017, being valid until 08/22/2019.

SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:

Vigência: 22/08/2017 a 22/08/2019.

Envio do Relatório Anual: 23/08/2018.

Relatório Final: 23/08/2019.

Salvador, 22 de agosto de 2017.

Daniel Pereira Bezerra
DANIEL PEREIRA BEZERRA

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Dr. Daniel P. Bezerra
Pesquisador - FIOCRUZ-BA
Mat. SIAPE: 1638392

Comissão de Ética No Uso de Animais - Rua Marcellino Freixo, nº 121, Cidade, Salvador, Bahia CEP 40296-710, Brasil
Tel. (71) 3176-2265
E-mail: ceua@bahia.fiocruz.br

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa intitulada “Avaliação da resposta inflamatória em biópsias de pacientes diabéticos com leishmaniose cutânea localizada” coordenado pelo Dr. Sérgio Marcos Arruda. O objetivo da pesquisa é avaliar a pele e quantificar estruturas e substâncias (células e citocinas) responsáveis pela defesa, que se encontram na pele lesionada e agem contra o parasito que causa leishmaniose.

Para isso, caso o(a) Sr(a) concorde em participar desta pesquisa, sua participação constará em responder a um questionário específico e doar parte da biópsia de pele retirada para o diagnóstico, para os exames laboratoriais da pesquisa. Se for da vontade do(a) Sr(a), todo o excedente do material retirado será armazenado para eventuais confirmações dos resultados ou para pesquisas futuras, desde que aprovado pelo Comitê de Ética. Ressalto ainda que, caso seja da sua vontade, o Sr(a) será novamente consultado para obter um novo consentimento para uso de sua amostra de tecido no(s) estudo(s) futuro(s). Todos os procedimentos citados serão realizados apenas uma única vez, não necessitando de um segundo retorno ao centro de saúde.

Alguns dados referentes aos procedimentos de rotina feitos no centro de saúde serão retirados do seu prontuário, tais como o resultado da avaliação dermatológica e clínica, como tamanho da lesão, resultados de exames complementares e histórico de saúde.

A coleta da biópsia será realizada com material estéril, uso de anestésico local e por profissional qualificado, podendo provocar um pequeno desconforto temporário causado pela retirada da pele, queimor e, muito raramente hematoma (roxo), que habitualmente melhora em algumas horas ou poucos dias.

A participação do(a) Sr(a) neste estudo não trará benefício diretos ao seu problema. Entretanto, o conhecimento obtido a partir destes testes poderá contribuir para um melhor conhecimento da resposta imunológica contra o agente causador da leishmaniose. Sua participação neste estudo é voluntária, você pode se recusar a participar em qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer constrangimento, penalidade e não cause prejuízo ao seu tratamento ou conduta clínica. O grupo de pesquisa se compromete em custear transporte e alimentação para os participantes do estudo e também seus acompanhantes, caso seja necessário deslocamento devido às atividades do projeto de pesquisa.

O(a) Sr(a) pode solicitar esclarecimentos e tirar dúvidas a qualquer momento com o pesquisador responsável pelo estudo Dr. Sérgio Arruda (telefone para contato: 3176-2310 ou 3176-2232) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do IGM/FIOCRUZ, Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-Ba, CEP: 40296-710.

Além disso, qualquer informação divulgada durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Sua identidade será preservada e nenhum resultado obtido com esta pesquisa conterà o seu nome.

Este termo é composto de duas vias de igual conteúdo, sendo a primeira para arquivamento pelo pesquisador coordenador e a segunda para o voluntário. Se aceitar participar do estudo, por favor, assine ao final do documento concordando em fazer parte da pesquisa.

1. Autorizo o armazenamento do meu material biológico (fragmento de pele) para eventuais confirmações dos resultados. Ou para fins de pesquisas futuras, desde que aprovados pelo Comitê de Ética:

Sim Não

Eu, _____, RG: _____, reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar deste estudo por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa.

Estou ciente de que receberei resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionado com a pesquisa a que serei submetido. Minha colaboração se fará de forma anônima, por meio de doação da biópsia e das informações a respeito da minha saúde. Os dados coletados serão mantidos em absoluto sigilo.

Fui ainda informado(a) que todas as informações serão mantidas de forma anônima e que posso me retirar deste estudo a qualquer momento, sem prejuízo para meu acompanhamento e da minha família, bem como, não sofrerei quaisquer sanções ou constrangimentos. A minha não participação na pesquisa não afetará, de forma alguma, a minha conduta clínica.

Salvador, ____/____/____

Nome: _____

Assinatura: _____

Impressão datiloscópica :



Assinatura do Pesquisador responsável: _____

ANEXO 4 - ARTIGO 1 PUBLICADO DURANTE O MESTRADO NO PGPAT

844 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 112(12): 844-849, December 2017

ELISA-based assay of immunoglobulin G antibodies against mammalian cell entry 1A (Mce1A) protein: a novel diagnostic approach for leprosyFilipe R Lima^{1,2,*}, Iukary Takenami¹, Maurílio AL Cavalcanti³, Lee W Riley⁴, Sérgio Arruda^{1,2}¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório Avançado de Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil²Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil³Hospital Couto Maia, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brazil⁴University of California, School of Public Health, Division of Infectious Diseases and Vaccinology, Berkeley, CA, USA

BACKGROUND Leprosy is a chronic infectious disease caused by the obligate intracellular bacillus *Mycobacterium leprae*. Because leprosy diagnosis is complex and requires professional expertise, new tools and methodologies are needed to detect cases in early stages and prevent transmission. The *M. leprae* genome contains *mce1A*, which encodes a putative mammalian cell entry protein (Mce1A). We hypothesised that the presence of Mce1A on the cell surface could be detected by the host's immune system.

OBJECTIVE The aim of this study was to evaluate antibody responses against the Mce1A protein in leprosy patients, household contacts of patients, and the general population to present an addition tool for leprosy diagnosis.

METHODS A cross-sectional study involving 89 volunteers [55 leprosy cases, 12 household contacts (HHC) and 22 endemic controls (EC)] was conducted at Couto Maia Hospital, in Salvador, Bahia (BA), Brazil.

RESULTS The median anti-Mce1A IgA was significantly higher in multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) cases than in EC ($p < 0.0001$). A similar trend was observed in IgM levels, which were significantly higher in both MB ($p < 0.0001$) and PB ($p = 0.0006$) groups compared to in EC individuals. The greatest differences were observed for IgG class-specific antibodies against Mce1A. The median levels of MB and PB were significantly higher compared to both controls HHC and EC (MB or PB vs EC, MB vs HHC $p < 0.0001$; PB vs HHC, $p = 0.0013$). Among leprosy cases, IgG enzyme-linked immunosorbent assay sensitivity and specificity were 92.7% and 97.1%, respectively. IgG positivity was confirmed in 92.1% and 94.1% of MB and PB patients, respectively.

CONCLUSION This novel diagnostic approach presents an easy, non-invasive, and inexpensive method for leprosy screening, which may be applicable in endemic areas.

Key words: leprosy - antibodies - Mce1A protein - diagnosis - immunoglobulin

Leprosy, a disabling chronic infectious disease, is caused by the obligate intracellular bacillus *Mycobacterium leprae* and remains a public health problem in endemic areas of developing countries, such as Brazil (Rodrigues & Lockwood 2011). *M. leprae* tropism in reticuloendothelial and Schwann cells results in infection, mainly affecting the skin, peripheral nerves, mucosa of the upper respiratory tract and eyes (Eichelmann et al. 2013, WHO 2016). Skin lesions, neuropathological involvement resulting in loss of peripheral motor function, and deformities are historically responsible for the social stigma associated with this disease (Eichelmann et al. 2013).

According to official reports from 121 countries, the global registered prevalence of leprosy was 213,899 in 2014. This number of new cases indicates the high rate of continued transmission of infection by *M. leprae* (WHO 2016). The nasal mucosa is the most common route of transmission of the bacillus during close and frequent contact with leprosy patients (Martins et al. 2010). Ac-

cordingly, the early detection of disease spread and effective treatment with standard multidrug therapy is an important strategy for controlling leprosy (Rodrigues & Lockwood 2011). However, the WHO global strategy for reducing the leprosy burden may be unsuccessful without improved diagnostic tools.

Diagnosing leprosy is difficult and professional expertise is required to differentiate this disease from other skin diseases, including vitiligo, hypochromic eczematides, tinea corporis, and pityriasis versicolor (Yang et al. 2013). The diagnosis of leprosy is based on clinical examination, bacilloscopy of the dermal lymph, and histopathology of skin lesion biopsies (WHO 2016). Although bacilloscopy and histopathology are highly specific, these techniques show low sensitivity (Amorim et al. 2016). Moreover, negative results do not exclude the diagnosis of leprosy (MS 2002). In addition, histopathology presents technical and practical limitations such as the invasive nature of this method and need for specific laboratory equipment.

M. leprae has been shown to reprogram macrophage differentiation, contributing to persistence of the bacillus in the host (Batista-Silva et al. 2016). Although modulation of immune mechanisms by mycobacteria have been comprehensively studied (Koul et al. 2004), we hypothesised that after infection, *M. leprae* facilitates changes in its environment to survive in the host by modifying the antigens in the mycobacterial wall. Proteins found in the bacillary cell wall are the first to interact with host immune cells; i.e., these

doi: 10.1590/0074-02760160549

Financial support: CNPq

* Corresponding author: rfilipe@fiocruz.br

Received 22 December 2016

Accepted 11 July 2017

online | memoriae.icp.fiocruz.br

ANEXO 5 – ARTIGO 2 PUBLICADO DURANTE O MESTRADO NO PGPAT

66

Bomfim LM, Espírito Santo RF, Quadros HC, Orge CTDM, Carneiro RTO, Magalhães CP, Lima FR

**ENSINO POR INVESTIGAÇÃO EM IMUNOLOGIA:
AS CÉLULAS DE DEFESA E SEUS MECANISMOS
EFETORES FRENTE A DOENÇAS ESPECÍFICAS**
RESEARCH-LED TEACHING IN IMMUNOLOGY: DEFENSE CELLS AND
THEIR EFFECTOR MECHANISMS AGAINST SPECIFIC DISEASES

**Larissa Mendes Bomfim
Renan Fernandes do Espírito Santo
Helenita Costa Quadros
Cibele Tereza Deolinda Machado Orge
Rita Terezinha de Oliveira Carneiro
Carla Pires Magalhães
Filipe Rocha Lima**

Instituto Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz
(IGM/FIOCRUZ).

E-mail: rfilipelima@gmail.com

RESUMO

Introdução: O tipo de metodologia de ensino amplia as possibilidades dos alunos em reter o conteúdo. As metodologias ativas surgem como alternativa para os alunos participarem ativamente da construção do seu conhecimento, assim como, estimular as funções mentais de pensar, raciocinar, combinar, refletir, entender e observar. **Objetivo:** O trabalho objetiva propor uma atividade de investigação para a disciplina de imunologia, para estudantes de graduação, com a finalidade de discutir as funções das células imunológicas em doenças. **Metodologia:** O trabalho foi consolidado com a proposta de uma atividade fundamentada no ensino por investigação com o tópico resposta imunológica aos patógenos e os mecanismos efetores das células imunes nas doenças. **Resultados:** A aplicação do conteúdo sobre funções das células do sistema imune e seus mecanismos de mediação e resposta foi melhor assimilado quando utilizamos ferramentas de metodologia ativa, que nesse contexto está configurada na elaboração e excursão do jogo "Perfil Imunológico".

Palavras-chave: Imunologia; Ensino; Doenças; Investigação; Perfil Imunológico.