



NAYHANE CAROLINE ANDRADE

**IMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis*
EM MODELOS DE DIABETES MELLITUS INDUZIDO**

LAVRAS – MG

2019

NAYHANE CAROLINE ANDRADE

**IMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis*
EM MODELOS DE DIABETES MELLITUS INDUZIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador

Prof. Dr. Thales Augusto Barçante

Coorientadora

Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante

LAVRAS – MG

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Nayhane Caroline.

Implicações da infecção por *Leishmania amazonensis* em modelos de diabetes mellitus induzido / Nayhane Caroline Andrade. - 2019.

78 p.: il.

Orientador (a): Thales Augusto Barçante.

Coorientador (a): Joziana Muniz de Paiva Barçante.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Hiperglicemia. 2. Leishmaniose tegumentar. 3. Fibra dietética. I. Barçante, Thales Augusto. II. Barçante, Joziana Muniz de Paiva. III. Título.

NAYHANE CAROLINE ANDRADE

**IMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis*
EM MODELOS DE DIABETES MELLITUS INDUZIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias.

APROVADA em 26 de abril de 2019.

Dr. Thales Augusto Barçante - UFLA

Dra. Ana Paula Peconick - UFLA

Dra. Maria de Fátima Martins Horta - UFMG

Orientador

Prof. Dr. Thales Augusto Barçante

Coorientadora

Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante

LAVRAS – MG

2019

Dedico esta dissertação às pessoas mais presentes em minha vida:

Minha mãe, pelo exemplo de vida e por ser a melhor mãe do mundo.

Meu pai, por cuidar sempre de nós.

Minhas irmãs, Renata, Márcia e Nayhara, meus amores.

Ao meu sobrinho Pedro, minha maior alegria.

Pedro, por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos.

Minha avó Maria, meu tesouro.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o centro e o fundamento de tudo em minha vida, que me concedeu a cada dia sabedoria, saúde, confiança e força para seguir e completar essa jornada. À Santa Teresinha do Menino Jesus, doutora da Igreja, por derramar sempre chuvas de bênção sem minha vida!

À minha mãe Célia e ao meu pai Geraldo, que sempre esteve e estão ao meu lado me apoiando, me dando forças para seguir. Que com muito amor e carinho me deram a melhor educação, me ensinando valores e princípios que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs Renata, Márcia e Nayhara, que estão sempre me apoiando e cuidando de mim, com muito amor e carinho.

À minha avó Maria, pelos conselhos e pelas orações, que me deram forças para seguir em todos os momentos de dificuldades.

Ao meu noivo Pedro, pelo apoio e amor incondicional, por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todas as decisões.

Ao meu sobrinho Pedro, por todo carinho, amor e alegrias.

Aos meus tios e tias, em especial Tia Nem e Dedé, agradeço pelo amor e carinho e por me ajudarem sempre que possível.

Aos meus cunhados, em especial ao Gilvani, por todo carinho e afeto incondicional.

A todos os amigos que ajudaram na condução deste trabalho, em especial ao Léo e ao Diego, que foram anjos em minha vida. Com vocês aprendi o que é pesquisa! Agradeço muito a vocês não só pela ajuda profissional, mas pela ajuda pessoal. Durante esse período longe de casa, vocês se tornaram minha segunda família. Obrigada por terem me ensinado tanto!!!

À Michelle, por toda ajuda, mesmo de longe, e pelos lanches deliciosos no laboratório!

Aos demais integrantes do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, internos ou externos, em especial à Clarinha, Ana Elisa, Carlos, Vilma, obrigada pela ajuda, pelos momentos de aprendizado e também pelos momentos de distração.

Ao meu orientador professor Dr. Thales e à minha co-orientadora professora Dra. Joziana, obrigada por acreditarem em meu potencial, pela orientação, ensinamentos e por terem me proporcionado essa experiência incrível.

À professora Dra. Leda, por me acolher em seu laboratório, pela oportunidade de conviver com pessoas tão especiais. Agradeço pelas orientações, ensinamentos, por toda ajuda durante esse período.

Ao professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, pelo apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas Mariana e Nathália, vocês plantaram essa sementinha de pesquisadora em mim. Obrigada por todos os ensinamentos, pela amizade, por todas as conversas, pela paciência, pelo carinho e por serem excelentes professoras e profissionais.

Ao departamento de Ciências da Saúde e ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Núcleo de estudos em Parasitologia (NEP), obrigada pelos bons momentos de convivência e aprendizagens.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo desses dois anos de mestrado.

Aos membros que compõem a banca, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação, obrigada pela oportunidade de discussão deste trabalho e pela possibilidade de enriquecimento do mesmo.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!!!

RESUMO GERAL

A leishmaniose é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e a interação desses com o sistema imunológico do hospedeiro resulta em um amplo espectro de apresentações clínicas e imunopatológicas. O Diabetes mellitus (DM) pode alterar negativamente a resposta imunológica, levando a uma maior susceptibilidade a infecções. Imunomoduladores como os β -glucanos (BG) vem sendo utilizados no controle da glicemia e em infecções parasitárias. Considerando a escassez de estudos que avaliam o curso da leishmaniose correlacionada a DM, além do uso do BG de *Saccharomyces cerevisiae* nessa infecção, o presente estudo objetivou avaliar as consequências do DM induzido e do BG de *S. cerevisiae*, na infecção por *Leishmania amazonensis* em modelos experimentais. Para a realização dos experimentos utilizou-se camundongos C57BL/6 e macrófagos derivados de monócitos de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos. A indução do DM se deu através da administração de estreptozotocina (STZ). Os animais foram infectados por *L. amazonensis* em cada orelha. Foi realizada análise histopatológica do pâncreas. As citocinas foram avaliadas pelo teste de ELISA. Já o acúmulo de nitrito (NO_2), foi avaliado utilizando o reagente de Griess, avaliou-se também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os animais tratados com STZ apresentaram um aumento significativo da glicemia, além de uma redução significativa das ilhotas de Langerhans, em relação aos animais tratados apenas com tampão de citrato. Os BMDMs de camundongos diabéticos apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*, não sendo capaz de controlar a multiplicação parasitária nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção, apresentando dessa forma maior índice de infecção. A presença do DM aumentou a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*, uma vez que os animais diabéticos não conseguiram controlar a carga parasitária nas lesões na quarta semana de infecção, sendo essa significativamente maior, quando comparada aos animais controles. Com relação ao BG de *S. cerevisiae*, esse foi eficaz no controle da carga parasitária dos macrófagos derivados de camundongos controles e diabéticos, reduzindo o índice de infecção em ambos os macrófagos. Dessa forma, os resultados sugerem que a presença do diabetes mellitus influencia de maneira negativa a infecção por *L. amazonensis*, podendo aumentar a susceptibilidade a essa infecção, além disso, o BG foi eficaz na diminuição da carga parasitária de BMDMs de camundongos controles e diabéticos.

Palavras-chaves: Leishmaniose tegumentar; Hiperglicemia; Polissacarídeos, Fibra dietética.

GENERAL ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by different protozoan species of the gender *Leishmania* and their interaction with the host's immune system results in a broad spectrum of clinical and immunopathological presentations. Diabetes mellitus (DM) may adversely affect the immune response, leading to increased susceptibility to infections. Immunomodulators such as β -glucans (BG) have been used in the control of blood glucose and in parasitic infections. Considering the scarcity of studies evaluating the course of leishmaniasis infections correlated to DM, in addition to the use of *Saccharomyces cerevisiae* BG in this infection, the present study aimed to evaluate the consequences of induced DM and *S. cerevisiae* BG on *Leishmania amazonensis* infection in experimental models. C57BL/6 mice and bone marrow derived macrophages (BMDMs) from conventional and diabetic C57BL/6 mice were used for the experiments. The induction of DM was through administration of streptozotocin (STZ). The animals were infected by *L. amazonensis* in each ear. It was performed histopathological analysis of the pancreas. Cytokines were evaluated by ELISA. The accumulation of nitrite (NO₂) was evaluated using the Griess reagent. The production of reactive oxygen species (ROS) was also evaluated. Animals treated with STZ showed a significant increase in glycemia, in addition to a significant reduction of islets of Langerhans, compared to animals treated with only citrate buffer. The BMDMs of diabetic mice were more susceptible to infection by *L. amazonensis* and were not able to control parasite multiplication at 48 and 72 hours post infection, thus presenting a higher rate of infection. The presence of DM increased susceptibility to *L. amazonensis* infection, as diabetic animals were unable to control the parasite load on the lesions in the fourth week of infection, which was significantly higher when compared to conventional mice. About *S. cerevisiae* BG, this was effective in controlling the parasitic load of macrophages derived from conventional and diabetic mice, reducing the infection rate in both macrophages. Thus, the results suggest that the presence of diabetes mellitus negatively influences *L. amazonensis* infection and may increase the susceptibility to this infection, in addition, BG was effective in reducing the parasitic burden of BMDMs of conventional and diabetic mice

Keywords: Tegumentary leishmaniasis; Hyperglycemia; Polysaccharides, Dietary fiber.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Figura 1 Representação esquemática do delineamento experimental ao longo do tempo.....	43
Figura 2 Glicemia, consumo alimentar e variação do peso de camundongos C57BL/6 diabéticos e controles, antes da infecção e na quarta semana após a infecção por <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 3 A indução de diabetes mellitus, utilizado STZ, reduziu a área das ilhotas de Langerhans em camundongos C57BL/6.	54
Figura 4 BMDMs de camundongos C57BL/6 diabéticos são mais suscetíveis à infecção por <i>L. amazonensis</i>	55
Figura 5 Avaliação das concentrações de IL-10, TNF, IL-1 β , CXCL1 e CXCL2 no sobrenadante de BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabético	57
Figura 6 β -glucano de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> reduz carga parasitária de BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos.	60
Figura 7 Desenvolvimento e aspectos das lesões cutâneas, quantificação da carga parasitária e atividade de arginase I nas orelhas de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos infectados por <i>L. amazonensis</i>	62
Figura 8 Aspectos das lesões cutâneas nas orelhas de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos infectados por <i>L. amazonensis</i>	63
Figura 9 Avaliação das concentrações de IL-10 e IFN- γ em células dos linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos infectados por <i>L. amazonensis</i>	64
Figura 10 Avaliação das concentrações de IL-10, IFN- γ , TNF e IL1- β nas orelhas de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos por <i>L. amazonensis</i>	65

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Tabela 1 Descrição dos grupos experimentais.....	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BG: β -glucanos

BMDM: Bone Marrow-derived Macrophage (Macrófagos de medula óssea)

DM: Diabetes mellitus

FIZZ1: molécula alfa 1 semelhante à resistina (encontrada na zona inflamatória)

IFN- γ : Interferon gamma

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido nítrico sintase indutível)

LPS: Lipopolissacarídeo

LT: Leishmaniose tegumentar

LV: Leishmaniose visceral

NK: Natural Killer

NO: Nitric oxide (Óxido nítrico)

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PRR: Patterns recognition receptors (Receptores de reconhecimento de padrões)

ROS: Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)

STZ: streptozotocin (estreptozotocina)

Th1: Type 1 T helper cells (Células T auxiliares do tipo 1)

Th2: Type 2 T helper cells (Células T auxiliares do tipo 2)

TNF: Tumor necrose factor (Fator de necrose tumoral)

YM1: proteína semelhante à chitinase 3

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Leishmanioses	14
2.2 Resposta imunológica nas leishmanioses.....	16
2.3 Diabetes mellitus	19
2.4 Diabetes mellitus e o sistema imunológico	20
2.5 β-Glucanos.....	23
2.5.1 Atividade imunomodulatória dos β-glucanos	24
2.6 Modelo animal experimental de diabetes mellitus e leishmanioses	25
3. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	39
Introdução.....	41
Material e métodos.....	43
Resultados	52
Discussão	65
Conclusão	71
Referências	72

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas pela infecção de diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que acomete humanos e outros mamíferos. As manifestações clínicas da leishmaniose dependem das espécies do parasito e do estado imunológico do hospedeiro. Essas manifestações incluem leishmaniose cutânea localizada, mucocutânea, cutânea difusa, disseminada e leishmaniose visceral (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2019; DIOTALLEVI et al., 2018; GRIMALDI; TESH, 1993). Espécies como *L. donovani* e *L. infatum* causam leishmaniose visceral, enquanto *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são geralmente associadas à doença cutânea e mucosa (ALMEIDA et al., 1996).

No que diz respeito à infecção humana, a interação entre *Leishmania* e o sistema imunológico do hospedeiro resulta em um amplo espectro de apresentações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas (GOMES et al., 2017). Efeitos protetores contra infecções por *Leishmania* foram identificados sendo mediados por várias células, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células T CD4⁺ e CD8⁺ e células natural killer (NK), bem como algumas citocinas (GARDINASSI, et al., 2017; KIMA; SOONG, 2013; SANTOS; BRODSKY, 2014).

O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças que está associado a vários distúrbios metabólicos, sendo a hiperglicemia crônica, devido à insuficiência da secreção e/ou ação da insulina, sua principal característica. Sua patogênese envolve fatores genéticos e ambientais e está associada a uma ampla gama de apresentações clínicas, desde assintomático até cetoacidose ou coma (WHO, 2018; SEINO et al., 2010).

Pacientes diabéticos apresentam alterações na função de células do sistema imunológico, incluindo neutrófilos, macrófagos e monócitos. Esses pacientes exibem uma maior susceptibilidade a infecções, uma vez que apresentam quimiotaxia leucocitária prejudicada, diminuição da atividade microbida e expressão alterada de citocinas (MOWAT; BAUM, 1971; SIMA et al., 1998).

Algumas fibras alimentares possuem ação hipoglicemiante e hipolipidêmica, principalmente por atuar diretamente no trato gastrointestinal, formando uma camada

protetora, produzindo uma redução na absorção de carboidratos e lipídios (LOBATO et al., 2015). Entre essas fibras, podemos destacar os β -glucanos que são polissacarídeos encontrados na composição de cereais, fungos, leveduras e bactérias (SAMUELSEN; SCHREZENMEIR; KNUTSEN, 2014).

Além do controle da glicemia e colesterol sanguíneo, os β -glucanos são denominados imunomoduladores, melhorando a fagocitose e a produção de citocinas (KIM et al., 2011; VETVICKA, 2011). Esses polissacarídeos vêm sendo estudados tanto na leishmaniose visceral, quanto em leishmaniose tegumentar e estão sendo responsáveis pela diminuição da carga parasitária em órgãos como fígado e baço, e pela diminuição da espessura de lesões cutâneas (GHOSH et al., 2013; YATAWARA et al., 2009).

Considerando que DM leva a diminuição na função do sistema imunológico, aumentando a suscetibilidade e a gravidade de várias doenças, o estudo da correlação entre esse distúrbio metabólico e doenças infecciosas e parasitárias é de extrema importância. Além disso, o uso de fibras imunomoduladoras como os β -glucanos, pode ser uma terapêutica eficaz tanto para o controle glicêmico, como para melhorar a ação do sistema imunológico. Porém, até o momento existe uma escassez de trabalhos que relatam os efeitos imunomoduladores dos β -glucanos em infecções por *L. amazonensis*, além de estudos que apontam a evolução da leishmaniose correlacionada ao DM, o que torna relevante a investigação proposta neste trabalho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

A leishmaniose é ainda uma das doenças mais negligenciadas do mundo, presente, sobretudo, nos países em desenvolvimento (SOOSARAEI et al., 2018), estando relacionada às mudanças ambientais como desmatamento e urbanização. Anualmente, ocorrem cerca de 700 mil a 1 milhão de novos casos de leishmaniose, ocasionando de vinte a trinta mil mortes (WHO, 2018).

As leishmanioses foram agrupadas em duas grandes categorias de acordo com a manifestação clínica: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), que agrupa as leishmanioses cutânea localizada, mucocutânea, cutânea difusa (GRIMALDI; TESH, 1993) e disseminada (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2019).

A LV apresenta a forma de maior gravidade, que pode levar a complicações sistêmicas, e sintomas como hepatoesplenomegalia, febre irregular e prolongada, anemia e perda de peso, podendo levar o indivíduo a morte quando não tratada (DAS et al., 2016; WHO, 2010; WHO, 2018). Já a LT apresenta, frequentemente, lesões cutâneas expansivas e persistentes, e o tipo de lesão, a eficiência do tratamento, o tempo de cicatrização, varia de acordo com a etiologia (WHO, 2010; WHO, 2018).

Entre as doenças parasitárias, as leishmanioses, somando os casos de LT e LV, são a segunda causa mais importante de mortalidade, perdendo somente para a malária. Com relação à morbidade em diferentes faixas etárias, são a terceira causa após a malária e esquistossomose, sendo que crianças com menos de 15 anos de idade sofrem a maior parte da carga da doença (SAVOIA, 2015).

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas crônicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que são parasitos intracelulares obrigatórios no hospedeiro vertebrado (ALEXANDER; BRYSON, 2005; DESJEUX, 2004; VIJAYAKUMAR; DAS, 2018). O parasito apresenta diferentes estágios de desenvolvimento; a forma amastigota e a forma promastigota. A amastigota infecta células fagocíticas de um hospedeiro vertebrado, enquanto que a promastigota é uma forma extracelular que se liga aos microvilos intestinais do intestino médio do inseto vetor (CLABORN, 2010).

A principal forma de transmissão de *Leishmania* para humanos e outros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae,

conhecidos genericamente por flebotomíneos (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; GONTIJO; MELO, 2004). Estas realizam o repasto sanguíneo para suporte nutricional, para postura de seus ovos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014) e, ao realizar a hematofagia em um animal ou pessoa infectada, pode ingerir formas amastigotas do parasito presente em células infectadas (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

No intestino médio do inseto, no interior da matriz peritrófica, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, essas são formas replicativas, possuem baixa motilidade e o flagelo se encontra na extremidade anterior do corpo (BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Cerca de 48 a 72 horas após, os parasitos começam a diminuir sua replicação e se diferenciam em promastigotas nectomonadas, que são formas longas, migratórias, com alta motilidade, o que permite que essas formas escapem da matriz peritrófica e alcance a válvula estomodal, uma estrutura que separa o intestino anterior do médio. Nesse momento as promastigotas nectomonadas se transformam em promastigotas leptomonadas, formas menores e replicativas, que secretam o gel secretor da promastigota (BATES, 2007; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002).

O gel secretor da promastigota interfere no repasto sanguíneo, uma vez que obstrui a região anterior do intestino, o que faz com que o inseto realize constantes repastos, além de, juntamente com a saliva do vetor, exacerbar a infecção na pele do hospedeiro (BATES, 2008; ROGERS et al. , 2004). Posteriormente, as promastigotas leptomonadas se transformam em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002).

2.1.1 Leishmaniose tegumentar (LT)

A LT é caracterizada como um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos nos continentes Americano, Europeu, Africano e Asiático, com registro anual de 0,7 a 1,3 milhões de casos (BRASIL, 2017). É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, uma vez que apresenta um elevado coeficiente de detecção e um elevado grau de deformidades (BRASIL, 2010; 2017).

Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. O Brasil está entre os seis países com o maior número de casos de leishmaniose cutânea, além disso, mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2018).

Nas Américas, são reconhecidas atualmente 12 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras da doença humana. No Brasil, sete espécies já foram identificadas, contudo, os principais agentes causais identificados da LT são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) lindenberg* e *L. (Viannia) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017).

Os vetores da *Leishmania* são insetos denominados flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, e somente as fêmeas alimentam-se de sangue (BRASIL 2010). Algumas espécies de ratos, gambá, tamanduá, preguiça, tatu e canídeos silvestres já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais (AKHOUNDI et al., 2017).

O padrão clínico da doença em humanos inclui a leishmaniose cutânea, a leishmaniose cutânea difusa, disseminada e a leishmaniose mucocutânea (KEVRIC; MARK; KEELING, 2015). As manifestações clínicas variam desde úlceras eritematosas indolores, com bordas elevadas e limitadas, fundo granulomatoso com ou sem exsudação, a múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco. Quanto ao diagnóstico da LT, é recomendado realizar sempre que possível, o diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial (testes sorológicos e parasitológicos) (BRASIL, 2010; 2017). A LT é uma das afecções dermatológicas que mais necessita de atenção no Brasil, devido a sua elevada ocorrência e risco de causar deformidades ao ser humano, o que leva a um envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico (OLIVEIRA; FIGUEIREDO; BRAGA, 2014).

2.2 Resposta imunológica nas leishmanioses

Como na maioria das infecções, a resposta imune à *Leishmania* depende de vários fatores do hospedeiro, bem como das diferenças entre as espécies envolvidas. Pacientes que exibem alto número de parasitos dentro das lesões, o que é uma consequência dos baixos níveis de citocinas Th1, apresentam uma doença grave chamada leishmaniose cutânea difusa. No outro extremo, pacientes com uma resposta imune Th1 exacerbada, desenvolvem um fenótipo de doença conhecido como leishmaniose mucocutânea. Entre esses extremos estão os pacientes que apresentam lesões que se desenvolvem para a autocura, com níveis intermediários de respostas de células T (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Infecções experimentais por *L. major* são muito utilizadas como modelo para o entendimento de fatores relacionados à resistência ou à susceptibilidade em infecções por parasitos intracelulares. Neste modelo, a polarização para uma resposta Th1 está associada à resistência a infecção, enquanto que a polarização para Th2 está relacionada com a susceptibilidade (NOBEN-TRAUTH et al., 2003).

A resistência a infecção por *L. major* é conferida por uma resposta imune protetiva Th1, que advém da ativação de macrófagos por células T auxiliares produtoras de IFN- γ que, em sinergia com TNF proveniente de macrófagos e células T auxiliares, induz a produção de óxido nítrico (NO), levando o parasito a morte (GREEN et al., 1990b). No modelo de susceptibilidade há o desenvolvimento de uma resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4 (NOBEN-TRAUTH; HU-LI; PAUL, 2002). No entanto, essa susceptibilidade está mais relacionada a uma incapacidade em gerar uma resposta Th1 do que a uma resposta Th2 persistente induzida por IL-4 (KROPF et. al., 1997).

Os macrófagos são células do sistema imunológico inato que estão localizados em vários tecidos, atuando na homeostase, no reparo tecidual e atuando como células de defesa com atividade microbicida (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). É uma das principais células fagocíticas do sistema imunológico, sendo a principal célula hospedeira da *Leishmania*, embora esse parasito também possa infectar outras células, como neutrófilos e células dendríticas (MARTINS et al., 2017).

Em relação aos perfis de ativação, os macrófagos podem ser divididos em três subtipos. Os chamados classicamente ativados, que ocorre por estímulo de IFN- γ e LPS, ou por citocinas do perfil Th1 e IFN- γ , produzindo altos níveis de NO, através da conversão de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), espécies reativas de oxigênio (ROS), IL-12 e baixos níveis de IL-10 (ANDERSON; MOSSER, 2002; EDWARDS et al., 2006). Na ausência dos estímulos para polarização Th1 e na presença de citocinas Th2, como a IL-4 e IL-13, os macrófagos passam a expressar FIZZ1 e YM-1, além da enzima arginase I, que converte L-arginina em poliaminas, sendo denominados macrófagos alternativamente ativados (ANDERSON; MOSSER, 2002; CORRALIZA et al., 1995; EDWARDS et al., 2006; SUN et al., 2015; ZHAO et al., 2008). O terceiro tipo de macrófagos são os macrófagos regulatórios, que podem ser estimulados por LPS e prostaglandina E2 e são caracterizados pela produção de altos níveis de IL-10 e também da enzima arginase I e baixos níveis de IL-12 (CORRALIZA et al., 1995; EDWARDS et al., 2006).

A coexpressão de iNOS e arginase I favorece a replicação parasitária, pois com a dupla expressão dessas enzimas não ocorre a produção de NO, substância responsável pelo controle do parasito (SCHLEICHER et al. 2016). Diante do exposto, um perfil de resposta imunológica Th1 ativam macrófagos através da ação sinérgica do TNF e IFN- γ , induzindo a expressão de iNOS e consequentemente a produção de NO (GREEN et al., 1990a; LIEW et al., 1991). Já durante uma resposta Th2, citocinas como IL-4, induzem a expressão de arginase I em macrófagos, (CORRALIZA et al. 1995), resultando na persistência dos parasitos (INIESTA et al., 2002; SILVA et al., 2012). A principal substância responsável pela eliminação da *Leishmania* é o NO, principalmente, aquele gerado pela iNOS após a ativação das células por IFN γ e TNF (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Com relação à infecção por *L. (L.) amazonensis*, o paradigma Th1/Th2, ainda não explica a evolução da doença, uma vez que há evidências que citocinas destes dois perfis, além de outros tipos celulares, atuem de forma independente e simultânea neste modelo. Em animais resistentes a infecção por *L. amazonensis*, foi observada menor produção de IL-4 e IL-10 nos linfonodos drenantes, contudo, a produção de IFN- γ foi similar a linhagens suscetíveis (JI et al., 2002).

Apesar de a quantidade de IL-4 e IL-10 serem maiores nos animais suscetíveis a infecção por *L. amazonensis*, os níveis de IL-4 ainda são bem menores que no modelo BALB/c (linhagem suscetível a infecção por *L. major*) quando infectados por *L. major*, não determinando, portanto, a polarização para um perfil de resposta Th2 (AFONSO; SCOTT, 1993). Paralelo a isso, os baixos níveis de IFN- γ em resposta a infecção por *L. amazonensis*, não são suficientes para a polarização Th1 (JI et al., 2002; VIEIRA et al., 1996). Segundo Carneiro e colaboradores (2015) o IFN- γ , citocina central na resolução da infecção por *L. major*, teve a função protetora observada apenas na fase crônica da infecção por *L. amazonensis*.

Pouco se sabe sobre a influência de distúrbios metabólicos, como o diabetes mellitus, na infecção por *Leishmania amazonensis*. Um único estudo realizado, abordando esta temática explorou os efeitos do diabetes mellitus induzido por STZ e da infecção por *Leishmania major* em hamsters, na farmacocinética de um agente antimonial pentavalente (Pentostam). Foi constatado que o aumento da excreção urinária associado ao diabetes mellitus pode tornar o tratamento da leishmaniose com o Pentostam, menos eficaz do que em animais sem a presença de diabetes o que sugere que para manter as concentrações sanguíneas do medicamento em concentrações efetivas, pode ser necessário ofertar aos pacientes

diabéticos doses mais elevadas. Não foi observada diferença significativa entre as lesões da pata de hamsters diabéticos e controles (RADWAN; AL JASER; AL RAYES, 2007).

Dado que o DM afeta negativamente a função do sistema imunológico, podendo levar ao aumento da suscetibilidade e gravidade de diversas infecções e que até o momento existe uma escassez de trabalhos que apontam a evolução da leishmaniose correlacionada ao diabetes mellitus, faz-se necessário compreender como a presença desse distúrbio metabólico afeta o curso da infecção por *L. amazonensis*, buscando não apenas medidas eficazes de intervenção, mas também a descoberta de alvos terapêuticos, a fim de desenvolver tratamentos eficazes.

2.3 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação e/ou secreção de insulina, envolvendo alterações não só no metabolismo de carboidratos, como também no metabolismo de proteínas e lipídeos. (AL-MASKARI; AL-MASKARI; AL-SUDAIRY, 2011; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018).

O DM é classificado em tipo 1 e 2, diabetes gestacional, entre outros. No DM tipo 1 ocorre uma deficiência na produção de insulina ocasionada pela destruição crônica autoimune das células β do pâncreas. No DM tipo 2, ocorre a resistência à ação da insulina e/ou deficiência na produção de insulina, diminuindo a captação de glicose pelas células. No início da doença, devido a esta resistência, ocorre hiperinsulinemia compensatória, continuando por meses ou anos (FERREIRA et al., 2011; WHO 2016).

O envelhecimento da população, a urbanização e a crescente prevalência de obesidade e estilo de vida sedentário resultaram em um aumento no número de pacientes com DM em todo o mundo. O diabetes atinge cerca de 425 milhões de adultos e um em cada dois permanece sem diagnóstico (IDF, 2017), sendo a sua prevalência maior em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Em 2012 aproximadamente 1,5 milhões de pessoas morreram por causa da doença segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) (2016).

O Brasil é o quarto país com o maior número de pessoas diabéticas, sendo que em 2017, 12,5 milhões de pessoas apresentavam a doença (IDF, 2017). Também em 2017, na América Central e do Sul, 209.717 adultos, morreram como resultado da doença (11% de toda

a mortalidade), e quase metade dessas mortes ocorreram entre pessoas com menos de 60 anos de idade e mais da metade dessas (51,8%) ocorreram no Brasil (IDF, 2017).

Com relação ao tratamento do DM, existem diferenças estabelecidas nas abordagens. Pacientes com diabetes tipo 1 diagnosticados por características clínicas necessitam de tratamento precoce com insulina devido a sua extensa perda na capacidade de secreção da mesma. Em contra partida, os portadores de diabetes tipo 2, podem com eficácia ser tratados através de modificações do estilo de vida e/ou hipoglicemiantes orais, porém a problemática consiste na dificuldade do paciente em manter a adesão ao tratamento e principalmente à restrição alimentar (FERREIRA; CAMPOS, 2014; MALANDRINO; SMITH, 2011).

Neste contexto, a suplementação alimentar com fibras solúveis vem sendo considerada uma ferramenta terapêutica, para auxiliar no controle do DM, uma vez que possui a capacidade de diminuir a absorção de glicose e aumentar a secreção de insulina (LO et al., 2006). O DM é uma doença que necessita de mudanças que duram toda a vida e seu tratamento exige uma terapia multidisciplinar, medicações diárias, exercícios físicos, controle da glicemia e modificações comportamentais (GIL; HADDAD; GUARIENTE, 2008).

Os sintomas de diabetes e hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva. Quando não tratado adequadamente, os sintomas podem agravar chegando à hiperglicemia com cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não cetótica. A deficiência no crescimento, a diminuição da função das células do sistema imune e conseqüentemente o aumento da susceptibilidade a determinadas infecções, também podem acompanhar a hiperglicemia crônica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010; FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES (IDF), 2017).

2.4 Diabetes mellitus e o sistema imunológico

O Diabetes mellitus tem sido associado a vários déficits imunológicos, e conseqüentemente ao aumento das taxas de diversas infecções (CALVET; YOSHIKAWA, 2001). A hiperglicemia crônica, que é característica do DM, pode levar a diminuição da função das células do sistema imunológico, incluindo neutrófilos, macrófagos e monócitos, havendo um prejuízo na quimiotaxia e adesão de leucócitos e na fagocitose (MARTINEZ et al., 2016).

Os principais mecanismos patogênicos associados à susceptibilidade dos indivíduos diabéticos a doenças infecciosas incluem: o aumento da virulência por hiperglicemia e

diminuição da quimiotaxia (alteração na produção de quimiocinas e citocinas, mobilização de leucócitos e atividade fagocítica contra infecção), glicosúria e dismotilidade intestinal e urinária (CASQUEIRO; CASQUEIRO; ALVES, 2012). A resposta Th1 em hospedeiros diabéticos pode ter eficácia limitada, devido às interações celulares prejudicadas e a incapacidade do sistema imunológico em montar uma resposta eficaz frente à infecção, levando à sobrevivência persistente de parasitos (HODGSON et al., 2015).

No que diz respeito às defesas celulares, a hiperglicemia pode alterar as funções de neutrófilos, levando ao comprometimento na adesão ao endotélio e migração dessas células para o local da inflamação (SANNOMIYA; PEREIRA; GARCIA-LEME, 1990), e da fagocitose em ratos Wistar (ALBA-LOUREIRO et al., 2006), além de alterações na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em pacientes diabéticos (MARHOFFER, W. et al., 1994). Além disso, a produção das citocinas TNF, IL-1 β e IL-8 por neutrófilos em indivíduos diabéticos aumentou tanto no estado basal quanto após estimulação por lipopolissacarídeos (LPS) (HATANAKA et al., 2006).

Os neutrófilos fornecem a primeira linha de defesa contra infecções através de sua capacidade de matar parasitos por fagocitose, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e liberação de grânulos (enzimas líticas, peptídeos antimicrobianos) (NATHAN, 2006). Em infecção por *L. amazonensis*, os neutrófilos migram para o sítio da infecção durante as primeiras 24h e podem controlar a carga parasitária e o desenvolvimento da lesão durante a primeira semana após a infecção em camundongos BALB/c, sugerindo que os neutrófilos restringem o desenvolvimento inicial da doença nesses camundongos (SOUSA et al., 2014). Nesse contexto, sugere-se que a presença do DM pode levar a uma maior suscetibilidade a infecção por *L. amazonensis*, além disso, segundo Jafar, Edriss, Nugent (2016), qualquer redução na função de neutrófilos pode contribuir para o aumento da suscetibilidade e gravidade das infecções.

Outro tipo celular afetado pela hiperglicemia são os macrófagos. Em camundongos diabéticos não obesos, essas células apresentaram uma propriedade intrínseca, a hiporresponsividade ao IFN- γ , uma vez que não responderam completamente a essa citocina para a produção de TNF e IL-12. Quando estimulados por LPS, esses macrófagos não conseguiram regular totalmente a produção de TNF e IL-12 em resposta a altas doses de IFN- γ (LEE; KWON; KIM, 2012).

Macrófagos são células do sistema fagocitário que possuem um amplo espectro de atuação, devido à sua presença em diferentes tecidos e às diferentes repostas a estímulos endógenos e exógenos (EDWARDS et al., 2006). É uma das principais células fagocíticas do sistema imunológico, sendo a principal célula hospedeira da *Leishmania*, embora esse parasito também possa parasitar outras células, como neutrófilos e células dendríticas (GIRAUD et al., 2019; MARTINS et al., 2017). A hiporresponsividade de macrófagos diabéticos ao IFN- γ , pode levar a uma maior suscetibilidade a infecção por *Leishmania*, uma vez que um dos mecanismos que confere resistência pela resposta Th1 advém da ativação de macrófagos por IFN- γ que atuando de maneira sinérgica com TNF, estimula essas células a produzirem óxido nítrico, uma molécula leishmanicida (GREEN et al., 1990b).

As células Natural Killers também apresentaram funções prejudicadas na presença do DM. A hiperglicemia em pacientes diabéticos, levou a regulação negativa de NKG2D (BERROU et al. 2013), um receptor que regula a atividade das células NK, ao qual se ligam todos os ligantes presentes na superfície de tumores ou células infectadas (BAUER et al., 1999). As células NK apresentam um papel importante na infecção por *L. amazonensis*, elas são as principais fontes de IFN- γ nos tempos iniciais, após serem ativadas pela IL-12 produzidas pelas células dendríticas, desencadeando, assim, a resposta Th1 (SCHARTON; SCOTT, 1993).

Estudos têm mostrado que em células endoteliais sensíveis à hiperglicemia, a carga excessiva de glicose desencadeia a formação de ROS na mitocôndria, o que, por sua vez, prejudica a função mitocondrial (GIACCO; BROWNLEE 2011; PITOCCO et al., 2013). Devido à sua alta reatividade, o ROS reage com vários constituintes celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas, causando danos celulares. Além disso, o excesso de ROS ativa fatores pró-inflamatórios de transcrição, como NF κ B, que regulam positivamente a expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (RENDRA et al., 2018). As células endoteliais ativadas atraem monócitos que aumentam ainda mais a inflamação, o que promove lesão macrovascular e microvascular (PITOCCO et al., 2013). Em contraste com a produção de ROS bem regulada na resposta antimicrobiana, o ROS gerado metabolicamente em macrófagos diabéticos é mais errático e desregulado, o que favorece a progressão das complicações diabéticas (RENDRA et al., 2018).

Os efeitos da hiperglicemia nas respostas imunológicas ainda são controversos. Estudos sugerem que a exposição de monócitos humanos a altas taxas de glicose induz citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF (JAFAR; EDRISS; NUGENT, 2016;

SHANMUGAM et al., 2003). Porém, já foi demonstrado que as células mononucleares e os monócitos de pessoas com DM secretam menos IL-1 β e IL-6 em resposta à estimulação por (LPS) (OHNO; AOKI; NISHIMURA, 1993).

Em seu estudo Martinez e colaboradores (2016) observaram que o DM diminuiu a resposta imune de células T, neutrófilos, reduzindo aproximadamente 50% a produção de IL-1 β , além de reduzir significativamente IL-10, aumentando a susceptibilidade à infecção e desenvolvimento de doenças adicionais. Neto e colaboradores (2017) relataram que os camundongos diabéticos eram mais suscetíveis à encefalitozoonose com diminuição dos linfócitos B e T associados com níveis mais baixos de IFN- γ . Além disso, outros estudos relataram que o aumento da glicação, umas das consequências da hiperglicemia, poderia diminuir a produção de IFN- γ e IL-12 (CHIN; MONACK; NATHAN, 2012; PRICE et al., 2010).

Apesar de ocasionar efeitos distintos na produção de citocinas, já é bem definido que o diabetes mellitus leva a redução da função dos monócitos, macrófagos e neutrófilos em camundongos diabéticos, além de comprometimento na explosão oxidativa (HODGSON et al., 2015; YANO et al., 2012).

2.5 β -Glucanos

Os β -glucanos são polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de bactérias, fungos, leveduras e plantas como a aveia e cevada (RAHAR et al. 2011). Sua estrutura química apresenta um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição β (1-3), com cadeias laterais que ocorrem em diferentes intervalos e tamanhos variados (XIAO; TRINCADO; MURTAUGGH, 2004; SONCK, 2010).

Esses compostos vêm sendo considerados imunomoduladores poderosos e antagonistas potentes para tumores benignos e malignos, vem sendo utilizados também no combate ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e no aumento da função do sistema imunológico (AKRAMIENÉ et al. 2007; RAHAR et al. 2011).

A atividade biológica associada ao β -glucano depende da estrutura primária, da solubilidade, do grau de ramificação e do peso molecular. (GOODRIDGE; WOLF; UNDERHILL, 2009; MEENA et al., 2013). β -glucanos encontrados em levedura e cogumelos contém ligações do tipo β (1-3) e ocasionalmente β (1-6), enquanto que os β -glucanos de grãos (aveia e cevada) apresentam ligações do tipo β (1-3) e β (1-4), o que proporciona

diversas atividades biológicas (CAMILLI; TABOURET; QUINTIN, 2018; CHEN; SEVIOUR, 2007; RAHAR et al. 2011).

A solubilidade dos β -glucanos dependerá do comprimento da cadeia de polissacarídeos, tanto na extensão, quanto no comprimento da ramificação. Com relação ao peso molecular, os β -glucanos curtos são na maioria das vezes, considerados inativos, os de peso molecular intermediário, possuem atividade biológica *in vivo*, entretanto os β -glucanos de alto peso molecular em estudos *in vitro* podem ativar diretamente leucócitos, estimulando suas atividades fagocíticas, citotóxicas, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (AKRAMIENÉ et al. 2007; MEENA et al., 2013; PETIT; WIEGERTJES, 2016).

2.5.1 Atividade imunomodulatória dos β -glucanos

Os β -glucanos são imunomoduladores potentes com efeitos tanto na imunidade inata como na imunidade adaptativa. A capacidade do sistema imune inato em reconhecer rapidamente e responder a um patógeno invasor é essencial para controlar uma infecção (CHAN; CHAN; SZE, 2009).

Esses polissacarídeos pertencem a uma classe de compostos que são descritos como modificadores de resposta biológica (SILVA et al., 2017), aparentemente eles podem modular o sistema imunológico estimulando a fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias (VETVICKA, 2011). Estimulam os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a doença, ao invés de atacar o agente infeccioso, o que faz com que permaneçam como agentes não tóxicos para as células do organismo hospedeiro (ZEKOVIĆ et al., 2005).

O envolvimento protetor do β -glucano tem sido relatado como imunomodulação não específica, envolvendo vias que incluem ativação de macrófagos, estimulação do sistema reticuloendotelial e ativação de células NK (ZEKOVIĆ et al., 2005). A capacidade do sistema imune em reconhecer e responder ao β -glucano é dependente dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que foram identificados em várias células do sistema imune, incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos e células Natural Killer (MURPHY et al., 2010). Dentre esses receptores os principais são Dectina-1 e receptor do complemento 3 (CR3) (CAMILLI; TABOURET.; QUINTIN, 2018; MAGNANI, 2008).

A Dectina-1 é uma lectina do tipo C altamente expressa em células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, e atua como um receptor de reconhecimento de padrões para β -glucano (BROW; GORDON, 2001). O receptor CR3, foi o primeiro receptor descrito para o

reconhecimento de β -glucanos, consiste em uma integrina heterodimérica expressa em células mielóides, macrófagos, células dendríticas, NK e alguns linfócitos (CORDEIRO; ALONSO; DE LA FUENTE, 2015; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

Quando o β -glucano se liga a Dectina-1 ou ao CR3 desencadeia uma série de eventos de sinalização de acordo com cada receptor, que modulam a resposta imune, sobretudo através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α/β , IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ e eicosanóides, bem como moléculas citotóxicas que atuam também como mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (BARTON et al., 2016; VANNUCCI, et al. 2013).

No entanto, efeitos antiinflamatórios dos β -glucanos têm sido demonstrados, como em doenças inflamatórias intestinais em cães, na qual o β -glucano extraído de levedura produziu efeito terapêutico mais rápido, reduzindo os valores do índice de atividade da doença, melhorando os parâmetros histopatológicos, diminuindo os níveis de IL-6 e aumentando as concentrações de IL-10 (RYCHLIK et al., 2013). Outro estudo que mostrou essa atividade antiinflamatória foi o de Kohl e colaboradores (2009), onde o consumo de β -glucano, extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, por 4 semanas aumentou significativamente os níveis circulantes e a expressão de RNA mensageiro (mRNA) no tecido adiposo de IL-10 em humanos com sobrepeso e obesidade.

Os macrófagos e células dendríticas são consideradas as principais células-alvo de β -glucanos, apesar de os neutrófilos, células B, células T e células NK também serem moduladas pelos mesmos. As atividades imunomodulatórias dos β -glucanos são habitualmente estudadas no que se refere à ativação de macrófagos (KIM et al., 2011).

Assim, os β -glucanos tem sido amplamente utilizados como fator de proteção contra infecções protozoárias, efeitos protetores vêm sendo demonstrados em infecções experimentais por *Leishmania major* (TUWAIJRI et al., 1987), *L. donovani* (COOK; HOLBROOK, 1983), *Trypanosoma cruzi* (WILLIAMS et al., 1989).

2.6 Modelo animal experimental de diabetes mellitus e leishmanioses

Os modelos animais de diabetes mellitus são na maioria das vezes ferramentas úteis para estudar a fisiopatologia e os aspectos clínicos da doença, sendo utilizados para investigar novas terapias (CHATZIGEORGIOU et al., 2009). A indução de diabetes em modelos experimentais pode ser realizada por meio da utilização de produtos químicos que destroem

seletivamente as células β -pancreáticas, sendo a sua utilização simples e conveniente. Uma das substâncias comumente utilizadas para induzir a doença nos modelos experimentais, como mencionado acima, é a estreptozotocina (STZ) (LEE et al., 2016; SZKUDELSKI, 2001).

A STZ é um análogo tóxico de nitrosourea, isolado do microrganismo *Streptomyces achromogenes*, que pode ser transportado para o interior das células via proteína transportadora de glicose 2 (GLUT 2), levando a toxicidade das células β -pancreáticas (SCHNEDL et al., 1994). A dose necessária para a indução do diabetes é dependente da espécie animal, da via de administração e do estado nutricional (SZKUDELSKI, 2001). Porém, recentemente tem-se mostrado que múltiplas doses (4 a 5) baixas de 50mg/kg de STZ solubilizada em tampão citrato 0,1 M (pH 4,5) durante cinco dias consecutivos, asseguraram a indução de diabetes em camundongos C57BL/6 (LEE et al., 2016). A utilização desse método para induzir diabetes mellitus em animais por ser um procedimento simples, barato e disponível (AKBARZADEH et al., 2007).

Os modelos experimentais também constituem um importante instrumento para o estudo das leishmanioses, tanto no que diz respeito à patogênese, quanto no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas (OLIVEIRA; BARRAL-NETTO, 2005). As linhagens de camundongos BALB/c, C57BL/10e C57BL/6, têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais para compreender melhor o ciclo de vida, o processo de infecção e as relações parasito-hospedeiro. A utilização dos mesmos traz inúmeras vantagens, uma vez que permite um alto nível de controle sobre as características do hospedeiro infectado e do parasito, esclarecendo aspectos importantes que podem conduzir as estratégias de controle de infecção (PEREIRA; ALVES, 2008).

Vários mecanismos imunológicos relacionados à infecção ou proteção contra parasitos do gênero *Leishmania* são oriundos de estudos em camundongos, que têm sido de extrema importância no esboço de suas diversas manifestações (SHARMA; SINGH, 2009). Usando um modelo experimental de desnutrição proteica e infecção por *Leishmania infantum*, um estudo recente demonstrou o impacto deletério da restrição proteica em camundongos infectados. Foi observado que o grupo com desnutrição proteica e infectado por *L. infantum* apresentou maior carga parasitária do que os camundongos eutróficos, observaram ainda que animais desnutridos e infectados apresentaram uma atrofia de órgãos linfóides com alterações na celularidade e subpopulações de linfócitos no timo e baço, modificando os fatores quimiotáticos tímicos ao diminuir os níveis de proteína CCL5, CXCL12, IGF1, CXCL9 e

CXCL10, o que favorecem o estabelecimento da infecção (LOSADA-BARRAGÁN et al., 2017).

Novais e colaboradores (2009) observaram em seu estudo com camundongos infectados com *L.braziliensis*, que a depleção de neutrófilos *in vivo* aumenta significativamente a multiplicação de parasitas, enquanto que a inoculação conjunta de neutrófilos com *L.braziliensis* diminui significativamente essa multiplicação. Além disso, observaram que os mecanismos dependentes de contato que permitem a eliminação do parasita durante a interação de macrófagos infectados por *L. braziliensis* com neutrófilos vivos estão associados com a produção de TNF e superóxido.

Há anos tem-se utilizado modelos experimentais para avaliar os efeitos dos β -Glucanos em infecções com *Leishmania*. Tuwaijri e colaboradores. (1987) mostraram que a administração de β -glucanos em camundongos BALB/c antes da infecção por *Leishmania major*, reduziu significativamente a proliferação de amastigotas no fígado e no baço. Outro estudo mostrou ainda que o β -glucano foi eficaz no aumento da resistência do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania donovani* em hamsters, reduzindo significativamente a carga parasitária hepática (COOK; HOLBROOK; DOUGHERTY, 1982).

O β -glucano mostrou-se eficaz também na eliminação da carga parasitaria do fígado e do baço (eliminando cerca de 99% dos parasitas) num modelo de rato infectados com *L. donovani* (GHOSH et al., 2013). Modelos experimentais estão sendo utilizados para avaliar a função dos β -glucanos no sistema imunológico, como no trabalho de Li e colaboradores. (2013), no qual observaram que nos macrófagos de camundongos C57BL/6 tratados com β -glucano, os níveis de mRNA de citocinas inflamatórias como TNF, IL-12, IL-6 e IL-1 β foram significativamente maiores em comparação ao grupo controle.

Desta maneira, o uso de animais em pesquisa tem sido crucial para gerar novos conhecimentos e tratamentos, devido às diversas limitações de investigação da doença diretamente em seres humanos (DAMATTA, 2010).

3. CONCLUSÃO

De acordo com o exposto, o diabetes mellitus é um dos distúrbios metabólicos mais comuns no mundo, sendo o Brasil o quarto país com o maior número de pessoas diabéticas. Associado a isso, está o elevado número de casos de leishmaniose tegumentar, estando o Brasil entre os seis países com o maior número de casos. Além disso, constatamos que os β -glucanos, possuem efeitos metabólicos e imunomoduladores importantes, sendo sua aplicação uma possível terapêutica para o controle glicêmico e para melhora da ação do sistema imunológico. Levando em consideração que o diabetes mellitus afeta negativamente a função do sistema imunológico, podendo levar ao aumento da suscetibilidade e gravidade de diversas infecções e que até o momento existe uma escassez de trabalhos que apontam a evolução da leishmaniose correlacionada ao diabetes mellitus, além dos efeitos imunomoduladores dos β -glucanos em infecções por *L. amazonensis*, torna-se necessário compreender como a presença do diabetes mellitus afeta o curso da infecção por *L. amazonensis*, bem como os efeitos do β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* nessa infecção associada ao diabetes mellitus

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and immunity**, Davis, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, Jul., 1993.
- AKBARZADEH, A. et al. Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 60-64, Sept. 2007.
- AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. **Molecular aspects of medicine**, Boston, v. 57, p. 1-29, Oct., 2017.
- AKRAMIENĖ, D. et. al. Effects of β -glucans on the immune system. **Medicina**, Kaunas, v. 43, n. 8, p. 597-606, Aug. 2007.
- ALBA-LOUREIRO, T. C. et al. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **Journal of endocrinology**, Melbourne, v. 188, n. 2, p. 295-303, Feb., 2006.
- AL-MASKARI, A. Y.; AL-MASKARI, M. Y.; AL-SUDAIRY, S. Oral Manifestations and Complications of Diabetes Mellitus. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, Muscat, v. 11, n.2, p. 179-186, Feb. 2011.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, Genova, v. 99, n. 1, p. 17-23, Jun. 2010.
- ALMEIDA, R. P. Biological Behavior of *Leishmania Amazonensis* Isolated from Humans with Cutaneous, Mucosal, or Visceral Leishmaniasis in Balb/C Mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 54, n. 2, p. 178-184, Feb., 1996.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 33, n.1, p. 562-569, Jan. 2010.
- ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **Journal of leukocyte biology**, Filadélfia, v. 72, n. 1, p. 101-106, Jul., 2002.
- ANDERSON, C. F. et al. CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 2, p. 285-297, Feb., 2007.
- BARTON, C. et al. Beta-glucan contamination of pharmaceutical products: How much should we accept?. **Cancer Immunology Immunotherapy**, Baltimore, v. 65, n. 11, p. 1289-1301, Jul., 2016.
- BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current opinion in microbiology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 340-344, Aug., 2008.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, Victoria, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, Aug., 2007.
- BAUER, S. et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**, Washington, v. 285, n. 5428, p. 727-729, 1999.

BERROU, J. et al. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e62418, Apr.,2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 189 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: zoonoses** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 224 p. : il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde) (Cadernos de Atenção Básica ; n. 22)

BROWN, G. D.; S. GORDON. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, London, v. 413, n. 6851, p. 36-37, Sep., 2001.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 393, n. 10174, p. 872-873, 2019.

CALVET, H. M.; YOSHIKAWA, T. T. Infections in diabetes. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 407-421, Jun., 2001.

CAMILI, G.; TABOURET, G.; QUINTIN, J. The Complexity of Fungal β -Glucan in Health and Disease: Effects on the Mononuclear Phagocyte System. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, p. 673, Apr.,2018.

CARNEIRO, M. B. H. et al. IFN- γ -Dependent Recruitment of CD4+ T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, Cleveland, v. 35, n. 12, p. 935-947, Jun., 2015.

CASQUEIRO, J. ; CASQUEIRO, J. ; ALVES, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, Karnal, v. 16, n. Suppl1, p. S27, Mar., 2012.

CHAN, G. C. F.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. Y. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of Hematology & Oncology**, New York, v. 2, n. 25, p. 3-11, 2009.

CHATZIGEORGIOU, A. et al. The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. **In Vivo**, Athens, v. 23, n. 2, p. 245-258, Mar./Apr. 2009.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-glucans. **Mycological research**, London, v. 111, n. 6, p. 635-652, Jun., 2007.

CHIN, C. Y. ; MONACK, D. M.; NATHAN, S. Delayed activation of host innate immune pathways in streptozotocin-induced diabetic hosts leads to more severe disease during infection with *Burkholderia pseudomallei*. **Immunology**, Medford, v. 135, n. 4, p. 312-332, Apr. , 2012.

- CLABORN, D. M. The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, Florida, v. 2, n. 2, p. 127-134, May./Aug. , 2010.
- COOK, J. A.; HOLBROOK, T. W. Immunogenicity of soluble and particulate antigens from *Leishmania donovani*: effect of glucan as an adjuvant. **Infection and immunity**, Davis, v. 40, n. 3, p. 1038-1043, Jun., 1983.
- COOK, J. A.; HOLBROOK, T. W. ; DOUGHERTY, W. J. Protective Effect of Glucan Against Visceral Leishmaniasis in Hamsters. **Infection and Immunity**, Davis, v. 37, n. 3, p. 1261-1269, Sept. 1982.
- CORDEIRO, A. S.; ALONSO, M. J. ; DE LA FUENTE, M. Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides. **Biotechnology Advances**, Rehovot, v. 33, n. 6 (Part 3), p. 1279–1293, Nov., 2015.
- CORRALIZA, I. M. et al. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 206, n. 2, p. 667-673, Jan., 1995.
- DAMATTA, R. A. Animal models in biomedical research. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v.20, n. 3, p. 210-211, 2010.
- DAS, A. et al. Epidemiologic correlates of mortality among symptomatic visceral leishmaniasis cases: findings from situation assessment in high endemic foci in India. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. e0005150, Nov., 2016.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Melbourne, v. 27, n. 5, p. 305-318, Sept., 2004.
- DIOTALLEVI, A. et al. Leishmania Infection Induces MicroRNA hsa-miR-346 in Human Cell Line-Derived Macrophages. **Frontiers in microbiology**, Richland, v. 9, p. 1019, May., 2018.
- DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2015-2016) / Adolfo Milech et. al.; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, Czech Republic, v. 3, n. 5, p. 276, Dec., 2012.
- DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, Bethesda, v. 5, Oct. , 2014.
- EDWARDS, J. P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, Filadélfia, v.80, n. 6, p. 1298-1307, Dec., 2006
- FERREIRA, A. A.; CAMPOS, S. M. B. Pharmacological Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, Maringá, v.8, n.3, p.72-78, set./Nov. 2014.
- FERREIRA, L. T. et al. Diabetes mellitus: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, Santo André, v.36, n. 3, p. 182-188, set./dez. , 2011.

- GARDINASSI, L. G. et al. Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, Czech Republic, v. 10, n. 1, p. 285, Jun. , 2017.
- GHOSH, K. et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, Cambridge, v. 2007, n. 6, p. 1016-1025, May., 2013.
- GIL, G. P.; HADDAD, M. C. L.; GUARIENTE, M. H. D. M. Conhecimento sobre diabetes mellitus de pacientes atendidos em programa ambulatorial interdisciplinar de um hospital universitário público. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 141-154, jul./dez. 2008.
- GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation research**, Baltimore, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, Oct., 2011.
- GIRAUD, E. et al. Osteopontin in the host response to *Leishmania amazonensis*. **BMC microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 32, Feb., 2019.
- GOMES, C. M. C. et al. Immunopathological characterization of human cutaneous leishmaniasis lesions caused by *Leishmania (Viannia) spp.* in Amazonian Brazil. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 116, n. 5, p. 1423-1431, May., 2017.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n. 3, p. 339-349, nov. 2004.
- GOODRIDGE, H.S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological reviews**, Denver, v. 230, n. 1, p. 38-50, Jun., 2009.
- GREEN, S. J. et al. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, Dec., 1990a.
- GREEN, S. J. et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 144, n. 1, p. 278-283, Jan. 1990b.
- GRIMALDI, G. J. R.; TESH, A. R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, v. 6, n. 3, p. 230-250, Jul. 1993.
- HARNACK, U. et al. Beta-(1-3),(1-6)-D-glucan Enhances the Effect of Low-dose Cyclophosphamide Treatment on A20 Lymphoma in Mice. **Anticancer Research**, Malmö, v. 31, n. 4, p. 1169-1172, Apr., 2011.
- HATANAKA, E. et al. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. **Clinical & Experimental Immunology**, London, v. 146, n. 3, p. 443-447, Dec., 2006.
- HENDARTO, H. et al. GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition

- of renal NAD(P)H oxidases. **Metabolism Clinical and Experimental**, Basel, v. 61, n. 10, p. 1422-1434, Oct., 2012.
- HODGSON, K. et al. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. **Immunology**, Medford, v. 144, n. 2, p. 171-185, Jan., 2015.
- INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites. **Parasite immunology**, Medford, v. 24, n. 3, p. 113-118, Jan., 2002.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). IDF Diabetes Atlas. 8th Edition, 2017. Disponível em: <www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 28 de nov. de 2017.
- JAFAR, N.; EDRISS, H.; NUGENT, K. The effect of short-term hyperglycemia on the innate immune system. **The American journal of the medical sciences**, Philadelphia, v. 351, n. 2, p. 201-211, Feb., 2016.
- Jl, J. et al. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Cleveland, v. 66, n. 4, p. 338-345, Apr., 2002.
- KEVRIC, I. ; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections - A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, Charleston, v. 33, n. 3, p. 579-93, Jul., 2015.
- KIM, H. S. et al. Stimulatory Effect of β -glucans on Immune Cells. **Immune Network**, Seoul, v. 11, n. 4, p. 191-195, Aug., 2011.
- KIMA, P.; SOONG, L. Interferon gamma in Leishmaniasis. **Immunology**, Medford, v. 4, p. 156, Jun., 2013.
- KOHL, A. et al. Increased interleukin-10 but unchanged insulin sensitivity after 4 weeks of (1, 3)-(1, 6)-beta-glycan consumption in overweight humans. **Nutrition Research**, California, v. 29, n. 4, p. 248-54, Apr., 2009.
- KROPF, P. et al. Characterization of T cell-mediated responses in nonhealing and healing *Leishmania major* infections in the absence of endogenous IL-4. **J. Immunol**, Rockville Pike v. 159, n. 7, p. 3434-3443, Oct., 1997.
- LEE, Y. S. et al. Hepatic immunophenotyping for streptozotocin-induced hyperglycemia in mice. **Nature**, London, v. 28, n. 6, p. 1-10, Jul., 2016.
- LEE, M.; KWON, H.; KIM, H. S.. Macrophages from nonobese diabetic mouse have a selective defect in IFN- γ but not IFN- α/β receptor pathway. **Journal of clinical immunology**, New York, v. 32, n. 4, p. 753-761, Mar., 2012.
- LI, X. et al. Immunomodulatory Activity of a Novel, Synthetic Betaglucon (β -glu6) in Murine Macrophages and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Plos one**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-11, Nov., 2013.
- LIEW, F. Y. et al. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 21, n. 12, p. 3009-3014, Dec., 1991.

- LO, H. C. et al. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesentérica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. **Life Sciences**, Elmsford, v. 78, n. 17, p. 1957-1966, Mar. 2006.
- LOBATO, R. V. et al. Metabolic effects of β -glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) per os administration in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 32, n. 1, p. 256-264, May., 2015.
- LOSADA-BARRAGÁN, M. et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. **Nature**, London, v. 11, n. 7, p. 1-13, Apr., 2017.
- MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, p. 631-650, jul./set. 2008.
- MALANDRINO, N.; SMITH, R. J. Personalized Medicine in Diabetes. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 57, n. 2, p. 231-240, Feb. 2011.
- MARHOFFER, W. et al. Monitoring of polymorphonuclear leukocyte functions in diabetes mellitus—a comparative study of conventional radiometric function tests and low-light imaging systems. **Journal of bioluminescence and chemiluminescence**, v. 9, n. 3, p. 165-170, May/Jun., 1994.
- MARTINEZ, N. et al. Defects in early cell recruitment contribute to the increased susceptibility to respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in diabetic mice. **Microbes and Infection**, California, v. 18, n. 10, p. 649-655, Oct., 2016.
- MARTINS, V. T. et al. A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I-and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Cellular immunology**, Maryland, v. 313, p. 32-42, Mar., 2017.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, Dublin, v. 107, n. 1, p. 7-14, Jan., 2014.
- MEENA, D. K. et al. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish physiology and biochemistry**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 431-457, Jun., 2013.
- MIRA, G. S.; GRAF, H.; CÂNDIDO, L. M. B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 1, jan./mar., 2009.
- MOWAT, A.; BAUM, J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 284, n. 12, p. 621-627, Mar., 1971.
- MURPHY, E. A. et al. Immune modulating effects of β -glucan. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, London, v. 13, n. 6, p. 656-661, Nov., 2010.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews immunology**, London v. 6, n. 3, p. 173, 2006.

- NETO, Aldo Francisco et al. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. e0186954, Nov., 2017.
- NOBEN-TRAUTH, N. et al. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 170, n. 10, p. 5152-5158, May.,2003.
- NOBEN-TRAUTH, N.; HU-LI, J.; PAUL, W. E. IL-4 secreted from individual naive CD4+ T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 32, n. 5, p. 1428-1433, Apr.,2002.
- NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of immunology**, Rockville Pike, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, Dec., 2009.
- OHNO, Y.; AOKI, N.; NISHIMURA, A. In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in insulin-dependent diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Washington, v. 77, n. 4, p. 1072-1077, Oct.,1993.
- OLIVEIRA, D. A. S.; FIGUEIREDO, M. F.; BRAGA, P. E. T. Perfil Epidemiológico dos Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana na Serra da Meruoca, Ceará, no Período de 2001 a 2012. **S A N A R E**, Sobral, v.13, n.2, p.36-41, jun./dez. , 2014.
- OLIVEIRA, C. I. ; BARRAL-NETTO, M. Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, v. 75, n. 1, p. 35-45, jan./jun. , 2005.
- PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, Dublin, v. 158, n. 4, p. 239–255, Dec. 2008.
- PETIT, J.s; WIEGERTJES, G. F. Long-lived effects of administering β -glucans: indications for trained immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**,Uppsala, v. 64, p. 93-102, Nov. 2016.
- PITOCCO, D. et al. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. **International journal of molecular sciences**,Basel, v. 14, n. 11, p. 21525-21550, Nov., 2013.
- PRICE, C. L. et al. Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes. **Journal of cellular and molecular medicine**, Brussel,s v. 14, n. 6b, p. 1806-1815, Jun., 2010.
- RADWAN, M. A.; AL JASER, M. H.; AL RAYES, Z. R. The effects of induced diabetes and cutaneous *Leishmania* infection on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**,London, v. 101, n. 2, p. 133-142, Mar., 2007.
- RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, Washington, v. 2, n. 2, p. 94-103, Apr. 2011.
- RENDRA, E.et al. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. **Immunobiology**,Cambridge, Nov., 2018.

- ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, London, v. 430, n. 6998, p. 463-467, Jul., 2004.
- ROGERS, M. E. ; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, Glasgow, v. 124, n. 5, p. 495-507, Dec., 2002.
- RYCHLIK, A. et al. The effectiveness of natural and synthetic immunomodulators in the treatment of inflammatory bowel disease in dogs. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 61, n. 3, p. 297-308, Sep., 2013.
- SAMUELSEN, A. B. C.; SCHREZENMEIR, J. ; KNUTSEN, S. H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, Münster, v. 58, n. 1, p. 183–193, Jan., 2014.
- SANNOMIYA, P.; PEREIRA, M. A. A.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by serum factor in diabetes mellitus: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Agents and actions**, v. 30, n. 3-4, p. 369-376, Jun., 1990.
- SANTOS, C. S.; BRODSKY, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Public Health**, Edinburgh, v. 2, p.165, Sep., 2014.
- SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 9, n. 06, p. 588-596, Jul., 2015.
- SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 178, n. 2, p. 567-577, Aug., 1993.
- SCHARTON-KERSTEN, T. et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 154, n. 10, p. 5320–5330, 1995.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 16, n. 9, p. 581, Jul., 2016.
- SCHLEICHER, U. et al. TNF-mediated restriction of arginase 1 expression in myeloid cells triggers type 2 NO synthase activity at the site of infection. **Cell reports**, Maryland Heights, v. 15, n. 5, p. 1062-1075, May., 2016.
- SCHNEDL, W. J. et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**, Ann Arbor, v. 43, n. 11, p. 1326-33, Nov. 1994.
- SEINO, Y. et al. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Investigation**, Nagoya, v. 1, n. 5, p. 212-228, Oct. , 2010.
- SHANMUGAM, N. et al. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. **Diabetes**, v. 52, n. 5, p. 1256-1264, May., 2003.
- SHARMA, U. ; SINGH, S. Immunobiology of Leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 47, n. 6, p. 412-423, Jun., 2009.

SILVA, V. O. et al. Promising Effects of Beta-Glucans on Metabolism and on the Immune Responses: Review Article. **American Journal of Immunology**, Al Ain, v. 13, n. 1, p. 62-72, Mar., 2017.

SILVA, M. F. L. et al. Leishmania amazonensis arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e34022, Mar., 2012.

SIMA, A. A. F. et al. Bacterial Phagocytosis and Intracellular Killing by Alveolar Macrophages in BB Rats. **Diabetes**, v. 37, n. 5, p. 544-549, May., 1988.

SOOSARAEI, M. et al. A decade bibliometric analysis of global research on leishmaniasis in Web of Science database. **Annals of Medicine and Surgery**, New York, v. 26, p. 30-37, Feb., 2018.

SONCK, E. et al. The effect of b-glucans on porcine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 135, n. 3-4, p. 199-207, Jun. 2010.

SOUSA, L. M. A. et al. Neutrophils have a protective role during early stages of L eishmania amazonensis infection in BALB/c mice. **Parasite immunology**, Medford, v. 36, n. 1, p. 13-31, Jan., 2014.

SUN, L. et al. Ex vivo and in vitro effect of serum amyloid a in the induction of macrophage m2 markers and efferocytosis of apoptotic neutrophils. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 194, n. 10, p. 4891-4900, Apr. , 2015.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**,Praga, v. 50, n. 6, p. 537-546, Mar., 2001.

TUWAIJRI, A. S. et al. Effect of glucan on Leishmania major infection in BALB/c mice. **Journal of Medical Microbiology**, Londres, v. 23, n. 4, p. 363-365, Jun. 1987.

VANNUCCI, L. et al. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). **International Journal of Oncology**, Atenas, v. 43, n. 2, p. 357-364, Aug., 2013.

VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, Washington, v. 10, n. 2, p. 115-119, Feb. 2011.

VIEIRA, L. Q. et al. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with Leishmania major, but control parasite replication. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 157, n. 2, p. 827–835, Jul.,1996.

VIJAYAKUMAR, S.; DAS, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. *Acta tropica*, Miami, v. 181, p. 95-104, May., 2018.

WILLIAMS, D. L. et al. Immunization against Trypanosoma cruzi: adjuvant effect of glucan. **International journal of immunopharmacology**,Omaha, v. 11, n. 4, p. 403-410, 1989

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 10 facts on diabetes. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. 2018. Disponível em :<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 27/07/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diabetes. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/en/>>. Acesso em: 16mai. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases. 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2017.

XIAO, Z. ; TRINCADO, C. A.; MURTAUGH, M. P. β -Glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 315-320, Dec. 2004.

YATAWARA, L. et al. Aureobasidium-Derived Soluble Branched (1,3-1,6) β -Glucan (Sophy β -glucan) Enhances Natural Killer Activity in Leishmania amazonensis-Infected Mice. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 47, n. 4, p. 345-351, Dec., 2009.

YOON, T. J. ; KOPPULA, S.; LEE, K. H. The Effects of β -Glucans on Cancer Metastasis. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Clermont-Ferrand, v. 13, n. 5, p. 699-708, Jun., 2013.

ZEKOVIĆ, D. B. et al. Natural and Modified (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. **Critical Reviews in Biotechnolog**, v. 25, n. 4, p. 205-230, Oct./Dec. 2005.

ZHAO, A. et al. Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. **Gastroenterology**, Nashville, v. 135, n. 1, p. 217-225. e1, Jul., 2008.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**IMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis* EM MODELOS DE DIABETES MELLITUS INDUZIDO**

Nayhane Caroline Andrade¹, Leonardo Gomes Vaz², Diego Costa Borges², Leda Quercia Vieira², Joziana Muniz de Paiva Barçante¹, Thales Augusto Barçante¹

¹ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

A leishmaniose é uma zoonose que acomete seres humanos e outras espécies de animais domésticos e silvestres. O diabetes mellitus (DM) pode alterar negativamente a resposta imunológica, levando a uma maior susceptibilidade a infecções. β -glucanos (BG) vem sendo utilizados no controle do DM e de infecções parasitárias. Desta forma, objetivou-se avaliar as consequências do DM induzido e do BG de *Saccharomyces cerevisiae*, na infecção por *Leishmania amazonensis* em modelos experimentais. Nos experimentos utilizou-se camundongos C57BL/6 e macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos. Os animais controles e diabéticos foram infectados por *L. amazonensis*. Foi realizada análise histopatológica do pâncreas. As citocinas IL-10, IFN- γ , TNF e IL-1 β e as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 foram dosadas pelo teste de ELISA. Avaliou-se o acúmulo de nitrito (NO₂) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os animais tratados com STZ apresentaram um aumento significativo da glicemia, além de uma redução significativa das ilhotas de Langerhans. Os BMDMs de camundongos diabéticos apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*, não sendo capaz de controlar a multiplicação parasitária após 48 e 72 horas de infecção, apresentando maior índice de infecção, quando comparados aos BMDMs de camundongos controles. Além disso, apresentaram uma menor produção de NO, quando estimulados com interferon gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) e maior atividade de arginase I. O β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* reduziu o índice de infecção de BMDMs de camundongos controles e diabéticos. A presença do diabetes mellitus aumentou também a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis in vivo*, uma vez que os animais diabéticos não conseguiram controlar a carga parasitária nas lesões, sendo essa significativamente maior, quando comparada aos animais controles. Esses animais apresentaram também uma maior atividade de arginase I nas lesões das orelhas. Com relação ao BG de *S. cerevisiae*, esse foi eficaz no controle da carga parasitária dos macrófagos derivados de camundongos controles e diabéticos, reduzindo o índice de infecção em ambos os macrófagos. Dessa forma, os resultados sugerem que a presença do diabetes mellitus influencia de maneira negativa a infecção por *L. amazonensis*, podendo aumentar a susceptibilidade a essa infecção, além disso, o BG foi eficaz na redução da carga parasitária de BMDMs de camundongos controles e diabéticos.

Palavras-chaves: Leishmaniose tegumentar; Hiperglicemia; Lesões cutâneas, Inflamação.

Introdução

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma zoonose que acomete seres humanos e outras espécies de animais domésticos e silvestres, causada por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, que são transmitidos através da picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (BRASIL, 2017; KUMARI et al., 2018). No Brasil, os principais agentes etiológicos da LT são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (COELHO et al., 2011), com as espécies de flebotomíneos *Lu. whitmani*, *Lu. wellcome*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis* e *Lu. Flaviscutellata* com maior representatividade na transmissão do parasito (GUERRA et al., 2015).

A LT agrupa as leishmanioses cutânea localizada, difusa, disseminada e mucocutânea (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). As lesões podem variar em sua gravidade, tamanho, números, aparência clínica e duração (AKHOUNDI et al., 2017), sendo que durante as manifestações clínicas, tanto o parasito, quanto a resposta imune do hospedeiro desempenham papel fundamental. Indivíduos que desenvolvem uma resposta mediada por células eficaz contra o antígeno *Leishmania*, quando infectados com *L. (L.) amazonensis*, geralmente desenvolvem leishmaniose cutânea localizada. Em contraste, pacientes com comprometimento da resposta de células T, frequentemente desenvolvem uma síndrome anérgica denominada leishmaniose cutânea difusa, caracterizada por múltiplas lesões nodulares com elevada carga parasitária (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

No modelo de resistência à infecção por *Leishmania*, o desenvolvimento e manutenção de uma resposta Th1, resposta protetora contra o parasito, é caracterizada pela produção de IFN- γ , iniciada primeiramente pela produção de IL-12, por células natural killer (NK) e, em seguida, por células Th1 (SCHARTON-KERSTEN et al., 1995). Além disso, macrófagos infectados, em presença de IFN- γ , produzem óxido nítrico (NO) e tornam-se capazes de eliminar o parasito (GREEN et al., 1990b).

Atrelado à resposta imune desenvolvida frente à infecção por *Leishmania*, distúrbios metabólicos, como diabetes mellitus (DM), pode levar ao aumento na frequência e na gravidade de infecções. A hiperglicemia crônica, característica geral do DM, que é resultante de falhas na ação e/ou secreção de insulina (IDF, 2017), pode levar à diminuição da função das células do sistema imunológico, reduzindo as funções de polimorfonucleares, prejudicando a quimiotaxia, a aderência, a fagocitose, a atividade microbicida, além da expressão de diversas citocinas (GUPTA et al., 2007; MOWAT; BAUM, 1971).

O DM é uma das doenças sistêmicas mais comuns no mundo, afetando atualmente 425 milhões de adultos, sendo o Brasil o quarto país com o maior número de pessoas diabéticas (IDF, 2017). Aliado a isso, está o elevado número de casos de leishmaniose tegumentar, com cerca de 700 mil a 1,3 milhões de novos casos por ano, e ocasionando de vinte a trinta mil mortes. O Brasil está entre os seis países com o maior número de casos de leishmaniose tegumentar (WHO, 2018), sendo a *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* os principais agentes causais identificados (BRASIL, 2017).

Algumas fibras alimentares, como os β -glucanos, que são polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de bactérias, fungos, leveduras e plantas como a aveia e cevada (RAHAR et al. 2011), agem no controle da glicemia e colesterol sanguíneo, além de atuarem como imunomoduladores, melhorando a fagocitose e a produção de citocinas (KIM et al., 2011; VETVICKA, 2011). Esses polissacarídeos estão sendo responsáveis pela diminuição da carga parasitária em órgãos como fígado e baço, e pela diminuição da espessura de lesões cutâneas, em leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, respectivamente (GHOSH et al., 2013; YATAWARA et al., 2009).

Desta forma, compreender a influência do diabetes mellitus na infecção por *Leishmania* é essencial, uma vez que como relatado, esse distúrbio metabólico leva a diminuição na função do sistema imunológico, podendo aumentar a suscetibilidade e a gravidade de diversas doenças. No entanto, até o momento existe uma escassez de estudos que relatam a evolução da leishmaniose correlacionada ao diabetes mellitus, sendo apenas um estudo realizado com *Leishmania major* (RADWAN; AL JASER; AL RAYES, 2007), uma espécie não identificada no Brasil (BRASIL, 2017). Além disso, há também uma carência de estudos relacionando o uso do β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* infecções por *Leishmania amazonensis*. Sendo assim, objetivou-se nesse trabalho avaliar as consequências do diabetes mellitus e do β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae*, na infecção por *Leishmania amazonensis* em modelos experimentais.

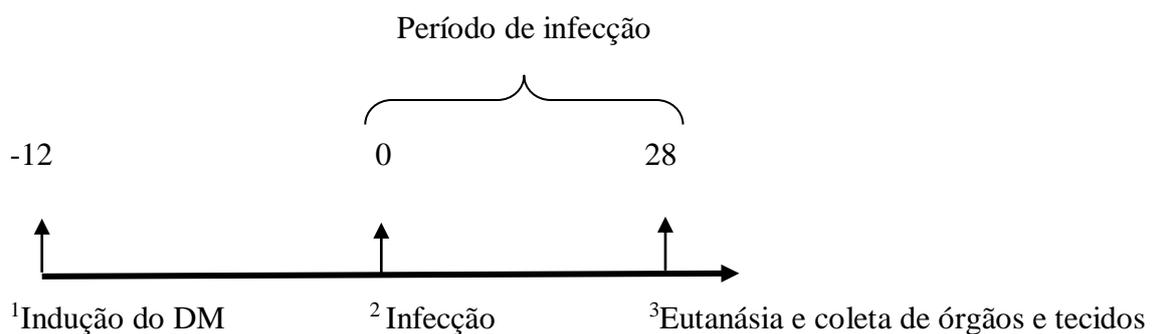
Material e métodos

Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo número 332/2017. Os experimentos foram realizados no Biotério do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram selecionados camundongos fêmeas C57BL/6, em estado hígido, com idade entre 5 a 7 semanas. Os camundongos C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas - UFMG. Posteriormente foram submetidos a um período de sete dias de aclimação com ambiente e equipe de execução do projeto. A sala era climatizada a uma temperatura entre 20-25°C e com ciclos de 12/12h claro-escuro. Foi oferecida ração comercial e água *ad libitum* durante todo o período experimental, que teve duração de quatro semanas (Figura 1). Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (diabético ou não; infectado por *Leishmania amazonensis* ou não) para os experimentos *in vivo*. Após a semana de aclimação, os animais foram divididos de forma aleatória de acordo com os grupos experimentais, como descritos na Tabela 1. Para os ensaios *in vitro*, foram utilizados também camundongos fêmeas C57BL/6 diabéticos e controles.

Figura 1 Representação esquemática do delineamento experimental ao longo do tempo



Legenda: Todos os animais foram acomodados em gaiolas, sendo quatro a cinco animais por gaiola, e passaram por um período de aclimação de sete dias; ¹Para animais dos grupos 3 e 4; ²Para os animais dos grupos 2 e 4; ³Para os animais de todos os grupos, coleta de linfonodos e orelhas.

Tabela 1 Descrição dos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Tratamentos
G1 controle (n=4)	Controle, não infectado por <i>L. amazonensis</i> ;
G2 (n=4)	Controle; infectado por <i>L. amazonensis</i> ;
G3 (n=5)	Diabético, não infectado por <i>L. amazonensis</i> ;
G4 (n=5)	Diabético, infectado por <i>L. amazonensis</i>

Os animais foram pesados uma vez por semana para avaliar o percentual de variação de peso. Para a avaliação do consumo alimentar, a ração ofertada aos animais foi pesada também uma vez por semana em balança analítica (Shimadzu® Modelo: AY220 Max 220g d=0,1mg).

Indução da diabetes mellitus

A indução do diabetes mellitus foi realizado através de injeção via intraperitoneal de doses baixas (50 mg/kg) de estreptozotocina (Sigam® - St. Louis, MO) solubilizada em tampão citrato 0,1 M (pH 4,5) durante cinco dias consecutivos, sendo a última dose administrada uma semana antes do início do experimento. Os grupos controles receberam o mesmo volume de tampão de citrato isoladamente (LEE et al. , 2016). Os animais antes do início do experimento (dia 0) foram submetidos a jejum de oito horas e a glicemia mensurada com o auxílio de um glicosímetro, pela amputação da ponta da cauda (Accu-Chek® Roche, Basel, Suíça), uma semana após a última dose de STZ. Foram considerados diabéticos os camundongos que apresentaram glicemia acima de 200mg/dL. A glicemia foi medida antes do início do experimento e no dia da eutanásia dos animais, na quarta semana após a infecção por *L. amazonensis*.

Obtenção da cultura de *Leishmania amazonensis* formas infectantes

As promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA / BR / 1967 / PH8) foram cultivadas em meio 199 completo (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA), com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U/mL de penicilina (Gibco® Life

Technologies, Grand Island, NY, USA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e suplementado com 20% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), e incubadas em BOD (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 25 °C, e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Para a infecção as culturas foram repicadas cinco dias antes da utilização para obtenção de formas promastigotas metacíclicas infectantes obtidas na fase estacionária.

Para a infecção as promastigotas metacíclicas foram purificadas num gradiente de densidade (SPATH; BEVERLEY, 2001). As culturas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram centrifugadas a 2.000 x g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento recuperado em 2 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2) e transferido para um tubo contendo gradiente de densidade (Ficoll® 400, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), o qual era composto por uma fase de Ficoll 20% e uma fase de Ficoll 10%. Esse material foi centrifugado a 1.100 x g por 10 minutos a 4°C, e a fase contendo as formas metacíclicas foi coletada e lavada duas vezes com PBS estéril antes de serem utilizadas para a infecção.

Obtenção de macrófagos de medula óssea (BMDM) e infecção por *L. amazonensis*

As células da medula óssea foram obtidas a partir do lavado do fêmur e tibia de camundongos fêmeas C57BL/6 diabético e não diabético, com PBS complementado com 100 U/mL de penicilina (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA), que foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspensionado em meio DMEM F12 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) completo com 100 U/mL de penicilina (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) inativado pelo calor. Para diferenciação dos monócitos em macrófagos, estas células foram incubadas em placa de petri (Prolab, Osasco, SP, BR) por sete dias em meio DMEM F12 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) completo, suplementado e acrescido de 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929, que produzem o fator M-CSF (Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos). As células foram mantidas em 10 mL de meio DMEM F12 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) por três dias, quando foi adicionados mais 5 mL do meio DMEM F12 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 20% de fator M-CSF. Finalmente,

após sete dias em cultura, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado e a concentração celular foi ajustada para necessidade de cada ensaio a ser realizado com os macrófagos obtidos. Durante todo o processo de diferenciação as células foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) (ZHANG; GONÇALVES; MOSSER, 2008).

As células foram contadas em câmara de Neubauer, posteriormente plaqueadas 5x10⁵ células/500µL em placas de 48 poços. Após esse procedimento as células foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 2h, após esse tempo, adicionou-se os seguintes estímulos: IL-4 ou LPS+IFN-γ, sendo 40 U/mL de IL-4 (BD Biosciences Pharmingen, São Jose, CA, EUA), 50 U/mL de IFN-γ (BD Biosciences Pharmingen, São Jose, CA, EUA) e 100 ng/mL de LPS (InvivoGen, São Diego, CA, EUA). Após a adição dos estímulos incubou-se essas células por 16h em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após 16h horas na presença destes estímulos, realizou-se a infecção *in vitro* destas células nas seguintes proporções: 5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago. As placas foram lavadas três vezes com PBS após 4 horas de infecção e foram acrescentados 500µL de meio DMEM F12 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) completo e suplementado, e as mesmas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 34°C e 5% de CO₂. Após 24h e 48h foram coletados os sobrenadantes para a avaliação de citocinas pelo teste de ELISA sanduíche, e após 48h foi realizado ensaio da atividade de arginase I e NO.

Já para a avaliação do índice de infecção, foram plaqueadas 3x10⁵ células/200µL de DMEM F12 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) completo e suplementado, em cima de uma lamínula de vidro que foi colocada no fundo da placa de 24 poços. Após esse procedimento as células foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 2h, após esse tempo, adicionou-se o β-glucano (BG), sendo 20 mcg de BG/ml de solução salina 0,09% de BG (Biorigin, Lencóis Paulista - SP) e incubou-se essas células por 16h em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foi realizada a infecção *in vitro* destas células na proporção de 4:1(promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*/macrófago). As placas foram então incubadas em estufa de atmosfera úmida a 34°C e 5% de CO₂ por 4h, após esse período de infecção, as placas foram lavadas três vezes com PBS para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas (placas de 4h após a infecção) ou incubadas novamente em meio DMEM F12 por 48 e 72 horas. As lamínulas foram coradas utilizando-se o sistema de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR,

Brazil). O número de amastigotas e macrófagos infectados foi determinado pela contagem de pelo menos 300 células por amostra. Os resultados foram expressos como índice de infecção (% de células infectadas x número de amastigotas/número total de células).

Infecção dos camundongos por *Leishmania amazonensis*

Para a infecção *in vivo* realizou-se a infecção intradérmica nas orelhas dos camundongos C57BL/6 controles e diabéticos. Os animais foram sedados com uma solução de Ketamina (60 mg/kg) (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) e Xilasina (15 mg/kg) (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil), diluídas em PBS e posteriormente foram inoculados 10 µL da solução contendo 1×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* intradermicamente nas duas orelhas. A lesão induzida nas orelhas dos camundongos foi acompanhada semanalmente, durante quatro semanas, com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett 727, Itu, SP, Brasil).

Cultura de células e quantificação de parasitos

Ao final do experimento, os camundongos foram submetidos a jejum de oito horas, a glicemia foi mensurada com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek® Roche, Basel, Suíça), através da amputação da ponta da cauda. Posteriormente eles foram sedados, eutanasia dos por deslocamento cervical e submersos em álcool 70% (ROMA et al., 2016). Após a eutanásia foram coletados os linfonodos retromaxilares, as orelhas e o pâncreas dos camundongos.

A obtenção da suspensão de células dos linfonodos retromaxilares dos animais se deu através da retirada dos órgãos, que foram colocados num tubo de fundo cônico de 15 mL contendo 2 mL de meio RPMI completo com 100 U/mL penicilina G (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 100 µg/mL estreptomicina (Gibco® Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 2 mM l-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e pH 7.2. Esses conteúdos foram transferidos separadamente para um macerador estéril e macerados manualmente. O macerado foi centrifugado a $300 \times g$ por 10 minutos a 4°C, posteriormente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo. A contagem de células foi em azul de Tripán 0,1%, com auxílio de uma câmara de Neubauer, posteriormente foi realizada a adequação da concentração para 5×10^6 células/mL. Em placas de cultura de 24 poços, foram adicionados 1000 µL/poço da suspensão de células sem ou com estímulo de 50 µg/mL de extrato total de *L. amazonensis* e

foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂. Os sobrenadantes da cultura celular foram recolhidos após 24h e 72h para serem utilizados em ensaios de citocinas (CARNEIRO et al., 2015; ROMA et al., 2016). As culturas foram realizadas em triplicata.

A extração de tecido para dosagem de citocinas na lesão se deu através da retirada das orelhas, as quais foram pesadas e adicionadas de solução para extração de citocinas: uma cápsula do inibidor de proteases (ROCHE, Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), diluída em 50 mL de PBS, na proporção de 1000 µL desta solução para 50 mg de tecido. O tecido foi, então, macerado com homogeneizador elétrico e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, e congelado a -70°C até a realização do teste de ELISA.

A quantificação de parasitos foi realizada pela técnica de diluição limitante (VIEIRA et al., 1996). Para a quantificação da carga parasitária das lesões cutâneas, as orelhas infectadas foram removidas e desinfetada em álcool 70% durante 5 minutos e secas ao ar em capela de fluxo laminar. Com auxílio de pinças os tecidos das orelhas, foram separados a começar pelo canal auricular. Em seguida, as duas faces da orelha foram cortadas em pequenos pedaços e transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 ml contendo 2 ml de meio 199 completo e suplementado com 20% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) inativo pelo calor.

As amostras foram diluídas em série (1:4), sendo as ponteiros da pipeta descartadas após cada diluição a fim de evitar um resultado falso-positivo provocado pelo arraste de parasitos. As placas foram incubadas durante 10 dias em BOD (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 25 ° C para investigar o crescimento de promastigotas. A estimativa do número de parasitos presentes nas lesões se deu a partir da observação do último poço que apresentou *Leishmania*, e assim, os resultados foram expressos em forma de logaritmo negativo.

Análise histopatológica

Após a eutanásia dos animais, os pâncreas foram coletados, fixados em formaldeído 10% tamponado e rotineiramente processados para a preparação de lâminas histológicas (COSKUN et al., 2005). Foi realizada uma sequência seriada de cortes com a espessura de 5 µm e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para a análise histopatológica. As fotomicrografias foram obtidas através de uma câmera Olympus QColor 5 acoplada a um microscópio Olympus BX60. Na avaliação histopatológica, foram capturadas 20 imagens dos cortes histológicos do pâncreas utilizando a objetiva de 20X, sendo analisada uma área total

de 38, 784 mm² por animal. Então a área total das ilhotas foi quantificada sendo expressa em mm².

Quantificação de citocinas

As citocinas presentes nas culturas de células dos linfonodos, tecidos das orelhas e nos sobrenadantes dos macrófagos derivados dos monócitos de medula foram quantificadas pelo teste de ELISA sanduíche. As amostras das orelhas foram analisadas quanto à presença das citocinas IL-10, IFN- γ , TNF e IL-1 β . As culturas de células dos linfonodos foram avaliadas quanto à presença de IL-10 e IFN- γ . Nos sobrenadantes dos macrófagos avaliou-se a presença de IL-10, TNF, IL-1 β e as quimiocinas CXCL1 e CXCL2. Todas as citocinas e quimiocinas foram avaliadas por meio da utilização de kits exclusivos para a detecção das mesmas (BD Pharmingen, São Diego, CA, EUA e R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e o procedimento foi realizado exatamente como recomenda os fabricantes.

Atividade da enzima arginase I

A atividade de arginase I foi mensurada a partir do lisado de macrófagos derivados de medula óssea ou a partir de células do homogenato das orelhas, como descrito por Corraliza e colaboradores (1995), com algumas modificações (KROPF et al., 2005). As orelhas foram maceradas, como descrito anteriormente, e do homogenato obtido, 35 μ L foram utilizados para o ensaio. As células que se encontravam no homogenato da orelha ou os macrófagos derivados de monócitos de medula óssea ($5 \times 10^5/500 \mu$ L) foram lisadas com 50 μ L de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos em agitação. Após a lise, a arginase foi ativada com a adição de seus co-fatores: 50 μ L de 10 mM MnCl₂ e 50 μ L de 50 mM Tris HCl (pH 7,5) a 55°C por 10 minutos. Em seguida a amostra obtida foi transferida para outra placa de 48 poços em duas diferentes concentrações. Em um dos poços foi feita a transferência da amostra pura, 55 μ L, e a partir desta foi feita uma diluição de 1:10 (5 μ L de amostra + 45 μ L de H₂O destilada).

Para que fosse mensurada a atividade da enzima foi adicionado às amostras o substrato da mesma, 50 μ L de 0,5 mM de L-arginina (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) (pH 9,7), após o que, as amostras foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Em seguida a reação foi parada com a adição de 400 μ L de uma mistura de ácidos (H₂SO₄-H₃PO₄-H₂O) na proporção de: 1:3:7. Foram então adicionados 25 μ L de α -isonitrosopropiofenol (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA) 9% em etanol 100%. A placa foi então incubada em banho maria a 95°C por 45 minutos. A curva padrão foi feita a partir de ureia (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO,

EUA) 1 mg/mL diluída sucessivamente 1:2. Após os 45 minutos de incubação a 95°C, 100 µL de cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços e foi realizada leitura em leitor de microplacas a 540 nm. O resultado foi expresso como unidade de atividade de arginase por 5×10^5 células. Cada unidade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol ureia/minuto.

Dosagem da produção *in vitro* de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) por BMDM

Para a quantificação de óxido nítrico (NO) foram utilizados os sobrenadantes dos macrófagos derivados dos monócitos de medula. O acúmulo de Nitrito (NO₂), como indicador da produção de NO, foi medido utilizando o reagente de Griess. Um volume de 100 µL do sobrenadante foi retirado e a ele adicionado igual volume do reagente de Griess (sulfanilamida 1% (p/v) diluídos em H₃PO₄ a 5%, alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% (v/v) em água (GREEN et al., 1982), e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos na ausência de luz. A produção de NO foi estimada pela quantificação do metabólito estável de NO, o nitrito. A absorvância a 540 nm foi medida em leitor de Elisa Spectra Softmax, em comparação com o branco que continha apenas meio de cultura DMEM F12e reagente de Griess. A concentração de NO foi determinada utilizando uma curva padrão gerada com nitrito de sódio em concentrações de 200 a 0,9 µM (SOUZA et al., 2007).

Para avaliar a produção de ROS por macrófagos em ensaios de luminometria, as células foram obtidas como descrito previamente e ressuspensas em meio RPMI incolor. Foram usadas placas de 96 poços opacas (NUNC, Rochester, NY, EUA). Em cada poço foram colocados 10^6 macrófagos derivados de monócitos de medula óssea. Em cada poço foi adicionado 0,05 mM luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA). As células foram estimuladas com 10^7 partículas/ml Zymosan (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), 50 U/mL de IFN- γ (BD Biosciences Pharmingen, São Jose, CA, EUA), 100 ng/mL de LPS (InvivoGen, São Diego, CA, EUA) e foi feita a infecção *in vitro* destas células nas seguintes proporções: 10 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago. A placa foi colocada em um luminômetro (Packard, Waltham, MA, EUA), que mede a intensidade da luz produzida. A produção de ROS foi medida por duas horas, em intervalos de dois minutos entre cada medição. A detecção de radicais de oxigênio é feita pela reação do luminol com as espécies reativas de oxigênio produzindo luz. Em um primeiro passo, o luminol é reduzido por moléculas reativas, como •OH, H₂O₂ ou ONOO-, que atacam sua ligação dinitrogênica adicionando mais dois oxigênios

a um dos anéis, e depois é capaz de combinar com o O₂^{•-} e produzir luz. Essa forma de radiação é captada pelo luminômetro e representada como unidades relativas de luz (RLU, em inglês) por segundo.

Análise Estatística

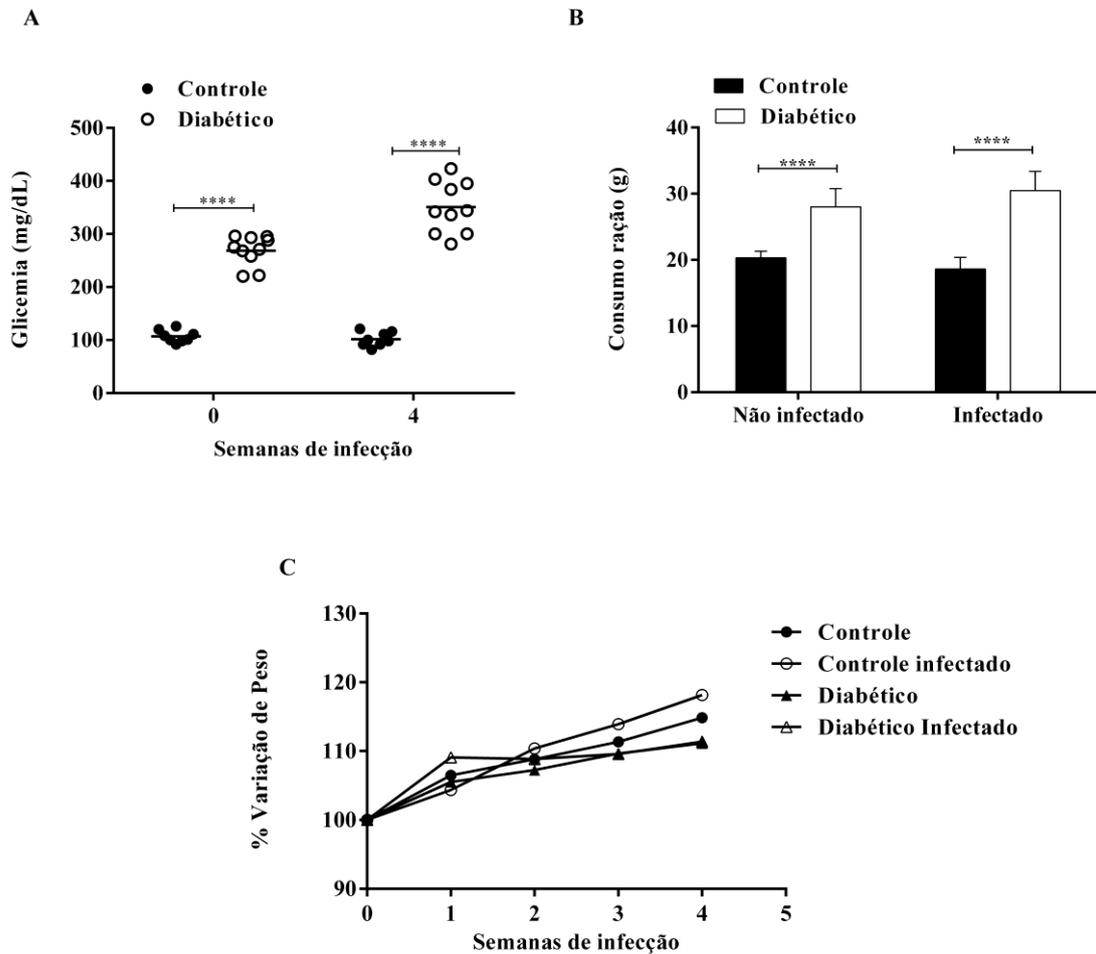
Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão (EP) para cada grupo. Foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido de Sidak para determinar diferenças entre os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 28 versão 6.00 para Windows 7. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Resultados

Desenvolvimento do modelo experimental de diabetes mellitus em camundongos

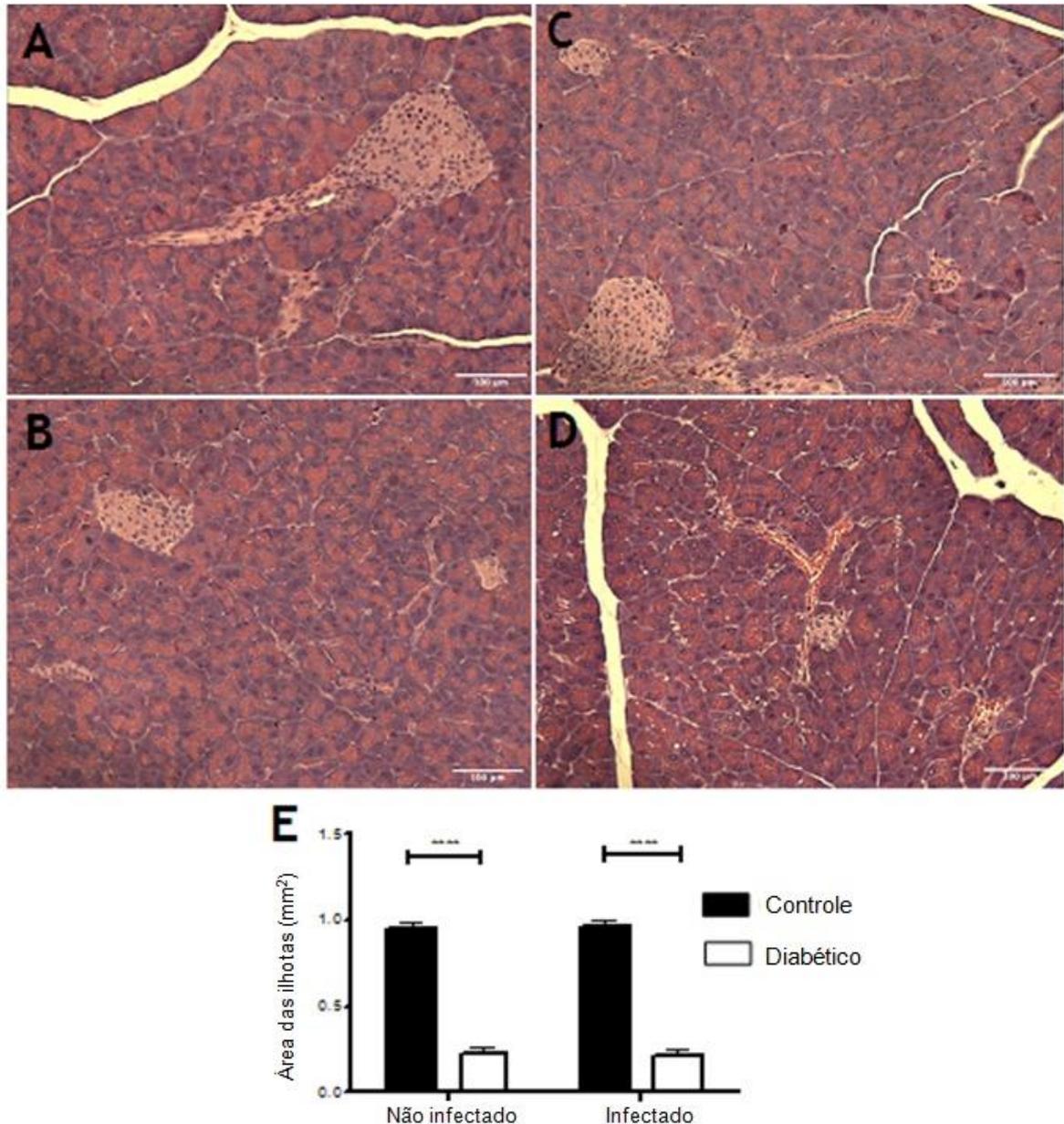
Os camundongos C57BL/6 que foram tratados com STZ (50 mg/kg) durante cinco dias consecutivos, apresentaram aumento significativo da glicemia, uma semana após a última dose, em relação aos animais tratados apenas com tampão citrato 0,1 M (Figura 2A). Com relação ao consumo médio semanal de ração pelos camundongos, verificou-se que os animais diabéticos, independente da infecção por *L. amazonensis*, apresentaram um maior consumo quando comparados aos animais controles (Figura 2B). Já na avaliação do peso corporal, os resultados não mostraram alterações significativas entre os animais diabéticos e controles infectados ou não por *L. amazonensis* (Figura 2C).

Figura 2 Glicemia, consumo alimentar e variação do peso de camundongos C57BL/6 diabéticos e controles, antes da infecção e na quarta semana após a infecção por *L. amazonensis*. A indução do diabetes mellitus se deu através de injeção via intraperitoneal de doses baixas (50 mg/kg) de estreptozotocina durante cinco dias consecutivos. Foram considerados diabéticos os camundongos que apresentaram glicemia de jejum acima de 200mg/dL (A). O consumo de ração foi avaliado semanalmente, durante quatro semanas, através da pesagem da ração ofertada aos animais (B). O peso dos animais (C) também foi avaliado semanalmente durante quatro semanas com auxílio de uma balança analítica. Valores apresentados para o consumo de ração correspondem à média do consumo semanal pelos animais até a quarta semana de infecção (**** p<0, 0001). Foi realizado Teste Two-Way Anova seguido de Sidak.



A avaliação histopatológica do pâncreas mostrou que animais diabéticos, tratados com STZ, apresentaram uma redução de aproximadamente cinco vezes na área das ilhotas de Langerhans, quando comparados aos animais controles, tratados apenas com tampão citrato, independente da presença da infecção por *L. amazonensis* (3E). Através da análise morfométrica foi possível observar essa diminuição em animais diabéticos (3B) e diabéticos infectados (3D), diferentemente dos animais controles (3A) e animais controles infectados (3C).

Figura 3 A indução de diabetes mellitus, utilizado STZ, reduziu a área das ilhotas de Langerhans em camundongos C57BL/6. Na avaliação histopatológica dos pâncreas dos animais controles (A), controles infectados (C), diabéticos (B) e diabéticos infectados (D), foram capturas das 20 imagens dos cortes histológicos do pâncreas utilizando a objetiva de 20X. A área total das ilhotas foi quantificada sendo expressa em mm² (E). Escala da imagem: 100µm. Foi realizado Teste Two-Way Anova seguido de Sidak. (**** p<0, 0001).



BMDMs de camundongos C57BL/6 diabéticos são mais suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*

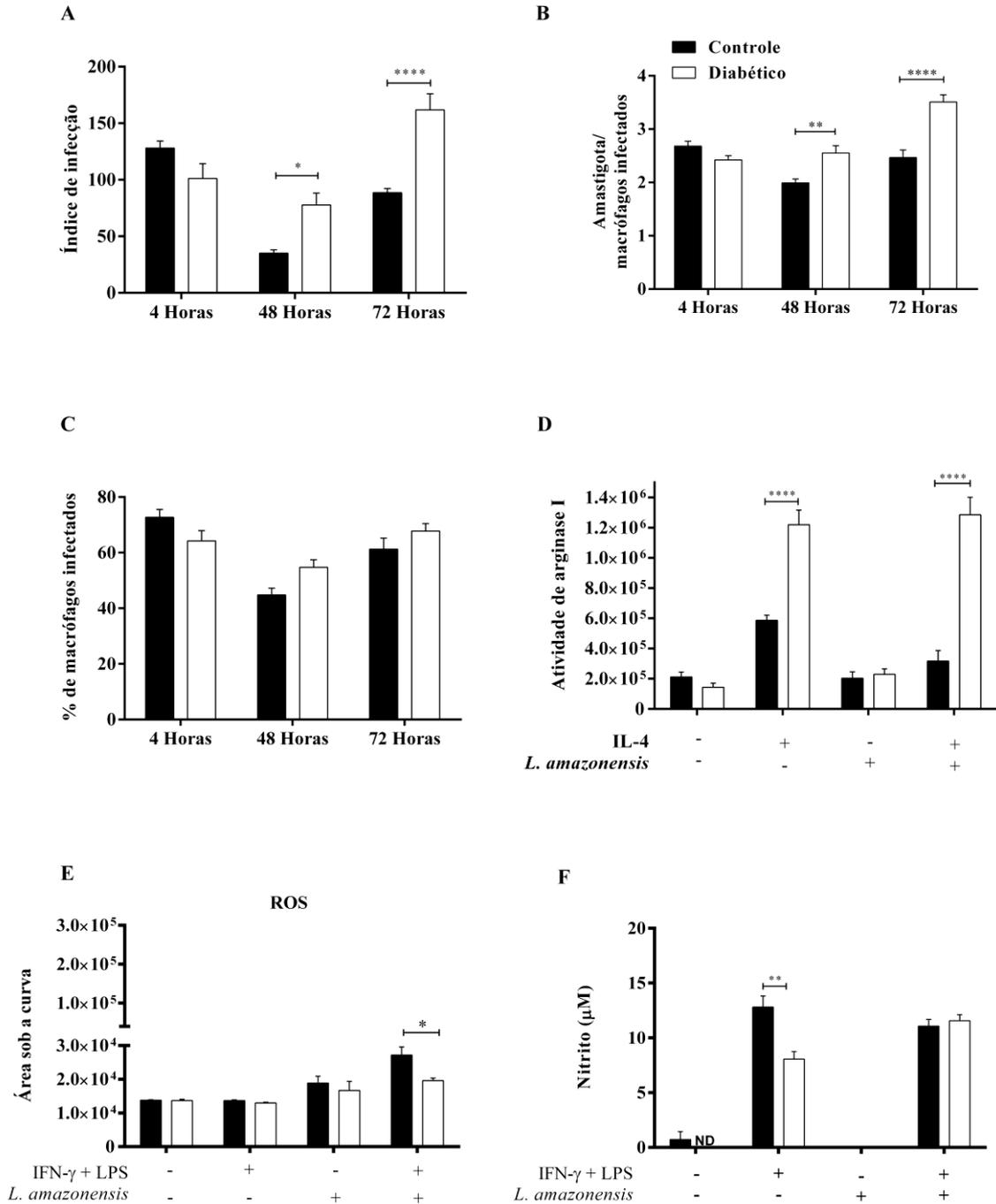
Visando melhor entendimento das consequências do diabetes mellitus sobre a infecção por *L. amazonensis*, infectou-se macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) ($3 \times 10^5 / 200 \mu\text{L}$) de camundongos controles e diabéticos com 4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago e avaliou-se a carga parasitária desses BMDMs após 4,

48 e 72 horas. A figura 4 mostra o índice de infecção [% de células infectadas x N^o de amastigotas/N^o total de células (300)] (4A), o número de amastigotas por macrófagos infectados (4B) e a porcentagem de macrófagos infectados (4C). Nos tempos de 48h e 72h o índice de infecção foi aproximadamente duas vezes maior nos macrófagos dos camundongos diabéticos, comparados aos controles (Figura 4A). Concomitante a isso, a multiplicação das amastigotas também foi maior no interior dos macrófagos diabéticos, nos tempos de 48h e 72h após a infecção (Figura 4B). No entanto, ao analisar o percentual de macrófagos infectados, não foi encontrada diferença estatística entre macrófagos de camundongos diabéticos e controles, dentro dos tempos analisados (Figura 4C). Esses achados sugerem que macrófagos de camundongos diabéticos não conseguem controlar a multiplicação do parasito durante a infecção por *L. amazonensis*, sendo menos eficientes na eliminação do mesmo.

Os BMDMs dos camundongos diabéticos apresentaram atividade de arginase I duas vezes maior, quando comparados aos macrófagos dos animais controles quando estimulados apenas com IL-4, ou estimulado por essa citocina e infectados por formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (Figura 4D). Com relação à produção de ROS, os dados mostram que houve diferença estatística entre os macrófagos dos camundongos diabéticos e controles quando estimulados com IFN- γ e LPS e infectados por *L. amazonensis* (Figura 4E), sendo essa produção maior por macrófagos dos camundongos controles. Já a produção de nitrito, composto intermediário na produção de NO, produto do metabolismo de iNOS, foi significativamente maior no sobrenadante de macrófagos dos camundongos controles quando estimulados com IFN- γ e LPS, do que por macrófagos dos camundongos diabéticos (Figura 4F), o que pode comprometer a eliminação de patógenos por essas células. De forma interessante, a produção de NO foi igual para os dois tipos de macrófagos expostos ao estímulo de IFN- γ e LPS e infectados por promastigota de *L. amazonensis*.

Figura 4 BMDMs de camundongos C57BL/6 diabéticos são mais suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*. Para avaliar a carga parasitária de macrófagos derivados de medula óssea ($3 \times 10^5/200\mu\text{L}$) de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos, infectou-se essas células com 4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago. Após 4, 48 e 72 horas foi avaliado o índice de infecção (A), o número de amastigotas por macrófagos infectados (B) e a porcentagem de macrófagos infectados (C). Para avaliar a atividade de arginase I, BMDMs (5×10^5 células/500 μL) foram estimulados ou não com IL-4 (40U/ml), e posteriormente infectados ou não por 5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago. Após 48 horas de incubação avaliou-se a atividade de arginase I a partir do lisado desses macrófagos (D). Para a avaliação de ROS, os BMDMs (10^6 células por poço) foram estimulados ou não com IFN- γ (50 ng/mL) e LPS (100 ng/mL) e 5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago isoladamente ou em associação com os estímulos citados acima, por até 2h após estímulos (E). BMDMs (5×10^5 células/500 μL)

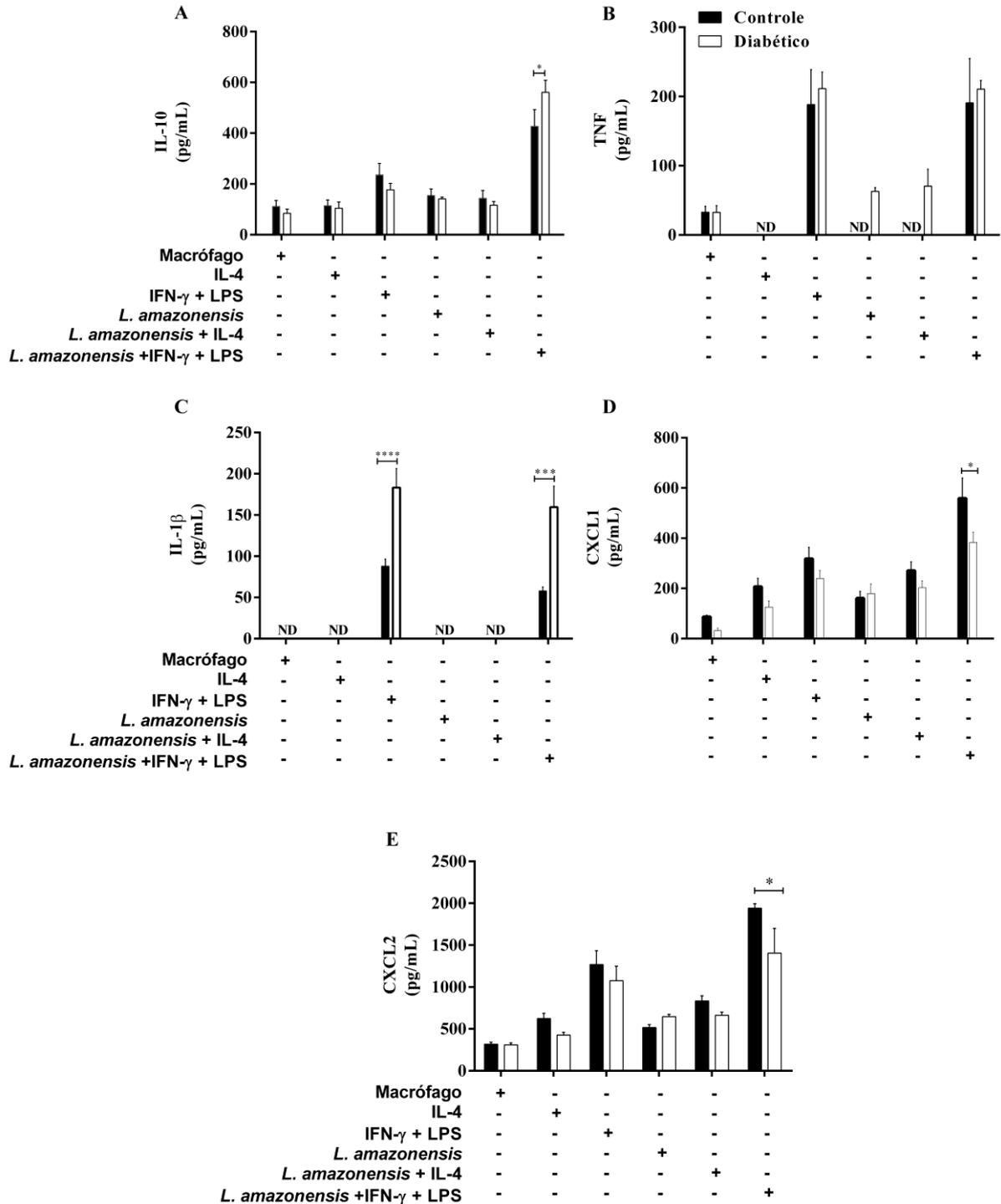
foram estimulados ou não com IFN- γ (50 ng/mL) e LPS (100 ng/mL), e 5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago isoladamente ou em associação com os estímulos citados acima. Após 48 horas de incubação avaliou-se a produção de NO por esses macrófagos (F). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$). Teste Two-Way Anova seguido de Sidak.



Avaliação das concentrações de IL-10, TNF, IL-1 β , CXCL1 e CXCL2 no sobrenadante de BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos

A figura 5 mostra a produção das citocinas IL-10 (A), TNF(B), IL-1 β (C) e das quimiocinas CXCL1 (D) e CXCL2 (E) por BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos. A produção de IL-10 foi significativamente maior no sobrenadante de macrófagos diabéticos na presença de promastigotas de *L. amazonensis* juntamente com IFN- γ + LPS, quando comparada aos macrófagos dos camundongos controles sob os mesmos estímulos (Figura 5A). Quanto à produção de TNF (Figura 5B), não foi observada diferença estatística entre os grupos. Quando estimulados com IFN- γ + LPS isoladamente ou juntamente com promastigotas de *L. amazonensis*, BMDMs de camundongos diabéticos produziram mais IL-1 β quando comparados aos controles (Figura 5C). Com relação à produção de CXCL1 (Figura 5D) e CXCL2 (Figura 5E), observou-se uma menor produção de ambas quimiocinas pelos BMDMs dos camundongos diabéticos na presença de promastigotas de *L. amazonensis*, IFN- γ + LPS, quando comparados aos BMDMs dos camundongos controles.

Figura 5 Avaliação das concentrações de IL-10, TNF, IL-1 β , CXCL1 e CXCL2 no sobrenadante de BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabético. Macrófagos derivados de medula óssea (5×10^5 células/500 μ L) foram incubados por 16h, com os seguintes estímulos: IL-4 e LPS + IFN- γ , sendo 40U/mL de IL-4, 50 ng/mL de IFN- γ e 100 ng/mL de LPS. Após 16h de incubação algumas dessas células foram infectadas com 5 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago. Foram coletados os sobrenadantes para a avaliação de citocinas e quimiocinas pelo teste de ELISA, nos tempos de 24h (TNF) e 48h (IL-10, IL-1 β , CXCL1 e CXCL2) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$). Teste Two-Way Anova seguido de Sidak. Os resultados são a média de três experimentos independentes. ND: não detectado.

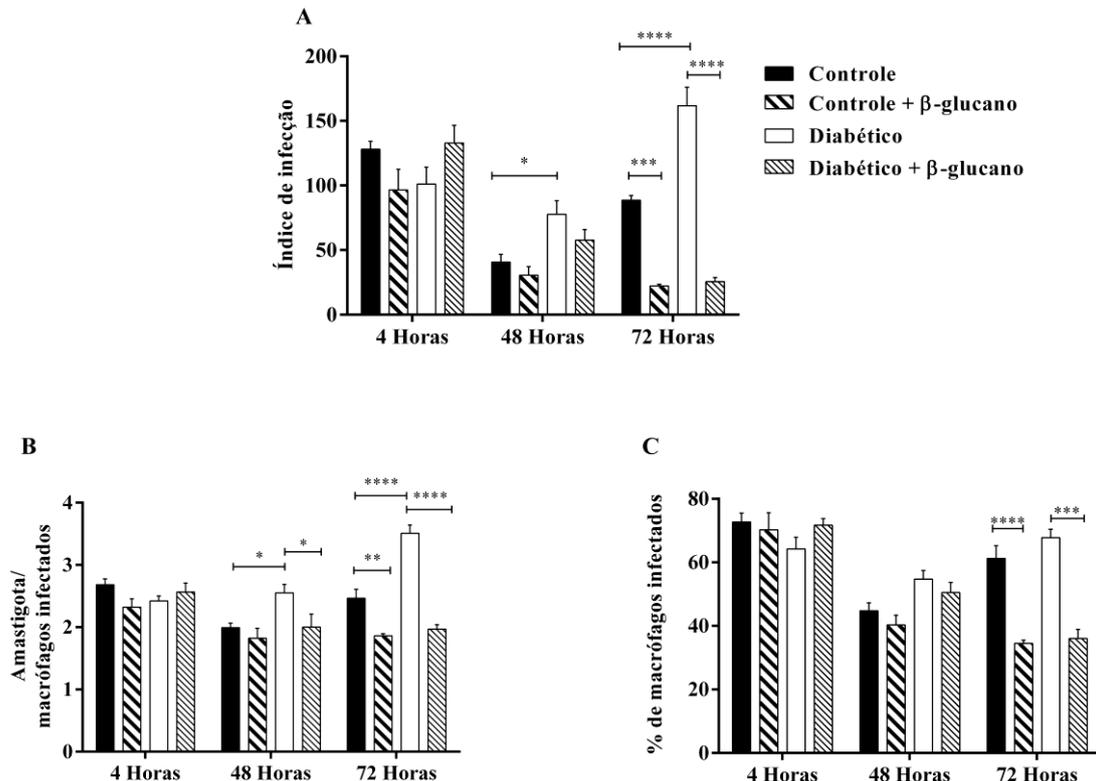


β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* reduz a carga parasitária de BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos

A carga parasitária dos BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos foi avaliada nos tempos de 4, 48 e 72 horas após a infecção. A figura 6 mostra o índice de

infecção (6A), o número de amastigotas por macrófagos infectados (6B) e a porcentagem de macrófagos infectados (6C). No tempo de 72h o tratamento com β -glucano reduziu aproximadamente quatro vezes o índice de infecção em macrófagos de camundongos controles, já em macrófagos de camundongos diabéticos essa redução chegou a seis vezes, quando comparados aos não tratados (Figura 6A). O número de amastigotas por macrófagos infectados foi significativamente menor nos macrófagos de camundongos diabéticos tratados com BG, no tempo de 48h (Figura 6B). Já no tempo de 72h esse número foi reduzido tanto em macrófagos de camundongos diabéticos quanto em macrófagos dos animais controles (Figura 6B). Ao analisar o percentual de macrófagos infectados (Figura 6C), foi encontrada uma redução significativa nos macrófagos tratados com BG, no tempo de 72 horas após a infecção. Esses achados sugerem que o β -glucano de *S. cerevisiae* possui efeito inibidor sobre a multiplicação das amastigotas de *L. amazonensis*, reduzindo a carga parasitária dos macrófagos de camundongos controles e diabéticos.

Figura 6 β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* reduz carga parasitária de BMDMs de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos. Para avaliar os efeitos do β -glucano de *S. cerevisiae*, derivou-se macrófagos de medula óssea ($3 \times 10^5/200\mu\text{L}$) de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos. Incubou-se essas células por 16h, com 20 μg de BG/ml de soluço salina 0,09%. Após essas 16h horas na presença deste estímulo foi realizada a infec o destas células na propor o de 4 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* para cada macrófago. Após 4, 48 e 72 horas foram avaliados o  ndice de infec o (A), o número de amastigotas por macrófagos infectados (B) e a porcentagem de macrófagos infectados (C). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Teste Two-Way Anova seguido de Sidak.



Curso da infec o e avalia o da carga parasitária e atividade de arginase I em camundongos C57BL/6 controles e diabéticos

A partir dos resultados encontrados nos experimentos *in vitro*, buscou-se avaliar a influência do DM na infec o por *L. amazonensis* em modelo experimental *in vivo*. Infectou-se camundongos C57BL/6 controles e diabéticos, nas as orelhas (via intradérmica), com a cepa PH8 de *L. amazonensis*, para avalia o do desenvolvimento da doença até a quarta semana após o inóculo. Observou-se que animais diabéticos apresentaram um menor desenvolvimento das lesões a partir da terceira semana de infec o comparado aos animais controles (Figura 7A).

Apesar de camundongos C57BL/6 diabéticos infectados por *L. amazonensis* terem apresentado uma menor lesão nas orelhas quando comparados aos animais controles, esses

animais não conseguiram controlar a carga parasitária nessas lesões na quarta semana de infecção, sendo esta significativamente maior quando comparados aos controles (Figura 7B). Com relação à avaliação da atividade de arginase I durante o curso de infecção, observou diferença significativa entre os grupos infectados, sendo a produção dessa maior nas lesões dos camundongos diabéticos (Figuras 7C).

Embora os camundongos diabéticos tenham apresentado lesões cutâneas menores, foi observada uma lesão ulcerada nas orelhas desses animais, quando comparados aos animais controles, na quarta semana de infecção (Figura 8).

Figura 7 Desenvolvimento e aspectos das lesões cutâneas, quantificação da carga parasitária e atividade de arginase I nas orelhas de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos infectados por *L. amazonensis*.

Os camundongos foram infectados nas orelhas com 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e as lesões foram medidas semanalmente. Cada ponto representa a média de 8 e 10 orelhas por grupo até a quarta semana de infecção (A). Na quarta semana de infecção os camundongos foram eutanasiados e as lesões foram processadas para determinação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante (B), as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Foi avaliada a atividade da enzima arginase I a partir do lisado de células das orelhas infectadas e não infectadas (C) também na quarta semana de infecção. Análise estatística da carga parasitária foi realizada pelo Teste t. (* $p < 0,05$). Outras análises estatísticas realizadas pelo teste Two-Way Anova seguido de Sidak (** $p < 0,01$). Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente.

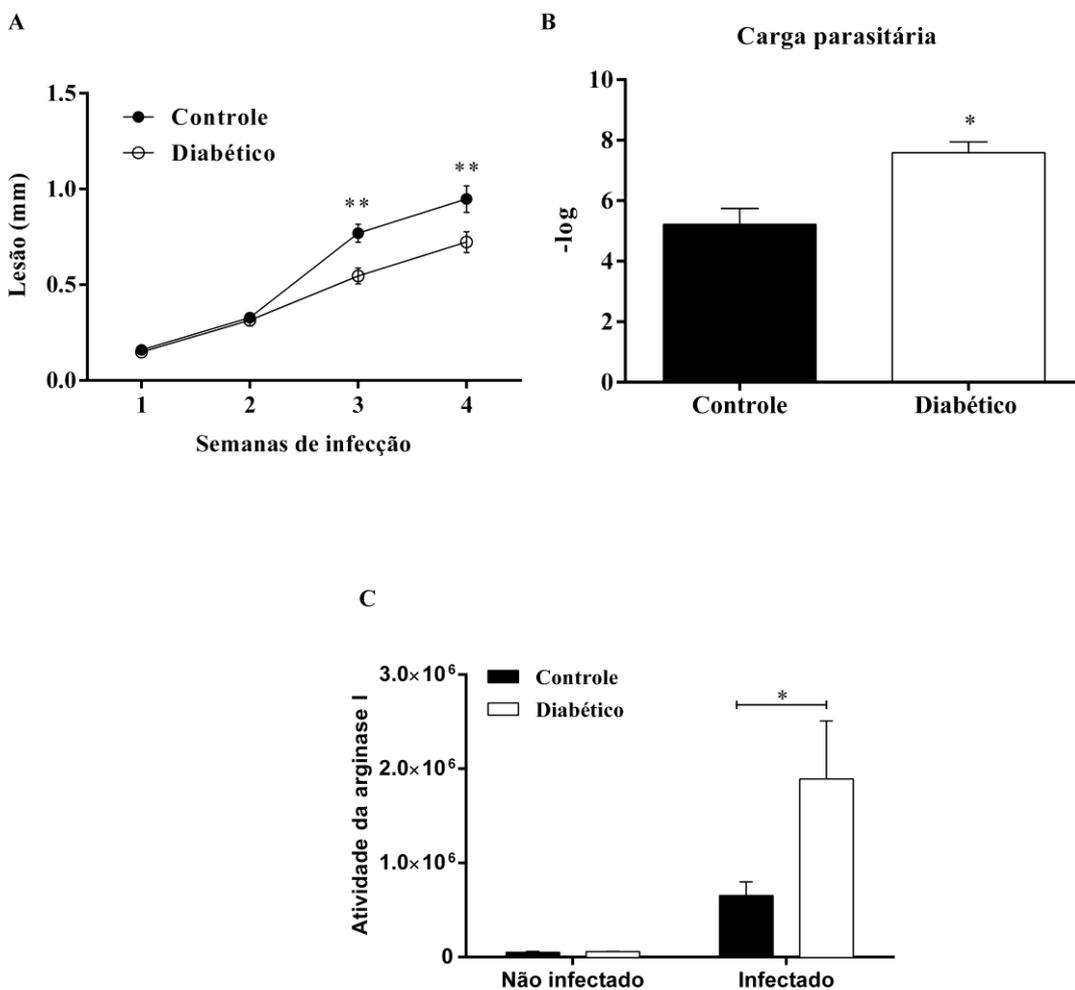
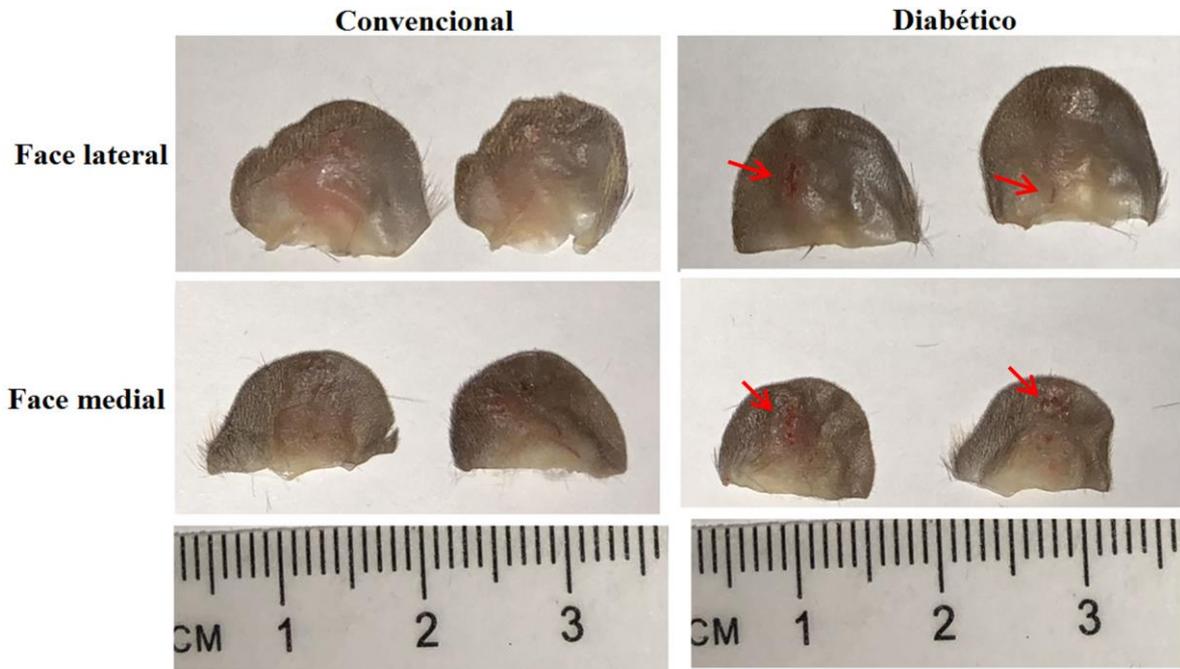


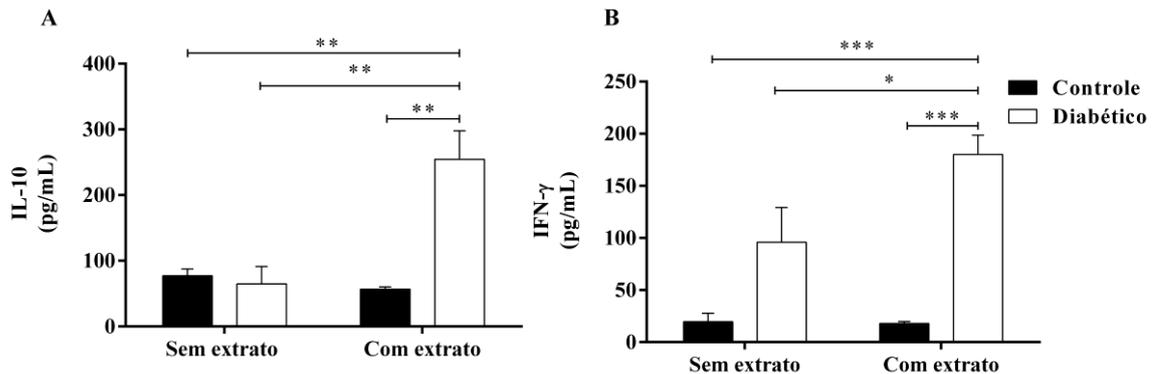
Figura 8 Aspectos das lesões cutâneas nas orelhas de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos infectados por *L. amazonensis*. Os camundongos foram infectados nas orelhas com 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e as lesões foram medidas semanalmente. Avaliou-se os aspectos das lesões desses camundongos, a imagem mostra as lesões na quarta semana de infecção. As setas indicam lesões ulceradas. Os resultados são representativos de três experimentos desenvolvidos independentemente.



Avaliação das concentrações de IL-10 e IFN- γ nos linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos infectados por *L. amazonensis*

Após avaliar o curso da infecção nos camundongos controles e diabéticos, avaliamos o perfil de resposta imune desenvolvido nesses animais. Assim, observamos que a produção de IL-10 (Figura 9A) pelas células dos linfonodos drenantes dos camundongos diabéticos infectados por *L. amazonensis*, quando estimuladas com extrato total de *L. amazonensis* quatro vezes maior, quando comparada às células dos animais controles infectados, estimuladas com extrato total de *L. amazonensis*. A produção dessa citocina também foi significativamente maior quando comparada às células não estimuladas com extrato total de *L. amazonensis*. Com a análise de IFN- γ (Figura 9B), verificou-se que os níveis dessa citocina foram significativamente maiores nas células dos linfonodos de camundongos diabéticos infectados, estimuladas com extrato total de *L. amazonensis*, quando comparada as dos animais controles infectados, estimuladas ou não com extrato total de *L. amazonensis*. A produção dessa citocina também diferiu entre às células dos linfonodos dos camundongos diabéticos infectados, sendo a produção dessa, significativamente maior nas células estimuladas com o extrato total de *L. amazonensis*, quando comparada às sem estímulo.

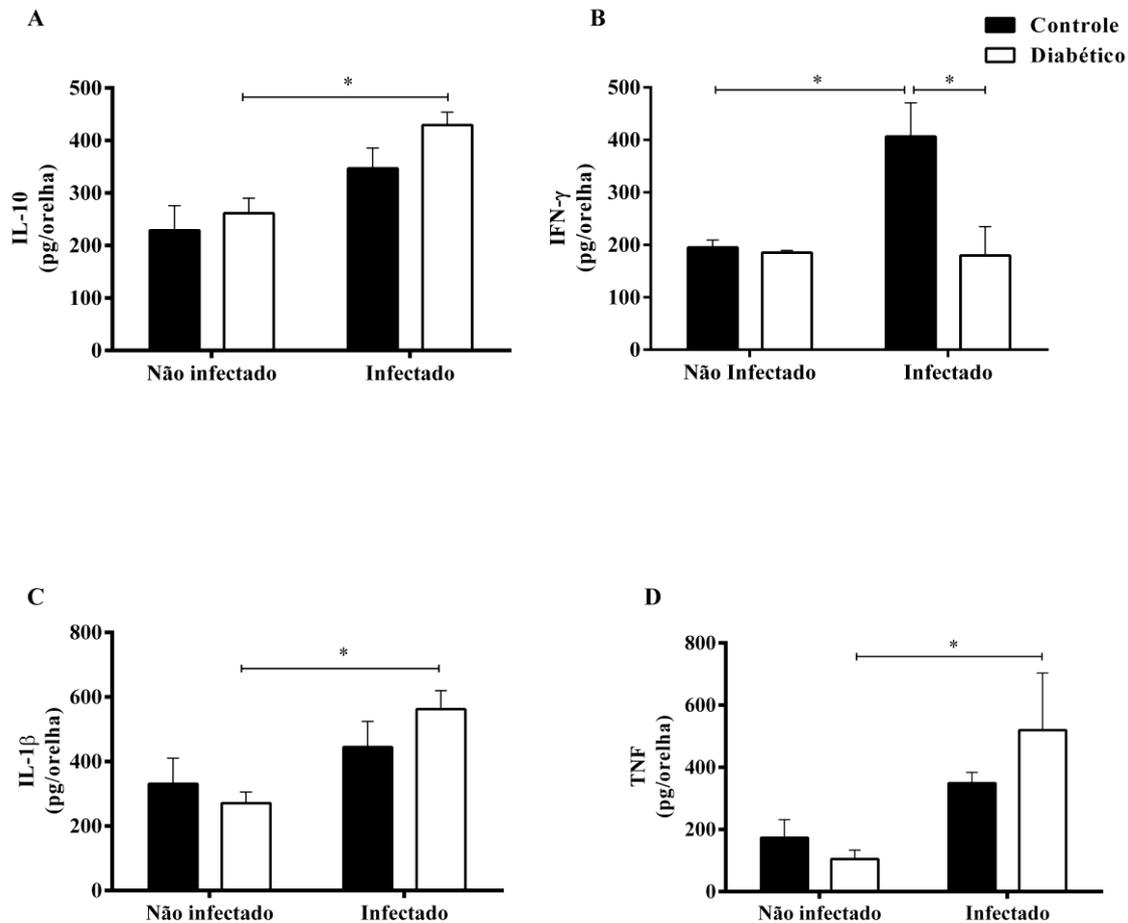
Figura 9 Avaliação das concentrações de IL-10 e IFN- γ em células dos linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos infectados por *L. amazonensis*. Camundongos foram infectados intradermicamente na orelha com 1×10^5 formas promastigotas de *L. amazonensis* e, na quarta semana de infecção, os linfonodos retromaxilares foram coletados e os níveis das citocinas mencionadas foram determinados por ELISA. Algumas células foram estimuladas com extrato total de *L. amazonensis*. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$). Teste Two-Way Anova seguido de Sidak. Os resultados são a média de três experimentos independentes.



Avaliação das concentrações de IL-10, IFN- γ , TNF e IL-1 β nas orelhas de camundongos C57BL/6 controle e diabéticos infectados e não infectados por *L. amazonensis*

Como a presença do diabetes tende a promover uma desregulação da resposta imune, havendo concomitantemente aumento de IL-10 e IFN- γ pelas células do linfonodo drenante estimuladas com o extrato total de *L. amazonensis*, avaliou-se o padrão de resposta imune desenvolvido no local da lesão. Assim, observamos que a produção de IL-10 (Figura 10A), IL-1 β (Figura 10C) e TNF (Figura 10D), não diferiram significativamente entre os grupos dos animais infectados. Contudo, a produção dessas citocinas foi significativamente maior nos animais diabéticos infectados, quando comparados aos animais diabéticos sem infecção. No que se refere ao IFN- γ (Figura 10B) foi observada uma produção 50% maior pelos animais controles infectados por *L. amazonensis*, quando comparado aos animais sem infecção e aos animais diabéticos infectados.

Figura 10 Avaliação das concentrações de IL-10, IFN- γ , TNF e IL1- β nas orelhas de camundongos C57BL/6 controles e diabéticos por *L. amazonensis*. Camundongos foram infectados intradermicamente na orelha com 1×10^5 formas promastigotas de *L. amazonensis* e, na quarta semana de infecção, as orelhas foram coletadas e maceradas em solução com inibidor de protease e os níveis das citocinas mencionadas foram determinados pelo teste de ELISA. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$). Teste Two-Way Anova seguido de Sidak. Os resultados são a média de três experimentos independentes.



Discussão

A hiperglicemia crônica, ocasionada pelo diabetes mellitus, pode alterar a função do sistema imunológico, diminuindo a função de neutrófilos, macrófagos, monócitos, prejudicando a quimiotaxia e adesão de leucócitos, a fagocitose e a produção de citocinas, aumentando dessa forma a susceptibilidade a diversas infecções (HODGSON et al., 2015; MARTINEZ et al., 2016; YANO et al., 2012). Diante da escassez de estudos que abordam a evolução da leishmaniose correlacionada ao diabetes mellitus, nesse trabalho buscou-se avaliar as consequências desse distúrbio metabólico na infecção por *Leishmania amazonensis*.

Os dados mostram que a utilização de múltiplas doses baixas (50mg/Kg) de STZ administrada intraperitonealmente por 5 dias consecutivos, aumentou significativamente a

glicemia de camundongos C57BL/6 levando ao desenvolvimento do diabetes mellitus. A indução de diabetes em modelos experimentais pode ser realizada por meio da utilização de produtos que são tóxicos para as células β -pancreáticas, de maneira simples e conveniente (SZKUDELSKI, 2001). A STZ é uma droga amplamente utilizada para a indução de diabetes experimental, sendo que a administração de múltiplas doses baixas (40-50 mg/kg) por cinco dias consecutivos, vem sendo largamente utilizada com o intuito de evitar toxicidade inespecífica (KITADA; OGURA;KOYA, 2016; LEE et al., 2016).

Qi e colaboradores (2005) induziram diabetes em camundongos C57BL/6 utilizando injeções via intraperitoneal de 50 mg/kg de STZ durante 5 dias consecutivos. Eles observaram um aumento significativo da glicemia dos animais tratados com STZ uma semana após a última dose e que na quinta semana a glicemia do grupo tratado com STZ era maior que 400 mg/dL. Outro estudo que corrobora com os dados obtidos neste trabalho é o de Lee e colaboradores (2016), ao administrarem doses de 50 mg/kg de STZ intraperitonealmente por 5 dias em camundongos C57BL/6, eles observaram aumento significativo da glicemia (> 200 mg/dL) uma semana após a última dose de STZ. Ainda com relação à indução de DM, foi observado que os animais considerados diabéticos (glicemia >200 mg/dL), apresentaram uma redução de aproximadamente 5 vezes na área das ilhotas de Langerhans em relação aos animais controles. Lobato e colaboradores (2015), ao utilizarem STZ para induzirem diabetes mellitus em ratos wistar, também observaram uma redução significativa das ilhotas de Langerhans nesses animais, comparados aos animais sem diabetes.

Utilizando modelo *in vitro* para entender a influência do diabetes mellitus na infecção por *L. amazonensis*, observou-se que macrófagos de camundongos diabéticos apresentaram uma menor produção de NO ao serem estimulados com IFN- γ e LPS, quando comparados aos macrófagos dos animais controles. Com isso constatamos que os macrófagos de camundongos diabéticos são hiporresponsivos ao IFN- γ e LPS. Quando estimulados com IFN- γ e LPS e infectados por *L. amazonensis*, os macrófagos igualaram essa produção. Tseng e colaboradores (1997) ao avaliarem os efeitos de altos níveis de glicose sobre macrófagos J774, observaram que essas células, ao serem incubadas em meio com altas concentrações de glicose, apresentaram uma menor expressão da iNOS e baixa produção de NO, ao serem estimulados com LPS. Pavlou e colaboradores (2018), também observaram uma redução na produção de NO, por macrófagos derivados de medula óssea gerados sob condições de alta concentração glicose a longo prazo, quando estimulados IFN- γ e LPS. É importante ressaltar que o processo de eliminação da *Leishmania* ocorre principalmente através da produção do

óxido nítrico, que é gerado a partir da enzima iNOS, que é induzida por IFN- γ , que quando ativada oxida a L-arginina em L-citrulina e NO, molécula responsável pela morte do parasito (GREEN et al., 1990b; LYKENS et al., 2010).

Concomitante a isso, os BMDMs de camundongos diabéticos apresentaram uma maior atividade de arginase I quando estimulados com IL-4, apresentaram também maior produção de IL-10 quando estimulados com IFN- γ e LPS e infectados por *L. amazonensis*, sugerindo um fenótipo melhorado para um perfil de macrófagos alternativamente ativados. Além disso, os BMDMs de camundongos diabéticos apresentaram uma maior produção de IL-1 β quando estimulados por IFN- γ e LPS isoladamente ou na presença de *L. amazonensis*. Esses dados sugerem que a hiperglicemia sensibiliza os BMDMs a estímulos de diferentes perfis de citocinas, ou seja, eles apresentam respostas à estimulação de citocinas do tipo Th1 e Th2, o que pode contribuir para a resposta imune desregulada observada no diabetes mellitus.

Pavlou e colaboradores (2018) observaram em seu estudo que macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6J, gerados sob condições de alta concentração glicose a longo prazo, apresentaram uma série de alterações intrínsecas em comparação com as células geradas em condições normais de glicose. Macrófagos gerados sob condições de altas taxas de glicose a longo prazo apresentaram níveis mais altos de IL-1 β após a estimulação com IFN γ e LPS, porém produziram níveis mais baixos de óxido nítrico. Segundo os autores, eles também expressaram níveis mais altos de atividade de arginase I e IL-10 quando estimulados por IL-4, em comparação com macrófagos gerados sob condições normais de glicose.

Com relação às quimiocinas CXCL1 e CXCL2, nossos dados mostram que a produção de ambas foi menor em BMDMs de camundongos diabéticos quando estimulados com IFN- γ e LPS e infectados por *L. amazonensis*. CXCL1 é secretada por monócitos e macrófagos e é quimiotática para leucócitos polimorfonucleares, já CXCL2 é expressa por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais e tem atividade quimioatrativa de neutrófilos (MIURA; RIKIHISA, 2009). Martinez e colaboradores (2016) observaram que a presença do DM em camundongos C57BL/6, induzido por STZ, levou a uma menor produção de CXCL1 e CXCL2 uma hora após a infecção por *Klebsiella pneumoniae*, o que poderia ter contribuído segundo os autores, para um menor recrutamento de granulócitos para espaço aéreo alveolar dos animais diabéticos, aumentando dessa forma a suscetibilidade à infecção respiratória por *K. pneumoniae*. Assim, essa redução da produção de CXCL1 e CXCL2, ocasionada pelo DM, pode acarretar também efeitos negativos na infecção por *Leishmania*, uma vez que já se tem

demonstrado que em infecção por *L. amazonensis*, a migração de neutrófilos, que depende da produção dessas quimiocinas, para o sítio da infecção durante as primeiras 24h pode controlar a carga parasitária e o desenvolvimento da lesão durante a primeira semana após a infecção, em camundongos BALB/c, sugerindo que os neutrófilos restringem o desenvolvimento inicial da doença nesses camundongos (SOUSA et al., 2014).

A análise da carga parasitária dos BMDMs mostrou que a proliferação do parasito está potencializada nos macrófagos dos camundongos diabéticos, sendo que nos tempos de 48h e 72h o índice de infecção e o número de amastigotas por macrófagos infectados, foram maiores nesses macrófagos, comparados aos dos camundongos controles. No entanto, a porcentagem de macrófagos infectados não diferiu entre os grupos nos três tempos analisados. A maior carga parasitária nos BMDMs dos camundongos diabéticos pode ser explicada, uma vez que essas células apresentaram maior atividade de arginase I e menores concentrações de NO e ROS, além de uma maior produção de IL-10. Essa maior produção de IL-10 por macrófagos de camundongos diabéticos, atua sobre essas células fazendo com que esses macrófagos se tornem refratários aos efeitos ativadores do IFN- γ (KANE; MOSSER, 2001). Kane e Mosser (2001) constataram que a IL-10 presente no sobrenadante de BMDMs infectados por *L. major* impediu a ativação de BMDMs sem infecção e diminuiu a produção de IL-12 e TNF após ativação dessas por IFN- γ /LPS. Além disso, uma maior atividade de arginase I significa maior disponibilidade de poliaminas que promove a replicação e sobrevivência do parasito (KROPF et al., 2005), levando à diminuição da capacidade efetora desses macrófagos.

Em síntese, os resultados mostram que a presença do DM altera a resposta de BMDMs, frente a diferentes estímulos. Em resposta à estimulação LPS + IFN γ , os BMDMs de camundongos diabéticos, têm capacidade reduzida para gerar NO, mas aumentaram a expressão IL-1 β . Eles também parecem ser mais sensíveis à estimulação por citocinas do tipo Th2 (por exemplo, IL-4), o que poderia explicar a falha em controlar a multiplicação parasitária.

Ao analisar os efeitos do β -glucano, observou-se uma redução significativa da carga parasitária dos BMDMs de camundongos controles e diabéticos. A redução do índice de infecção foi observada em ambos os BMDMs de camundongos controles e diabéticos, tratados com β -glucano, no tempo de 72h após a infecção. O número de amastigotas por macrófagos infectados foi significativamente menor no tempo de 48h somente nos macrófagos de camundongos diabéticos tratados com β -glucano, já nas 72h após a infecção

por *L. amazonensis* essa redução ocorreu nos macrófagos tratados com β -glucano independente da presença do diabetes mellitus. O β -glucano também reduziu no tempo de 72h o percentual de macrófagos infectados, sendo eles derivados de camundongos diabéticos ou não. Gosh e colaboradores (2013), mostraram que a Goma curdlana, um β -glucano extraído de bactérias não-patogênicas do solo, *Alcaligenes faecalis*, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, inibiu a multiplicação de amastigotas de *L. donovani* (redução máxima de 94,4%), em macrófagos peritoneais de camundongos BALBc, após 24 horas de incubação. Shivaharee e colaboradores (2016), também avaliaram o efeito de um tipo de β -glucano, o Lentinano, que é encontrado na parede celular dos corpos frutíferos de *Lentinus edodes*. Os autores observaram que na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, o lentinano foi capaz de reduzir 55,8% da carga parasitária dos macrófagos J-774A.1 infectados por *L. donovani*.

Com o intuito de elucidar as consequências do DM correlacionado a leishmaniose *in vivo*, induzimos DM em camundongos C57BL/6, através da administração de STZ. A presença do diabetes mellitus aumentou significativamente o consumo de ração pelos animais, independente da presença da infecção por *L. amazonensis*, apesar de não ter alterado o peso corporal desses animais. Omaña-Molina e colaboradores (2017), também utilizaram STZ para a indução de DM em camundongos BALB/c, e após seis semanas da indução do DM eles também observaram um aumento significativo no consumo de ração pelos animais diabéticos, destacando a presença de polifagia, uma das características do DM.

Anormalidades vasculares, observadas no DM são resultados da glicação não enzimática irreversível das proteínas, aumento do estresse oxidativo e do estado inflamatório, o que impede a liberação de óxido nítrico, resultando no aparecimento de lesões vasculares (GOLDBERG, 2009, WAUTIER; GUILLAUSSEAU, 1998). Durante a infecção por *L. amazonensis*, observou-se que as orelhas dos camundongos diabéticos apresentaram lesões significativamente menores a partir da terceira semana de infecção comparadas às lesões dos animais controles. Apesar de terem apresentado uma lesão cutânea menor, os animais diabéticos apresentaram lesões ulceradas, diferentemente dos animais controles. As complicações vasculares ocasionadas pela presença do DM poderiam explicar as lesões mais ulceradas observadas nas orelhas dos animais infectados e com tal patologia.

Além disso, os animais diabéticos não conseguiram controlar a carga parasitária nas lesões das orelhas, sendo esta significativamente maior. Relacionado a isso, está uma maior atividade de arginase I nas lesões desses animais quando comparado aos animais controles infectados, o que leva a uma maior disponibilidade de poliaminas, permitindo maior

replicação do parasito. Segundo Kane e Mosser (2001), a IL-10 é essencial para a replicação do parasito durante a infecção por *L. amazonensis* e um dos possíveis mecanismos que explicaria esse fato, é que essa citocina diminui a expressão de iNOS, favorecendo a atividade da arginase I (BALESTIERI et al., 2002; INIESTA et al., 2002).

Nesse sentido, um menor desenvolvimento das lesões e uma maior carga parasitária nos camundongos diabéticos poderiam estar relacionados à elevada produção de IL-10 pelas células dos linfonodos drenantes dos camundongos diabéticos, além de uma menor produção de IFN- γ nas lesões das orelhas desses animais. A IL-10 está envolvida na regulação da inflamação e, conseqüentemente, no controle do desenvolvimento da lesão (RUBTSOV et al., 2008 ; SOUSA et al., 2014). Em seu estudo, Souza e colaboradores (2014) observaram que, embora o bloqueio da IL-10 tenha diminuído o número de parasitos, aumentou o tamanho da lesão. Além disso, em infecções crônicas por *L. major*, a produção de IL-10 seria um mecanismo que evita a exacerbação da resposta Th1 e do dano colateral causado por este tipo de resposta, porém tal mecanismo garante a persistência do patógeno no organismo a longo prazo (ANDERSON et al., 2007). A IL-10 produzida em grandes quantidades pode atuar sobre macrófagos, levando a uma resistência aos efeitos ativadores do IFN- γ por parte dessas células (KANE; MOSSER, 2001), ou até mesmo poderia inibir a produção de NO em macrófagos, mesmo após sua ativação por IFN- γ (BARRAL-NETTO et al., 1992 ; VIETH et al., 1994).

Aliado a isso, a baixa produção de IFN- γ nas lesões dos animais diabéticos, pode ter contribuído para um aumento da carga parasitária, levando em consideração que essa citocina, que é essencial na resolução da infecção por *L. major*, apresentou uma função protetora observada na fase crônica da infecção por *L. amazonensis*, além disso, é um importante indutor de iNOS durante as primeiras semanas após a infecção (CARNEIRO et al., 2015). De forma interessante, a produção de IFN- γ foi maior nas células dos linfonodos de animais diabéticos, na presença do extrato total de *L. amazonensis*, isso pode ser devido à maior dificuldade desses animais em controlar a carga parasitária, uma vez que como demonstrado nas análises *in vitro*, macrófagos dos camundongos diabéticos são hiporresponsivos a essa citocina, produzindo menos NO, quando estimulados com LPS e IFN- γ , o que pode gerar uma produção compensatória dessa citocina para tentar combater e eliminar o parasito. Com relação às concentrações de TNF, IL-1 β e IL-10 nas lesões, a infecção por *L. amazonensis* levou ao aumento em ambos os grupos.

Em seu estudo Neto e colaboradores (2017), ao avaliarem a infecção de camundongos C57BL/6 diabéticos induzido por STZ, por *Encephalitozoon cuniculi*, observaram que os animais diabéticos infectados apresentaram níveis séricos diminuídos de IFN- γ e um aumento na produção de interleucina 6 (IL-6) e TNF, quando comparados aos animais controles infectados, além de aumentar a carga fúngica, as alterações clínicas e as lesões microscópicas no pulmão dos animais, durante a infecção. Tanowitz e colaboradores (1988), ao avaliarem a influência da hiperglicemia, ocasionada pelo DM, na infecção por *Trypanosoma cruzi*, constataram que os camundongos hiperglicêmicos induzidos por STZ desenvolveram alta parasitemia e 100% de mortalidade no dia 40 após a infecção, enquanto os camundongos normoglicêmicos exibiram baixa parasitemia transitória e ausência de mortalidade. Sendo assim, a glicose elevada faz com que células do sistema imunológico, como os macrófagos, apresentem respostas defeituosas frente à estimulação por citocinas do tipo Th1 e Th2, além de reduzida função bactericida, apresentando dessa forma uma resposta imune desregulada (PAVLOU et al., 2018).

Assim, constatou-se que a resposta imunológica de camundongos e de BMDMs de camundongos, é prejudicada frente à infecção por *L. amazonensis*, devido à presença do DM. Observamos que os BMDMs de camundongos diabéticos são mais sensíveis a estimulação por citocinas do perfil Th2 (IL-4), apresentando um perfil alternativamente ativado. Aliado a isso, os camundongos diabéticos não conseguiram controlar a multiplicação parasitária nas lesões, apresentando dessa forma uma maior carga parasitária, possivelmente devido à maior produção de IL-10 pelas células dos linfonodos drenantes e a menor produção de IFN- γ nas lesões das orelhas. Esse comprometimento da resposta imunológica, ocasionada pelo diabetes mellitus, poderia favorecer o desenvolvimento de uma forma clínica rara e grave de leishmaniose tegumentar, denominada leishmaniose cutânea difusa, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, cuja espécie causadora no Brasil é a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017).

Conclusão

Os BMDMs de camundongos diabéticos mostraram-se mais suscetíveis a infecção por *L. amazonensis*, não sendo capaz de controlar a multiplicação parasitária, apresentando maior índice de infecção quando comparados aos BMDMs dos camundongos controles. O DM alterou a resposta de BMDMs frente aos estímulos por IFN- γ e LPS, tornando essas células menos responsivas a esses estímulos, afetando negativamente a produção de NO. Aliado a isso, o aumento da produção de IL-10 e da atividade de arginase I, poderiam explicar a maior

carga parasitária dos BMDMs de camundongos diabéticos. Com relação aos efeitos do β -glucano de *Saccharomyces cerevisiae*, constatamos que o mesmo foi eficaz no controle da carga parasitária dos macrófagos derivados de camundongos diabéticos e controles, reduzindo o índice de infecção em ambos os macrófagos.

A presença do diabetes mellitus aumentou também a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis in vivo*, uma vez que os animais diabéticos infectados apresentaram uma maior carga parasitária nas lesões. Apesar de terem apresentado uma lesão menor nas orelhas, os animais diabéticos, apresentaram lesões ulceradas, diferentemente dos animais controles. A *L. amazonensis* não é uma forte indutora de citocinas de quaisquer perfis imunológicos, contudo, a presença da hiperglicemia característica do DM, levou ao aumento de IL-10 e IFN- γ pelas células dos linfonodos drenantes de camundongos diabéticos, durante a infecção intradérmica, além de diminuir a produção de IFN- γ e aumentar a atividade de arginase I nas lesões das orelhas desses animais.

Referências

AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: molecular targets and diagnosis. **Molecular aspects of medicine**, Boston, v. 57, p. 1-29, Oct., 2017.

ANDERSON, C. F. et al. CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 2, p. 285-297, Feb., 2007.

BALESTIERI, F. M. P. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, California, v. 4, n. 1, p. 23-29, Jan., 2002.

BARRAL-NETTO, M. et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, Washington, v. 257, n. 5069, p. 545-548, Jul., 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p. : il.

CARDIFF, R. D. ; MILLER, Cl. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2014, n. 6, p.655-658, 2014.

CARNEIRO, M. B. H. et al. IFN-g-Dependent Recruitment of CD4⁺ T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, Cleveland, v. 35, n. 12, p. 935-947, Jun., 2015.

COELHO, L. I. C. et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology research**, Heidelberg, v. 108, n. 3, p. 671-677, Nov., 2011.

CORRALIZA, I. M. et al. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 206, n. 2, p. 667-673, Jan., 1995.

COSKUN, O. et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Pharmacological Research**, Milão, v. 51, n. 2, p. 117-123, Feb., 2005

GHOSH, K. et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, Cambridge, v. 2007, n. 6, p. 1016-1025, May., 2013.

GOLDBERG, R. B. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Washington, v. 94, n. 9, p. 3171-3182, Sept. 2009.

GONZALEZ-LOMBANA, Cl. et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania* major infection. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e1003243, Mar., 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 126, n. 1, p. 131-138, Oct. , 1982.

GREEN, S. J. et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 144, n. 1, p. 278-283, Jan. 1990b.

GUERRA, J. A. de O. et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 48, p. 12-19, Jun., 2015.

GUPTA, S. et al. Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 617-638, Sept., 2007.

INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite immunology**, Medford, v. 24, n. 3, p. 113-118, Jan., 2002.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). IDF Diabetes Atlas. 8th Edition, 2017. Disponível em:<www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 19 de dez. de 2018.

HODGSON, K. et al. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. **Immunology**, Medford, v. 144, n. 2, p. 171-185, Jan., 2015.

- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, Jan., 2001.
- KIM, H. S. et al. Stimulatory Effect of β -glucans on Immune Cells. **Immune Network**, Seoul, v. 11, n. 4, p. 191-195, Aug., 2011.
- KITADA, M.; OGURA, Y.; KOYA, D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. **International journal of nephrology and renovascular disease**, Nova York, v. 9, p. 279, Nov., 2016.
- KEVRIC, I. ; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections - A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, Charleston, v. 33, n. 3, p. 579-93, Jul., 2015.
- KROPF, P. et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB Journal**, Rockville Pike, v. 19, n. 8, p. 1000-1002, 2005.
- KUMARI, A. et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis in an immunocompromised patient resembling histoid Hansen's disease. **Indian Dermatology Online Journal**, Vadodara, v. 9, n. 6, p. 452, Nov-Dec., 2018.
- LEE, Y. S. et al. Hepatic immunophenotyping for streptozotocin-induced hyperglycemia in mice. **Nature**, London, v. 28, n. 6, p. 1-10, Jul., 2016.
- LOBATO, R. V. et al. Metabolic effects of β -glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) per os administration in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 32, n. 1, p. 256-264, May., 2015.
- LYKENS, J. E. et al. Mice with a Selective Impairment of IFN- γ Signaling in Macrophage Lineage Cells Demonstrate the Critical Role of IFN- γ -Activated Macrophages for the Control of Protozoan Parasitic Infections In Vivo. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 184, n. 2, p. 877-885, Jan., 2010.
- MARTINEZ, N. et al. Defects in early cell recruitment contribute to the increased susceptibility to respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in diabetic mice. **Microbes and Infection**, California, v. 18, n. 10, p. 649-655, Oct., 2016.
- MOWAT, A.; BAUM, J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 284, n. 12, p. 621-627, Mar., 1971.
- MIURA, K. ; RIKIHISA, Y. Liver transcriptome profiles associated with strain-specific *Ehrlichia chaffeensis*-induced hepatitis in SCID mice. **Infection and immunity**, Davis, v. 77, n. 1, p. 245-254, Jan., 2009.
- NETO, Aldo Francisco et al. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. e0186954, Nov., 2017.

OMAHÑA-MOLINA, M. et al. Type 2 diabetes mellitus BALB/c mice are more susceptible to granulomatous amoebic encephalitis: Immunohistochemical study. **Experimental parasitology**, Berlin, v. 183, p. 150-159, Dec., 2017.

QI, Z. et al. Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. **Diabetes**, Ann Arbor, v. 54, n. 9, p. 2628-2637, Sept., 2005.

PAVLOU, S. et al. Sustained high glucose exposure sensitizes macrophage responses to cytokine stimuli but reduces their phagocytic activity. **BMC immunology**, Norwich, v. 19, n. 1, p. 24, Jul., 2018.

RADWAN, M. A.; AL JASER, M. H.; AL RAYES, Z. R. The effects of induced diabetes and cutaneous Leishmania infection on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, London, v. 101, n. 2, p. 133-142, Mar., 2007.

RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of b-glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, Washington, v. 2, n. 2, p. 94-103, Apr., 2011.

ROMA, E. H. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in Leishmania amazonensis infection. **Parasites & Vectors**, Czech Republic, v. 7, n. 9, p. 193, Apr., 2016.

RUBTSOV, Y. P. et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. **Immunity**, Maryland Heights, v. 28, n. 4, p. 546-558, Apr., 2008.

SCHARTON-KERSTEN, T. et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 154, n. 10, p. 5320–5330, 1995.

SCORZA, B.; CARVALHO, E.; WILSON, M. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 18, n. 6, p. 1296, Jun., 2017.

SHIVAHARE, R. et al. Immunoprotective effect of lentinan in combination with miltefosine on Leishmania-infected J-774A.1 macrophages. **Parasite Immunology**, Medford, v. 38, n. 10, p. 618-627, Aug., 2016.

SOUZA, W. M. et al. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 191-196, Apr./Jun., 2007.

SOUSA, L. M. A. et al. Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. **Parasite immunology**, Medford, v. 36, n. 1, p. 13-31, Jan., 2014.

SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental Parasitology**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 97-103, Oct., 2001.

- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, Praga, v. 50, n. 6, p. 537-546, Mar., 2001.
- TANOWITZ, H. B. et al. Trypanosoma cruzi infection in diabetic mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 82, n. 1, p. 90-93, Jan., 1988.
- TSENG, C. et al. Decreased production of nitric oxide by LPS-treated J774 macrophages in high-glucose medium. **Life sciences**, Columbus, v. 60, n. 7, p. PL99-PL106, Jan., 1997.
- VETVICKA, V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal of Clinical Oncology**, Washington, v. 10, n. 2, p. 115-119, Feb. 2011.
- VIETH, M. et al. Interleukin - 10 inhibits antimicrobial activity against Leishmania major in murine macrophages. **Scandinavian journal of immunology**, Bergen, v. 40, n. 4, p. 403-409, Oct., 1994.
- WAUTIER, J.; GUILLAUSSEAU, P.. Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. **Vascular Medicine**, Cleveland, v. 3, n. 2, p. 131-137, May., 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. 2018. Disponível em :<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 27/07/2018.
- YANO, H. et al. Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice and thereby improves surgical site Staphylococcus aureus infection. **Infection and immunity**, Davis, v. 80, n. 12, p. 4409-4416, Dec., 2012.
- YATAWARA, L. et al. Aureobasidium-Derived Soluble Branched (1,3-1,6) b-Glucan (Sophy b-glucan) Enhances Natural Killer Activity in Leishmania amazonensis-Infected Mice. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 47, n. 4, p. 345-351, Dec., 2009.
- ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Current protocols in immunology**, Rockville, v. 83, n. 1, p. 14.1. 1-14.1. 14, Nov., 2008.