



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM
SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

IGOR PEREIRA RIBEIRO MUNIZ

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com curcumina
controla infecção intradérmica por *Staphylococcus aureus* resistente
a meticilina em camundongos com Diabetes tipo 1**

Vitória da Conquista, BA
2023

IGOR PEREIRA RIBEIRO MUNIZ

**Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com curcumina
controla infecção intradérmica por *Staphylococcus aureus* resistente
a meticilina em camundongos com Diabetes tipo 1**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia

Orientador: Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA
2023

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

M966

Muniz, Igor Pereira Ribeiro.

Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com curcumina controla infecção intradérmica por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina em camundongos com Diabetes mellitus tipo 1/ Igor Pereira Ribeiro Muniz. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2023. [88] f. ; il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2023.

1. Diabetes *Mellitus* Tipo 1. 2. Microbiologia. 3. Terapêutica. 4. Histopatologia. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Silva, Robson Amaro Augusto da. III. Título.

IGOR PEREIRA RIBEIRO MUNIZ

“Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com curcumina controla infecção intradérmica por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina em camundongos com Diabetes tipo 1”.

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de doutor em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 28 de abril de 2023.

Robson A. Augusto da Silva

Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva (Orientador)
Universidade Federal da Bahia-UFBA

Amélia Cristina M. de Magalhães Gusmão

Prof^a. Dr^a. Amélia Cristina M. de Magalhães Gusmão
(Examinadora Interna PPGMCF)
Universidade Federal da Bahia-UFBA

Telma de Jesus Soares

Prof^a. Dr^a. Telma de Jesus Soares (Examinadora Interna PPGMCF)
Universidade Federal da Bahia-UFBA

Luciano Pereira Rosa

Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa (Examinador Externa)
Universidade Federal da Bahia-UFBA

Denisar Palmito dos Santos

Prof. Dr. Denisar Palmito dos Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal da Bahia-UFBA

AGRADECIMENTOS

Esta tese de doutorado, desenvolvida em cerca de 4 anos de muito esforço, dedicação e persistência, é parte do meu ser e um grande registro de minha história neste mundo. Esta jornada na qual pude desfrutar de um amadurecimento ímpar, além de uma profissionalização magnífica, jamais seria possível sem a confiança e apoio dos meus queridos familiares e das verdadeiras amizades que construí ao longo destes 30 anos de vida.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu bom Deus e a toda espiritualidade. Obrigado Deus! Apenas o senhor sabe de todas grandes e pequenas lutas travadas dentro e fora do campo profissional para que eu pudesse chegar neste momento. Neste momento, em registro, deixo o meu eterno agradecimento ao meu bom Deus!

Gostaria de agradecer ao meu orientador, o professor Robson Amaro Augusto da Silva, por todo apoio incondicional ao longo de toda minha vida acadêmica, desde o período da minha graduação até este momento. É uma grande honra poder chegar até este momento sendo orientado pelo prof. Robson. Não esquecerei dos seus eternos ensinamentos, conselhos e exemplo como pesquisador. Muito obrigado!

Estendo a minha gratidão a todos professores, funcionários e amigos do Instituto Multidisciplinar da Universidade Federal da Bahia, em particular, aos meus amigos Maria Poliana, Israel Souza, Caroline Vieira e Paulo Bispo. Vocês estiveram ao meu lado em todo esse período de doutoramento, nos melhores e piores momentos. Obrigado por cada risada e abraço.

Não posso deixar de agradecer ao apoio do Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por fornecerem as melhores condições e ferramentas possíveis para a minha formação como profissional.

Por fim, agradeço em especial àqueles que, por toda a minha vida, me amaram e apoiaram incondicionalmente, que sempre compraram minhas escolhas de vida junto a mim e são o meu maior porto seguro: a minha amada família. Muito obrigado aos meus pais Valdir e Marli e ao meu irmão Ícaro. Amo muito vocês!

RESUMO

MUNIZ, Igor Pereira Ribeiro. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com curcumina controla infecção intradérmica por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina em camundongos com Diabetes *mellitus* tipo 1. Tese (Doutorado). – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

O Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DMT1) é uma doença crônica não transmissível na qual a insulina é produzida insuficientemente devido a destruição das células β no pâncreas. Mudanças geradas no funcionamento de sistemas, como o sistema imunológico, por esta condição aumenta o risco de infecções por estes indivíduos. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) é um dos principais patógenos causadores de infecções neste grupo. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da aplicação da terapia fotodinâmica (PDT), utilizando a curcumina como fotossensibilizante (FS), no tratamento de infecção intradérmica em camundongos com DMT1. Camundongos C57bl/6, foram pesados e, em jejum, tiveram a glicemia mensurada. O DMT1 foi induzido pela injeção intraperitoneal de uma dose única de estreptozotocina (STZ) (180 mg/kg). Cinco dias após a administração da STZ a glicemia dos animais foi mensurada para confirmar o estabelecimento do DMT1. Quinze dias após a indução do DMT1, os animais foram pesados e então infectados por MRSA (ATCC 43300) pela via intradérmica na orelha esquerda. Para a infecção, foi quantificada a concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC da cepa MRSA ATCC 4330. Vinte e quatro horas após a infecção, os animais foram separados em 3 grupos. Uma solução contendo 100 μ g de curcumina foi fotoativada *ex vivo* com o emprego de luz de LED (450 nm) obtendo uma fluência de 13.5 J/cm². Após a fotoativação, a solução foi inoculada no sítio onde foi realizada a infecção nos animais, consistindo no grupo experimental. Os tratamentos controles consistiram na aplicação da curcumina não-fotoativado ou salina estéril. A eutanásia dos animais foi realizada 24 h após os tratamentos e a orelha esquerda e o linfonodo retromaxilar esquerdo foram cirurgicamente coletados. O linfonodo foi macerado em salina para análise da carga bacteriana, dosagem de citocinas por ELISA, dosagem de nitritos e nitratos e contagem de células. A orelha foi utilizada para a confecção de lâminas que foram coradas por H&E ou marcadas com anticorpos anti-mieloperoxidase (MPO) por imuno-histoquímica. As lâminas foram fotomicrografadas e contagens de células e análises de expressão de MPO no tecido foram realizadas. O grupo PDT apresentou menor carga bacteriana no linfonodo quando comparado aos controles (p-valor <0,05). Além da menor carga bacteriana, o grupo PDT também apresentou altos teores de nitratos e nitritos no linfonodo quando comparado aos controles (p-valor < 0,001). O recrutamento celular para a orelha apresentou-se similar entre o grupo PDT comparado aos controles, entretanto, a expressão da MPO no grupo PDT foi menos intensa comparada ao grupo salina (p-valor < 0,001). Quando analisada a produção de citocinas, o grupo PDT apresentou menores concentrações de IL-1, IL-12 e IL-10 (p-valor <0,01; p-valor <0,05; p-valor < 0,05, respectivamente), quando comparado ao grupo salina. Este estudo mostra, pela primeira vez, o potencial terapêutico da PDT usando curcumina no tratamento de uma infecção intradérmica causada por *S. aureus* em camundongos com DMT1.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Biofotônica; Microbiologia; Imunologia; Histopatologia.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is a chronic non-communicable disease in which insulin is insufficiently produced due to the destruction of β cells in the pancreas. The changes generated by this condition increase the risk of infections for these individuals. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the main pathogens causing infections in individuals with diabetes. In this work, we aimed to investigate the effects of the application of photodynamic therapy (PDT), using curcumin as a photosensitizer (PS), in the treatment of intradermal infection in mice with T1DM. C57bl/6 mice were weighed and, in a fasting state, their blood glucose was measured. DMT1 was induced by intraperitoneal injection of a single dose of streptozotocin (STZ) (180 mg/kg). Five days after STZ administration, the animals' blood glucose was measured to confirm the establishment of DMT1. Fifteen days after DMT1 induction, the animals were weighed and then infected intradermally in the left ear. For infection, the concentration of 1.5×10^7 CFU of the MRSA ATCC 4330 strain was quantified. Twenty-four hours after infection, the animals were separated in three groups. A solution containing 100 μg of curcumin was photoactivated ex vivo using LED light (450 nm) obtaining a fluence of 13.5 J/cm^2 which consists in experimental group. After photoactivation, the solution was inoculated at the infection site. Control treatments consisted of the application of non-photoactivated curcumin or sterile saline. The animals were euthanized 24 h after the treatments and the left ear and left retromaxillary lymph node were surgically collected. The lymph node was macerated in saline for analysis of bacterial load, measurement of cytokines by ELISA, measurement of nitrites and nitrates, and cell counts. The ear was used to make slides that were stained by H&E or stained with anti-myeloperoxidase (MPO) antibodies by immunohistochemistry. Slides were photomicrographed and cell counts and tissue MPO expression analyzes were performed. The PDT group had a lower bacterial load in the lymph node when compared to controls (p-value <0.05). In addition to the lower bacterial load, the PDT group also had higher levels of nitrates and nitrites in the lymph node when compared to controls (p-value < 0.001). Cell recruitment to the infectious site on ear was similar between the PDT group compared with the control groups, however, the expression of MPO in the PDT group was less intense compared to the saline group (p-value < 0.001). When analyzing the production of cytokines, the PDT group showed lower production of IL-1, IL-12, and IL-10 (p-value <0.01; p-value <0.05; p-value < 0.05, respectively), when compared to the saline group. This study shows, for the first time, the therapeutic potential of PDT using curcumin in the treatment of an intradermal infection caused by *S. aureus* in mice with T1DM.

Keywords: Diabetes mellitus; Biophotonic; Microbiology; Immunology; Histopathology.

Lista de abreviações

- aPDT- *Antimicrobial photodynamic therapy*
- APC- *Antigen Presenting Cell*
- AGE - *Advanced glycation end products*
- BHI- *Brain Heart Infusion*
- CD-8 – *Cluster of differentiation 8*
- CD-36 – *Cluster of differentiation 36*
- CNA – Proteína de ligação à colágeno
- CTLA-4 - *Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4*
- DMT1- *Diabetes mellitus do Tipo 1*
- ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent assay*
- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
- FnBPA – Proteína A ligadora de fibronectina
- FnBPB – Proteína B ligadora de fibronectina
- FS – Fotossensibilizante
- GAA - Descarboxilase do Ácido Glutâmico
- GLUT - Transportadores de Glicose
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HClO - Ácido Hipocloroso
- HE – Hematoxilina & Eosina
- HLA- *Human Leucocyte Antigen*
- IA-2 – Proteína Associada ao Insulinoma 2
- IAA – Autoanticorpos Anti-insulina
- IL-1 - Interleucina 1
- IL-6 - Interleucina 6
- IL-8 - Interleucina 8
- IL-10 - Interleucina 10
- IL-12- Interleucina 12
- IL-17 - Interleucina 17
- IR - Receptor de Insulina

LED - *Light Emitting Diode*

LTB4 -Leucotrieno B4

MEC- Matriz extracelular

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

MPO -Mieloperoxidase

MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

mTOR- *Mammalian Target of Rapamycin*

mTORC1- *Mammalian Target of Rapamycin Complex I*

NE- Elastase neutrofílica

NETs - (*Neutrophil Extracellular Traps*)

NO - Oxido nítrico

NOX2 – NADPH Oxidase

PAMP – *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PBP- Proteínas de ligação a penicilina

PDT - *Photodynamic therapy*

PKC – Proteína Quinase C

PMN- Células Polimorfonucleares

PVL- *Panton-Valentine Leukocidin*

NLRP3- *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*

STZ - Estreptozotocina

TCR - *T-Cell Receptor*

TLR- *Toll-like receptor*

TNF- α - Fator de Necrose tumoral α

TMB - Tetrametilbenzidina

UFCs - Unidades formadoras de colônias

VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 O diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	3
2.2 Patogênese do DMT1	4
2.3 Distúrbios no sistema imunológico causados pelo DMT1	7
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> é um importante patógeno	10
2.5 O neutrófilo é uma célula com função central no controle de infecções bacterianas	12
2.6 Modelo animal de infecção intradérmica	13
2.7 Modelo de indução de DMT1 por Estreptozotocina	15
2.8 A terapia fotodinâmica como ferramenta alternativa no controle de infecções	17
3 JUSTIFICATIVA	19
4 OBJETIVO GERAL	21
4.1 Objetivos específicos	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 Cultivo bacteriano	21
5.2 Animais e indução do DMT1 através da aplicação de estreptozotocina	22
5.3 Desenho experimental	23
5.4 Histopatologia	24
5.5 Imunohistoquímica para marcação da Mieloperoxidase (MPO)	25
5.6 Obtenção do linfonodo drenante	26
5.7 Contagem de células totais do linfonodo	26
5.8 Dosagem de citocinas utilizando a técnica de ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>)	27

5.9	Quantificação de nitratos e nitritos	27
5.10	Análise estatística	28
6	RESULTADOS	29
6.1	Uma única dose de STZ foi capaz de desenvolver o DMT1 em camundongos C57bl/6	29
6.2	A PDT com curcumina aumenta o estresse oxidativo durante a resposta inflamatória em camundongos com DMT1 infectados com <i>S. aureus</i>	29
6.3	A PDT com a curcumina não altera o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório em camundongos diabéticos infectados com <i>S. aureus</i>	30
6.4	A PDT com a curcumina não promove o crescimento da expressão da mieloperoxidase no sítio de infecção em camundongos diabéticos infectados com <i>S. aureus</i>	32
6.5	O grupo tratado com PDT utilizando curcumina teve a concentração das citocinas IL-1, IL-12 e IL-10 diminuída no linfonodo drenante	33
7	DISCUSSÃO	34
8	CONCLUSÃO	45
9	REFERÊNCIAS	46
10	MANUSCRITO PUBLICADO DIRETAMENTE RELACIONADO COM A TESE	63
11	MANUSCRITOS PUBLICADOS DURANTE DOUTORAMENTO NÃO RELACIONADOS DIRETAMENTE COM A TESE	72

1 Introdução

O diabetes *mellitus* do tipo 1 é uma doença que na grande parte dos casos é causada devido a uma reação autoimune contra as células β , que produzem a insulina no pâncreas. Esta doença afeta cerca de 20-40 milhões de pessoas em todo mundo, estando associada a um grande índice de mortes (CSOBONYEIOVA; POLAK; DANISOVIC, 2018). Progressivamente, os indivíduos com essa doença se tornam incapazes de produzir insulina de modo autossuficiente, o que acaba por causar deficiência na principal via de captação de glicose pelas células do organismo (ADI; GERARD-GONZALEZ, 2018; PETTUS et al., 2018; TEKULA et al., 2018).

A ausência desse sistema acaba por causar o acúmulo de glicose no sangue, gerando um quadro de hiperglicemia associado à perda de peso, poliúria, polidipsia, e polifagia (TEKULA et al., 2018). A longo prazo, se negligenciada, o quadro de doenças associadas ao DMT1 pode aumentar devido aos danos microvasculares e macrovasculares. Deste modo, quadros como retinopatia, nefropatias, neuropatias, demência, doenças cardiovasculares começam a se desenvolver, além de maior susceptibilidade a infecções (PATTERSON et al., 2014; DADRAS et al., 2018; GOMES et al., 2018; LACY et al., 2018).

O aumento da susceptibilidade a infecções está associado a alteração da dinâmica da resposta inflamatória causada pelo diabetes. Os danos vasculares causados pela hiperglicemia crônica alteram diretamente mecanismos como a vasodilatação e o fluxo sanguíneo, dificultando processos de recrutamento celular (JAFAR; EDRISS; NUGENT, 2016). Além disso, outros processos, a nível celular, como por exemplo, fagocitose, ativação e apresentação de antígenos se apresentam menos eficazes (DOOLEY; CHAISSON, 2010; DE SOUZA FERREIRA et al., 2012; GIRI et al., 2018).

A desregulação deste sistema de defesa causada pelo diabetes acaba por estabelecer padrões pró-inflamatórios intensos, através do aumento exacerbado da produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas. Apesar da resposta pró-inflamatória ser importante para a reação do organismo no controle de uma infecção, respostas inflamatórias exacerbadas podem estar mais relacionadas a respostas ineficazes que por si só acabam diminuindo a eficiência da resposta imune contra patógenos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus* (BRANDT et al., 2018).

S. aureus é uma bactéria gram-positiva que coloniza cerca de 20-30% da população, sendo responsável por causar de 80-90% de infecções na pele e em tecidos moles no mundo (MANANDHAR et al., 2018; SOHAIL et al., 2018; AL KINDI et al., 2019). Indivíduos com

fragilidades no sistema imunológico, como por exemplo, indivíduos com diabetes *mellitus*, se encontram em um grupo de risco, se apresentando susceptíveis a infecções causadas por este patógeno (BRANDT et al., 2018).

Responsável pela morte de milhões de pessoas anualmente, *S. aureus* se apresenta como um patógeno de difícil tratamento farmacológico, pois, o mesmo apresenta diversas cepas com resistência a antimicrobianos. Os isolados que apresentam resistência à meticilina são denominados de MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Estes isolados apresentam ampla distribuição no mundo sendo responsáveis por altos índices de infecções (SHIN; JUNG; PARK, 2017; WU et al., 2018; YAMASAKI et al., 2018).

Neste cenário, onde existe a grande dificuldade no tratamento farmacológico de infecções por bactérias resistentes a antimicrobianos, é evidente a necessidade do desenvolvimento de estratégias alternativas. Nos últimos anos, a Terapia Fotodinâmica (*Photodynamic Therapy – PDT*), uma técnica que utiliza como base a aplicação de luz associada a compostos químicos, chamados de fotossensibilizantes (FS), para a geração de radicais livres, tem se apresentado como possível tratamento para estas infecções.

A curcumina é um FS amplamente utilizado nas mais diversas aplicações da PDT. A curcumina é derivada da *Curcuma longa*, também conhecida popularmente como Açafrão-da-Terra. Este composto tem se mostrado valioso para o ambiente clínico já que por si só apresenta atividades anti-tumoral, anti-viral e anti-séptica (ALI; BANERJEA, 2016; SÖKMEN; AKRAM KHAN, 2016; TSAI et al., 2018). Apesar da realização de muitos estudos recentes na área da biofotônica, ainda existem grandes lacunas a serem preenchidas quanto a aplicação antimicrobiano em diferentes modelos de estudo, como o modelo *in vivo*, por exemplo.

Além dos desfechos no controle da carga de patógenos, a academia se encontra carente de informações sobre a interação da PDT com processos fisiológicos dos organismos, tais como a resposta inflamatória em diferentes condições, como o diabetes. Neste sentido, este trabalho visou avaliar a eficiência da PDT utilizando a curcumina no controle da carga bacteriana de uma infecção intradérmica na orelha de camundongos C57bl/6 com DMT1 causada pela cepa MRSA 43300, como também, características da resposta inflamatória geradas após o tratamento com a PDT.

2 Revisão da literatura

2.1 O diabetes *mellitus* do tipo 1

O diabetes *mellitus* é considerado como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos. Este grupo distúrbios metabólicos atualmente atinge cerca de 415 milhões de pessoas no mundo todo, existindo uma estimativa de que no ano de 2040, este número aumente para cerca de 642 milhões de pessoas (UNNIKRISHNAN; ANJANA; MOHAN, 2016; HARDING et al., 2019).

O termo “diabetes *mellitus*” é uma nomenclatura generalista utilizada para designar distúrbios metabólicos que possuem como consequências o surgimento de quadros de hiperglicemia. Esta hiperglicemia pode ser gerada por falhas em diferentes mecanismos fisiológicos, seja na produção insuficiente da insulina, caracterizando um tipo de diabetes chamado de tipo 1, como também pela ação ineficaz deste hormônio, caracterizando um tipo de diabetes chamado de tipo 2 (KERNER; BRÜCKEL, 2014; KHARROUBI, 2015).

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DMT1) é um distúrbio metabólico caracterizado pela perda da capacidade de produção suficiente do hormônio insulina. Este evento ocorre pela destruição crônica das células β nas ilhotas pancreáticas. Estas células são as responsáveis pela produção de insulina. A destruição destas células ocorre através de reações autoimunes, onde o próprio organismo não reconhece esta célula e seus antígenos como próprios, assim, gerando a destruição das mesmas ao longo do tempo (KATSAROU et al., 2017).

. O DMT1 é uma doença crônica, podendo ser causada por uma reação autoimune, com alta incidência no mundo todo, sendo responsável por altos índices de mortalidade e morbidade (DE GROOT et al., 2021; LU; ZHAO, 2020). O DMT1 afeta cerca de 20-40 milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável por 5 % das causas de morte anualmente (CSOBONYEIOVA; POLAK; DANISOVIC, 2018).

O índice de pessoas com DMT1 está crescendo em cerca de 3% ao ano no mundo, onde estudos indicam que até 2030, cerca de 55 milhões de pessoas apresentarão o quadro de DMT1 (ANDRADE et al., 2017; LU; ZHAO, 2020). Na América do sul, o Brasil possui a maior incidência dos casos de DMT1. Cerca de 4,4% da população brasileira possui Diabetes, sendo que, 4 % desse total, possui DMT1, apresentando a incidência de 6 novos casos a cada 100.000 indivíduos (PATTERSON et al., 2014; DUNCAN et al., 2020).

O DMT1 pode ser causado inicialmente por um infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas,

principalmente por células T, ocasionando a destruição das células β a partir de uma reação autoimune. A destruição progressiva das células β tem como consequência o encerramento ou produção insuficiente do hormônio insulina, tornando o indivíduo dependente da administração de insulina exógena (ADI; GERARD-GONZALEZ, 2018; PETTUS et al., 2018; TEKULA et al., 2018).

Apesar da classificação tradicional do DMT1 como uma doença juvenil, esta pode ser desenvolvida em qualquer idade, onde, cerca de 50 % dos casos são desenvolvidos na fase adulta (DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2019). Principalmente na infância, a perda da capacidade de produção suficiente de insulina gera sintomas como: hiperglicemia, poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso (TEKULA et al., 2018).

Além dos sintomas citados anteriormente, a longo prazo, o DMT1 se não tratado de maneira adequada pode gerar danos microvasculares e macrovasculares causando quadros como retinopatia, nefropatias, neuropatia, demência, doenças cardiovasculares, além de facilitar a ocorrência dos quadros de pé diabético (PATTERSON et al., 2014; DADRAS et al., 2018; GOMES et al., 2018; LACY et al., 2018).

2.2 Patogênese do DMT1

Apesar de muitos estudos, a etiologia e os mecanismos patológicos envolvidos com o DMT1 ainda não são plenamente compreendidos (ZIPRIS, 2021). No entanto, é sabido que o ambiente no qual o indivíduo vive e, principalmente, o fator genético, possuem papéis decisivos em sua patogênese (PATTERSON et al., 2014). Evidenciando o fator genético, existem alguns genes que estão associados ao desenvolvimento da resposta autoimune que gera a destruição das células β , assim, desencadeando o início do quadro de DMT1.

O maior conjunto de genes envolvidos com o desenvolvimento dessa doença está relacionado ao desenvolvimento do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC), em humanos, chamado de HLA (Human Leucocyte Antigen). Esse conjunto de genes está relacionado com a predisposição de 40-50% de desenvolvimento dos casos de DMT1. Outros genes consideravelmente importantes para a predisposição do DMT1 são: O gene codificador da Insulina e o gene do CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4), presentes em linfócitos T citotóxicos, que estão envolvidos na

predisposição de cerca de 15% dos casos (ABU EL-ELLA et al., 2018; CSOBONYEIOVA; POLAK; DANISOVIC, 2018; PASCHOU et al., 2018).

Estes conjuntos de genes estão relacionados com o desenvolvimento do DMT1 por motivos específicos. O MHC, ou HLA em humanos, é um conjunto de moléculas expressas na superfície de células imunes e outras células com o objetivo de expor antígenos para apresentação para células como linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, por exemplo (NAITO; OKADA, 2022). Existem dois tipos de MHC a serem expressos, o MHC de classe I e o MHC de classe II.

O MHC de classe I é expresso pela maioria das células, que fazem o uso deste aparato para apresentar antígenos de proteínas intracelulares degradadas via proteossoma e apresentam seu auto relatório para células como os linfócitos T CD8⁺. O MHC de classe II é expresso por células apresentadoras de antígenos, também chamadas de APCs (*Antigen-Presenting Cells*), que irão fazer a apresentação dos antígenos fagocitados e degradados por proteases, para células como Linfócitos T CD4⁺ (PASCHOU et al., 2018; REYNISSON et al., 2021).

Estudos mostram que o MHC de classe I está diretamente envolvido com o desenvolvimento do DMT1 através do seu uso por linfócitos T CD8⁺ no processo de morte celular via granzimas e perforinas (BURRACK; MARTINOV; FIFE, 2017). Também é observado que o MHC de classe II está envolvido com o desenvolvimento de doenças autoimunes como o DMT1. Modificações nas sequências alélicas responsáveis pela expressão desta molécula podem aumentar a afinidade ou diminuir a afinidade de ligação de antígenos próprios, de modo que o processo de auto tolerância se vê prejudicado, assim, aumentando o risco do desenvolvimento de doenças autoimunes (PASCHOU et al., 2018).

Polimorfismos relacionados ao gene da insulina também podem estar relacionados ao desenvolvimento do DMT1. A insulina é inicialmente produzida em uma forma inativa, chamada de pró-insulina, que após ativação enzimática se transforma em uma molécula bioativa. Entretanto, na expressão dessa molécula, a região promotora do gene que codifica a pró-insulina apresenta uma sequência de repetição em tandem de número variável, também chamadas de VNTR's (*Variable number of tandem repeats*)(ZHANG et al., 2015).

Existem dois padrões mais comuns dessas sequências de VNTR's: As de cadeia pequena, chamadas de Tipo 1 (26 – 63 repetições) e as de cadeia grande, chamadas de Tipo 3 (140 – 243 repetições), esta última estando relacionada com um processo de mais eficiência da transcrição e expressão do gene. Essa região em si não modifica a estrutura da proteína que será codificada,

entretanto, modificações nessas regiões estão relacionadas com a realização de procedimentos como transcrição e expressão. As repetições de cadeia grande, ou do tipo 3, estão relacionadas com uma transcrição e expressão mais eficiente dessa proteína nas células epiteliais do Timo, órgão extremamente importante no processo de tolerância imunológica central dos organismos, assim, sendo um padrão menos relacionado ao desenvolvimento de DMT1 (BARRATT et al., 2004; DESAI et al., 2006; PASCHOU et al., 2018).

O processo de tolerância imunológica central ocorre no timo, onde as células epiteliais do timo e os timócitos apresentam autoantígenos para os linfócitos T em formação no órgão para avaliar a capacidade deles em responderem à exposição de autoantígenos. Quando os linfócitos reconhecem os próprios antígenos, os mesmos são induzidos a processos de morte celular. Entretanto, algumas falhas nessa fiscalização celular, que podem ocorrer devido a eventos como infecções virais, causadas pelo vírus Coxsackievirus B4, alteram o funcionamento das células do timo, permitindo a seleção de células que reconhecem autoantígenos relacionados às células β , assim facilitando o desenvolvimento do DMT1 (JAÏDANE et al., 2012a, 2012b).

Outra falha em um processo de tolerância presente no organismo que pode estar envolvido com o desenvolvimento de DMT1 é o processo de tolerância imunológica periférica. Este processo pode estar relacionado com o gene responsável pela codificação da molécula CTLA-4. Para que um linfócito T possa ser ativado, é necessário o acontecimento de alguns eventos como a apresentação do antígeno via MHC para o linfócito que irá reconhecê-lo através do seu receptor de célula T (TCR – T-Cells Receptor). Entretanto, apenas esse sinal não é capaz de estimular uma resposta imunogênica. É preciso a presença de um segundo sinal que ocorre através da ação de moléculas co-estimuladoras expressas pelas APC's, como as moléculas CD-80 e CD-86 que ativam os linfócitos através da sua ligação com o receptor CD-28 em Linfócitos T (HOSSEINI et al., 2020; MARIUZZA; AGNIHOTRI; ORBAN, 2020).

A partir do acontecimento destes eventos, o linfócito se encontrará ativado e iniciará processos como a produção da citocina IL-2 para iniciar a expansão clonal, aumentando significativamente o número de clones desse linfócito ativado. Entretanto, o organismo humano possui ferramentas reguladoras dessas células ativadas, como por exemplo a expressão do receptor de CTLA-4 pelos linfócitos ativados. Este receptor se assemelha em sequência ao CD-28, entretanto, além de possuir diferente função, possui cerca de 20 vezes maior afinidade às moléculas CD-80 e CD-86 (HOSSEINI et al., 2020; MARIUZZA; AGNIHOTRI; ORBAN, 2020).

Quando ativado este receptor, o linfócito T se direciona a um estado de anergia, assim, suspendendo a sua atividade, sendo uma via de regulação de tolerância imunológica periférica. Modificações na sequência que codifica o CTLA-4 estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de doenças autoimunes, inclusive o DMT1 (PASCHOU et al., 2018)

A partir do momento em que essas falhas imunológicas se estabelecem, células imunes como os linfócitos, se direcionam até as ilhotas pancreáticas tendo como alvo antígenos relacionados com as células β . São variados os possíveis processos celulares que podem ocorrer durante o ataque às células β , sendo relatados processos de inflamação menos intensos como apoptose até processos como necrose causando recrutamento e ativação de células inflamatórias como macrófagos e células dendríticas (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009; CUNHA et al., 2012; GRIECO et al., 2017).

Acredita-se que a exposição de certos antígenos das células das ilhotas pancreáticas induza a formação de auto anticorpos que ao longo do tempo irão induzir a destruição destas células (KATSAROU et al., 2017). Estudos apontam que anticorpos são gerados contra antígenos das células β , em alguns casos, a partir de seis meses de idade. Dentre os auto anticorpos estudados estão os autoanticorpos anti-insulina (IAA), descarboxilase do ácido glutâmico (GADA), proteína associada ao insulinoma 2 (IA-2) entre outras proteínas (KRISCHER et al., 2016).

Além da predisposição genética ao desenvolvimento de DMT1, o meio ambiente impõe grande influência no desenvolvimento ou não da doença, onde eventos como infecções virais, uso de antibióticos, introdução da primeira alimentação e eventos gestacionais podem induzir o início do desenvolvimento desta condição (VISKARI et al., 2002; KNIP; VIRTANEN; ÅKERBLOM, 2010; ASHTON et al., 2016; DAI et al., 2018; ZHANG et al., 2018). Estima-se que em casos de gêmeos monozigóticos, com genética predisposta para o desenvolvimento de diabetes, em apenas 30% dos casos os dois desenvolveram a doença (REDONDO et al., 2008).

2.3 Distúrbios no sistema imunológico causados pelo DMT1

A partir da ingestão de alimentos, devido a absorção de nutrientes provindos da dieta, o organismo é induzido a produzir e secretar o hormônio insulina, prevenindo desordens metabólicas como hiperglicemia, diabetes e inflamações decorrentes destes processos (KIM; FELDMAN, 2015). A glicose é o principal combustível celular, de modo que esta molécula se apresenta como

fonte de energia para a realização de diversas rotas metabólicas nos diferentes tecidos.

A absorção desta molécula é mediada no organismo através da classe de proteínas GLUT. A maior absorção de glicose ocorre em tecidos como o tecido muscular e o tecido adiposo através do transportador de glicose GLUT-4, que tem a expressão mediada pela ação da insulina ao se ligar ao IR (TATULIAN, 2015; PETERSEN; SHULMAN, 2018; TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018). Após a sinalização via insulina, estes tecidos irão consumir a glicose em excesso transformando-a em outras moléculas de reserva energética como glicogênio, por exemplo.

A hiperglicemia crônica causada pela ausência da insulina, quando estendida por longos períodos sem controle ideal, causa danos celulares irreversíveis gerados pelo quadro de toxicidade causada por glicose. A toxicidade relacionada a alta concentração sérica de glicose está relacionada à formação de produtos de glicação avançada (*Advanced glycation end products*- AGEs) e aumento do estresse oxidativo (CAMPOS, 2012).

Devido a falta do controle glicêmico e a ausência da atividade da insulina, processos celulares quimiotaxia, fagocitose e apoptose são diretamente afetados (CONDORELLI et al., 2018; GIRI et al., 2018; LI et al., 2018; WU et al., 2019). As alterações em processos como quimiotaxia e fagocitose em indivíduos com DMT1 acabam por tornar esses indivíduos mais vulneráveis a processos infecciosos por alterar o funcionamento do sistema imunológico (DE SOUZA FERREIRA et al., 2012; MOREY et al., 2019; RESTREPO et al., 2014).

Em resposta a infecções, indivíduos com DMT1 apresentam menor vasodilatação e menor fluxo sanguíneo, o que dificulta diretamente na migração celular para o sítio inflamatório e o controle de infecções (JAFAR; EDRISS; NUGENT, 2016).

Pensando na resposta imune inata, mesmo com a administração exógena de insulina, os processos de quimiotaxia, fagocitose, ativação e apresentação antigênica de fagócitos, como os neutrófilos, podem ser diminuídas em até dez vezes quando comparado a atividade de um fagócito de um organismo saudável (DOOLEY; CHAISSON, 2010; GIRI et al., 2018).

Os neutrófilos são células fagocíticas diretamente envolvidas no controle de uma grande variedade de patógenos extracelulares. É sabido que em condições de hiperglicemia, o neutrófilo aumenta a expressão da mieloperoxidase (MPO), enzima envolvida diretamente na produção de HClO (Ácido hipocloroso), entretanto, apesar do aumento de sua expressão, a atividade desta enzima é significativamente reduzida e menos eficiente (DE SOUZA FERREIRA et al., 2012).

Além da atividade de MPO, outras ferramentas utilizadas pelo neutrófilo, como a elastase

neutrofílica (NE), que é liberada durante a degranulação do neutrófilo e possui ação antibacteriana, acaba sendo diminuída em meio hiperglicêmico. Desta maneira, este importante tipo celular acaba tendo seu funcionamento alterado durante uma resposta contra uma infecção, por exemplo (ORIANO et al., 2020; STEGENGA et al., 2008).

Condições de hiperglicemia em sinergia com hipóxia, situação que ocorre no quadro de pé diabético por exemplo, acaba por aumentar o perfil de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, e IL-6, por macrófagos, entretanto, estas mesmas células diminuem o potencial de fagocitose pela diminuição da expressão de moléculas como CD-36 e receptores *Scavengers* do tipo I (MOREY et al., 2019).

Além de atuar diretamente na expressão de moléculas envolvidas no processo de fagocitose, como o CD-36, a hiperglicemia acaba por alterar a expressão de receptores de sistema complemento em monócitos, assim diminuindo a eficiência dessas células de defesa (RESTREPO et al., 2014).

O desbalanço dos perfis de respostas imunes adquiridas possui grande influência no desenvolvimento e progressão da doença. Estudos apontam que o desenvolvimento da doença se dá principalmente por diferenças entre as respostas pró-inflamatórias do tipo Th1 e Th17 e a resposta anti-inflamatória/reguladora do tipo Treg (ALNEK et al., 2015; BAHARLOU et al., 2016).

A atividade das células Treg é alterada em indivíduos com DMT1. Em indivíduos saudáveis, células Treg possuem alta produção de IL-10, considerada uma potente citocina anti-inflamatória, entretanto, em indivíduos com a DMT1, ocorre diminuição acentuada da produção desta citocina (ANUPAM et al., 2018).

Em contrapartida, a expressão de citocinas pró-inflamatórias se apresenta aumentada em indivíduos com diabetes, aumentando a atividade de células do perfil Th17 e Th1, com a produção significativamente aumentada de citocinas como a IL-17 e a IL-12, respectivamente. É importante ressaltar que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-17 não estão ligados a uma inflamação mais eficiente, mas sim, sendo ligados a marcadores de progressão da doença (DEAN et al., 2020; FORAY et al., 2021; HUANG; PEI; GRAVES, 2020).

O estabelecimento do diabetes está correlacionado com problemas de circulação, mudanças no perfil de resposta imunológica e aumento do risco de infecção, como infecções na pele, tuberculose e pé diabético. Resumidamente, a hiperglicemia, assim como os efeitos indiretos nas

funções de macrófagos e linfócitos gerados pela diabetes, diminui a capacidade do organismo em conter infecções, como por exemplo, as causadas por patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus* (MALGRANGE, 2008; DOOLEY; CHAISSON, 2010; ALNEK et al., 2015).

2.4 *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva em forma de cocos, amplamente distribuído pela natureza e presente na microbiota humana, principalmente na pele e fossas nasais (MANANDHAR et al., 2018; SOHAIL et al., 2018). Apesar de poder fazer parte da nossa microbiota e normalmente não causar doença, a literatura mostra que *S. aureus* é responsável por causar um grande espectro de doenças como infecções na pele, mastite, pneumonia, osteomielite, pé diabético e choque séptico (JNEID et al., 2018; MANANDHAR et al., 2018; SOHAIL et al., 2018; TUCHSCHERR et al., 2018; WANG et al., 2018).

S. aureus coloniza cerca de 20-30% da população e é responsável por causar cerca de 80-90% de todas as infecções na pele e em tecidos moles no mundo todo (AL KINDI et al., 2019). *S. aureus* é o segundo principal patógeno bacteriano causador de bacteremia associados a comunidade e cuidados de saúde em países desenvolvidos, tendo a incidência de 15-40 casos a cada cem mil pessoas (BONNET et al., 2018).

Como dito anteriormente, *S. aureus* é uma bactéria que comumente não causa doença, mas em situações específicas, esta bactéria lança mão de ferramentas que auxiliam o processo de colonização e infecção como também de evasão do sistema imune. Inicialmente, esta bactéria ao adentrar o organismo irá se aderir às células epiteliais, principalmente nas fossas nasais, através do ácido teicóico. *S. aureus* se caracteriza por ser uma bactéria que necessita de poucos nutrientes para manutenção da vida, de modo que, mesmo na presença de outros microrganismos competidores nesses sítios, consegue crescer satisfatoriamente (BURIAN et al., 2010; WERTHEIM et al., 2008).

De maneira geral, *S. aureus* possui um extenso arsenal de fatores de virulência que permite que esta bactéria consiga se aderir ao hospedeiro, causar danos às células do hospedeiro como também imunomodular o organismo infectado. Este arsenal de fatores de virulência varia entre as cepas, o que reflete diretamente na grande diversidade de doenças que esta espécie bacteriana pode causar (LEE et al., 2018).

Inicialmente em seu processo de infecção, *S. aureus* pode lançar mão de fatores de

virulência como as proteínas ligadoras de fibronectina (FnBPA e FnBPB) e adesinas como a proteína de ligação a colágeno (Cna), que facilitam que ele se ligue tanto tecidos normais como em feridas e então se multipliquem nesses locais. Após o reconhecimento da presença de um patógeno pelo sistema imune, a resposta inflamatória será iniciada, acontecendo o recrutamento de células PMN, principalmente o neutrófilo, para o sitio de infecção. Entretanto, esta espécie bacteriana possui fatores de virulência como coagulases que formam pseudo-cápsulas de fibrina, dificultando o influxo e contato com as células polimorfonucleares (BURIAN et al., 2010; LEE et al., 2018; SCHWARTZ et al., 2021; SPAAN et al., 2013).

Além de coagulases, outro importante fator de virulência expresso por *S. aureus*, que dificulta o controle da bactéria é a expressão de uma capsula rica em polissacarídeos, que impede o reconhecimento realizado por células PMN, opsonização, conseqüentemente se evadindo do sistema complemento (LAARMAN et al., 2010; THAMMAVONGSA et al., 2015).

Indivíduos geriátricos, pessoas com diferentes graus de obesidade, *diabetes mellitus*, doenças cardíacas e/ou pulmonar que possam necessitar de tratamento cirúrgico ou tratamento intensivo, se situam dentro de um grupo de risco com maiores susceptibilidades a infecções por *S. aureus* (MENNE et al., 2012; OCHOA et al., 2005; PROCTOR, 2012; WELLS et al., 2013).

Indivíduos com DMT1 apresentam grande dificuldade na apresentação de um controle eficaz na resposta contra infecções causadas por *S. aureus*. Como medida terapêutica convencional, faz-se o uso de antibióticos para o controle da carga bacteriana. Todavia, é importante ressaltar que, ao longo do tempo, devido ao uso indevido desses agentes terapêuticos, como por exemplo a penicilina e derivados como a meticilina, cepas resistentes à esses fármacos foram selecionadas, como por exemplo a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA- (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)) (LEE et al., 2018).

S. aureus é uma bactéria de extrema importância clínica ao se pensar em infecções desenvolvidas em indivíduos com diabetes. Esta bactéria possui a capacidade de causar grandes impactos no setor público de saúde, sendo um dos principais patógenos causadores de doenças neste grupo de indivíduos, causando quadros como bacteremia, infecções de pele e pé diabético. Desta maneira, é necessário o estudo e desenvolvimento de estratégias para o controle deste patógeno neste contexto (SEO et al., 2021; SHETTIGAR; MURALI, [s.d.]; VANDERSCHULDEN et al., 2019).

2.5 O neutrófilo é uma célula com função central no controle de infecções bacterianas

Frente ao desafio de controlar infecções causadas por patógenos bacterianos, o sistema imune lança mão do recrutamento e ativação do neutrófilo, o principal tipo celular envolvido no controle bacteriano, inclusive em infecções causadas por *S. aureus*.

Inicialmente, ao adentrar o organismo hospedeiro, o patógeno será reconhecido por células do sistema imune. No caso de *S. aureus*, patógeno envolvido no desenvolvimento de infecções na pele, será reconhecido por células residentes neste sítio, como por exemplo macrófagos, células de Langerhans e Linfócitos T $\gamma\delta$, que, ao reconhecerem irão dar início à resposta inflamatória com a produção de citocinas pró-inflamatórias (YASUDA et al., 2016; MARCHITTO et al., 2019).

Com o reconhecimento da invasão causada por um patógeno, citocinas como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-17 serão produzidas com o objetivo de recrutar células de defesa para os locais de infecção. A primeira célula a chegar no local de infecção é o neutrófilo, migrando rapidamente para o sítio de infecção (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; ROSALES, 2018).

O neutrófilo é uma célula que possui grande capacidade de fagocitose de patógenos extracelulares, como por exemplo, *S. aureus*, além de exercer grande atividade oxidativa para causar a morte dos patógenos. Diversos trabalhos mostram a grande importância do neutrófilo como uma ferramenta central no controle de infecções causadas por *S. aureus* (MARCHITTO et al., 2019).

Para exercer suas funções no controle de infecção, o neutrófilo possui diversas ferramentas celulares que são empregadas durante a resposta imune, tais como a NE, a MPO e as NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*). A MPO é uma proteína dimérica contendo uma protoporfirina férrica IX em cada subunidade da proteína. Esta enzima é utilizada como uma das principais ferramentas do neutrófilo em seus mecanismos de estresse oxidativo. Dois dos mais importantes ciclos catalíticos realizados pela MPO são o ciclo de Halogenação, que tem como resultado o ácido hipocloroso (HClO), e o ciclo do peroxinitrito, que resulta na produção de espécies reativas de nitrogênio (ARNHOLD, 2020).

Quando o neutrófilo fagocita, o fagossomo se unirá com lisossomos contendo os grânulos azurófilos. Nesse ambiente, a NADPH oxidase (NOX₂) irá gerar, a partir do oxigênio molecular (O₂), um alto gradiente do ânion superóxido (O₂⁻). Entretanto essa molécula é rapidamente

convertida ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido desmutase. O H_2O_2 , juntamente com íons de Cloro (Cl^-), servirão de substrato para a MPO para a formação do $HClO$, que possui potente ação antimicrobiana (DAVIES, 2021).

Além desta via clássica, a MPO pode utilizar outros compostos como substratos para a produção de outras espécies reativas, como por exemplo, as espécies reativas de nitrogênio. A MPO tem a capacidade de utilizar o nitrito, produto do óxido nítrico (NO), para a produção do dióxido de nitrogênio, outra potente molécula oxidante utilizada como defesa contra microrganismos (BEAVERS; SKAAR, 2016; ARNHOLD, 2020).

Neste contexto de controle da infecção, a produção de citocinas é muito importante, atuando em processos de quimiotaxia e ativação de neutrófilos no local da infecção através da produção de citocinas como IL-17. Citocinas IL-12 e IL-23 são citocinas de grande importância para a passagem da resposta imune inata para a resposta imune adquirida. Ressaltando que, estas últimas citocinas estão envolvidas com o estabelecimento das respostas TH1 e TH17, com produção de mediadores como $IFN-\gamma$ e IL-17 respectivamente (COTTON et al., 2016; YAN; SMYTH; TENG, 2018).

2.6 Modelo animal de infecção intradérmica

O entendimento da resposta imune desenvolvida frente a infecções causadas por patógenos como *S. aureus* é de extrema importância para o desenvolvimento de tratamentos alternativos. No caso de *S. aureus* a pele é um sítio chave para o desenvolvimento de estudos.

O modelo animal tem sido utilizado ao longo dos anos em pesquisas na ciência básica e aplicada. Visando a aplicação de experimentações que envolvam análises do comportamento do sistema de defesa em modelos de infecções ou outros estímulos, o modelo murino, utilizando diversas linhagens da espécie *Mus musculus*, é amplamente utilizado por possuir semelhanças anatômica, imunológicas e fisiológicas com os seres humanos (NISHISAKA et al., 2001; JUNHEE SEOK et al., 2013; PHIFER-RIXEY; NACHMAN, 2015).

A partir da junção do estudo de modelos reprodutivos de infecções causadas por *S. aureus*, utilizando o modelo animal, como por exemplo, o modelo murino, o modelo de infecção intradérmica se apresenta como ótima ferramenta para experimentação (DOS SANTOS et al., 2019b, 2019a, 2020; MUNIZ et al., 2021).

A pele é composta de pelos, estrato córneo, células epiteliais e tecido conectivo (derme).

Além dessas componentes estruturais da pele, múltiplas estruturas como nervos, vasos sanguíneos e células imunes estão amplamente distribuídas pela pele (YASUDA et al., 2016).

Diversos estudos utilizam a derme como sítio para inóculo de antígenos, pois, a quantidade de antígenos necessária para desencadear uma resposta antigênica é baixa. Esta característica se prova devido a grande concentração de células de Langerhans nesta camada tecidual. As células de Langerhans são células dendríticas que possuem grande capacidade efetora atuando como APC's. As células de Langerhans podem atuar elicitando tanto a resposta imune celular como a humoral pela ativação de células T CD4+ e TCD8+, além da ativação de linfócitos B, potencializando a produção de anticorpos (YASUDA et al., 2016; EGUNSOLA et al., 2021; LEBOUX et al., 2021).

Além de participar do desenvolvimento da resposta imune adaptativa, as células APCs que estão presentes na derme possuem a capacidade de, ao reconhecer a presença de um invasor, produzirem citocinas e quimiocinas para o recrutamento de células como os neutrófilos para controle de infecção (ORESKOVIC et al., 2019).

A via de infecção intradérmica oferece a oportunidade de estudar processos fisiopatológicos decorrentes de um processo infeccioso (Figura 1), bem como testar dispositivos terapêuticos e medicamentos em um organismo vivo complexo (MACKOVA et al., 2019).

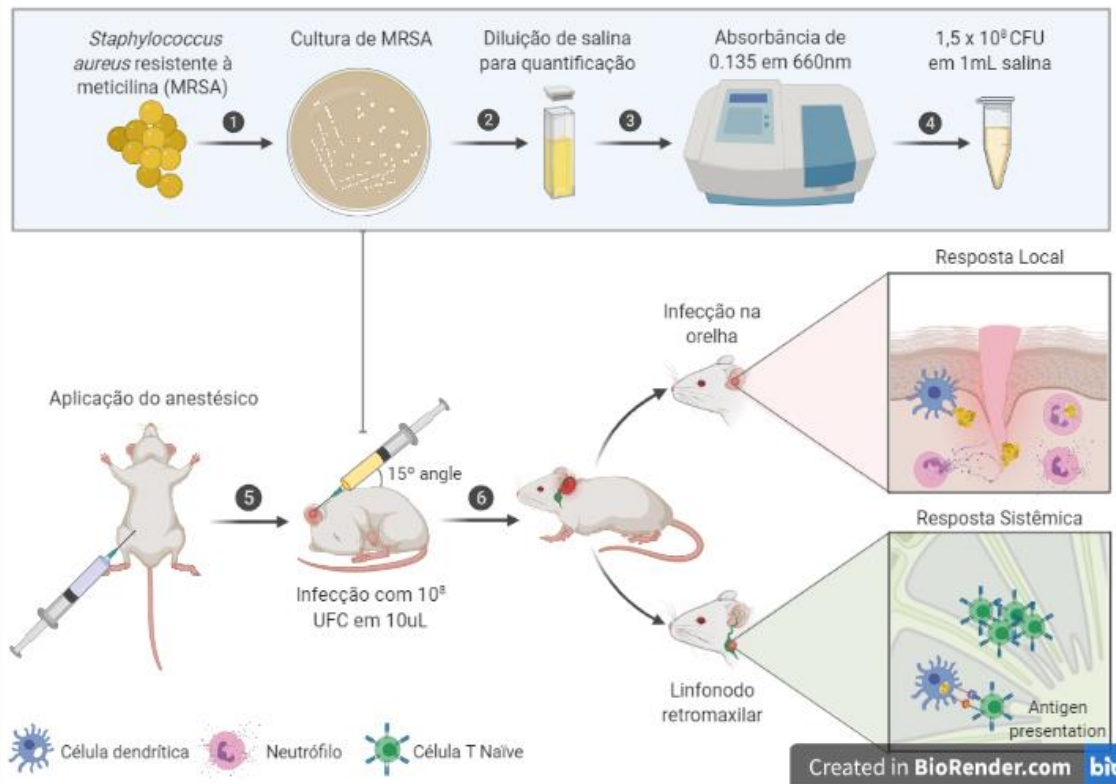


Figura 1. O modelo animal de infecção intradérmica oferece a oportunidade de estudar processos fisiológicos resultantes de um procedimento infeccioso. Neste modelo, a carga bacteriana é determinada por espectrofotometria. Colônias do microrganismo são suspensas em solução salina estéril. Uma absorbância de 0,135 a 660nm (nanômetros) é necessária para atingir a quantidade de 10^8 UFC (unidades formadoras de colônia) de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A infecção intradérmica é realizada nas orelhas dos animais (ALMEIDA *et. al.*, 2017; DOS SANTOS *et. al.*, 2020). Imagem criada por Caroline Vieira Gonçalves no BioRender.

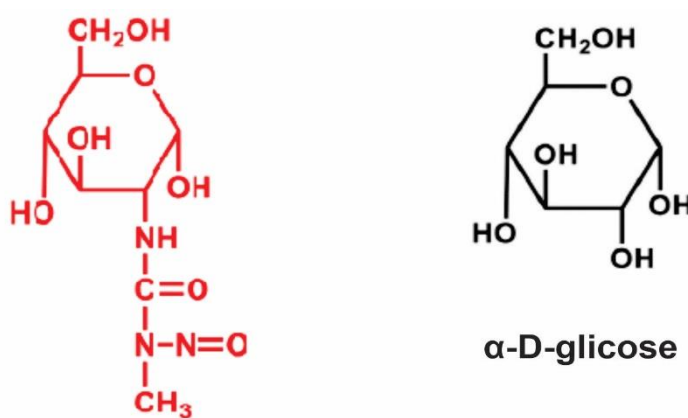
2.7 Modelo de indução de DMT1 por Estreptozotocina

Os modelos de estudo em animais possuem o objetivo principal de tentar simular, o máximo possível, as reações que ocorrem nos seres humanos de acordo o modelo estudado, como por exemplo, em uma infecção. Devido a este motivo, pensando em modelos que possam simular um organismo com *Diabetes mellitus* do tipo 1, existem modelos de estudos em animais, como camundongos não obesos diabéticos (NOD) e camundongos com DMT1 induzida pela utilização de um composto chamado de estreptozotocina (STZ) (AUDET; KILKENNY; ROCHELEAU, 2018; KHURANA; TEKULA; GODUGU, 2018).

A STZ é uma glicosamina-nitrosureia comumente usada para gerar um quadro de DMT1 (SILVA *et al.*, 2011). Inicialmente, a STZ foi identificada como um antibiótico, produzido por

algumas bactérias gram-positivas, como *Streptomyces achromogenes*, na década de 1950. Entretanto, foi observado ao longo do seu uso que esta molécula possuía ação citotóxica, tendo grande afinidade às células β , a ponto de ter sido testada para o tratamento de carcinoma nas ilhotas pancreáticas (ZHU, 2022).

O mecanismo de ação desta molécula consiste em sua entrada nas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas através da proteína transportador GLUT-2. A estrutura da STZ se assemelha muito à estrutura da glicose, sendo assim um competidor pelo sítio de ligação ao GLUT2(SZKUDELSKI, 2001; ZHU, 2022).



Estreptozotocina (STZ)

Figura 3- Estrutura química da estreptozotocina em comparação com a α -D-glicose. A estreptozotocina possui fração química da -glicose, o que se acredita ser a estrutura base da habilidade de estreptozotocina em se ligar ao transportador de glicose GLUT2. Imagem adaptado de Zhu, B. T., 2022.

Os mecanismos de ação da STZ para o desenvolvimento do DMT1 não são totalmente elucidados, entretanto, sabe-se que o uso dessa molécula está envolvido com o recrutamento de linfócitos T para o pâncreas onde estas células irão reagir à presença células β , gerando uma insulite. Os principais mecanismos de ação estudados da STZ são os danos ao material genético das células β através da produção de espécies reativas como o NO e H₂O₂ (KHURANA; TEKULA; GODUGU, 2018).

A STZ atua como um doador de elétrons para o NO gerando um estresse oxidativo, que tem como consequência o aumento da atividade de enzimas como a guanilil ciclase, gerando como produto altas concentrações do cGMP. A alta concentração dessa molécula na célula β será a principal responsável a alquilação do DNA (SZKUDELSKI, 2001).

Após adentrar as células β , a STZ irá promover indiretamente a alquilação do DNA, gerando a sua fragmentação. Em resposta a esta fragmentação, a célula tentará reparar os danos do seu material genético através da ativação da enzima ADP-ribose sintetase. Entretanto, este processo de reparo é intenso, onde a célula acaba por gastar muito recurso celular, assim, levando a depleção de NAD⁺ e ATP. A partir do extenso uso do ATP no meio intracelular, processos de desfosforilação ocorrem continuamente, gerando agora substratos para a enzima Xantina oxidase, que irá gerar como produtos o H₂O₂ e outros radicais hidroxil. Estes processos em conjunto acabam por gerar grande estresse oxidativo e morte celular das células β (NAHDI; JOHN; RAZA, 2017).

Com a morte das células β a partir do uso da STZ, o organismo perderá a capacidade inata de produzir insulina, assim, iniciando o estabelecimento de um quadro DMT1 com os sinais clássicos como hiperglicemia, poliúria, polidipsia e polifagia. Como consequência, sintomas como a perda de peso, aumento do consumo de água e aumento do volume urinário acabam sendo percebidos (HORIKAWA et al., 2020).

2.8 A terapia fotodinâmica como ferramenta alternativa no controle de infecções

Como explanado anteriormente, indivíduos com DMT1 apresentam inúmeras alterações em seus sistemas, como no sistema imune, que acabam por tornar esse grupo mais vulnerável a contrair infecções como também dificultar a resolução das mesmas. Visto isto, é de grande interesse acadêmico e clínico o desenvolvimento de estratégias e ferramentas que possam auxiliar o organismo desses indivíduos no contexto de infecções. Neste contexto, nos últimos anos a Terapia Fotodinâmica (PDT – *Photodynamic Therapy*), uma técnica que utiliza como base a aplicação de luz, tem se mostrado uma possível alternativa para o tratamento de infecções bacterianas.

Os primeiros usos da luz como ferramenta terapêutica se deram há muitos séculos atrás, por povos como egípcios, chineses e indianos, onde, um dos primeiros registros se deu na Grécia, há mais de 3000 anos (DANIELL; HILL, 1991). Entretanto, no início dos anos 1900, Oscar Raab em seu experimento, notou que a luz, emitida por raios, foi capaz de provocar a morte de protozoários do gênero *Paramecium spp.* (DANIELL; HILL, 1991). Essa descoberta de Raab deu origem a uma técnica, nomeada no ano de 1904 por Von Tappeiner, de Terapia fotodinâmica (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2009).

A PDT ou aPDT (*Antimicrobial Photodynamic Therapy*) utiliza irradiação luminosa,

podendo ser provinda de lasers ou de *Light Emmiting Diodes* (LEDs) associada a corantes fotossensibilizantes para promover a morte não tóxica de microrganismos (PRAZMO et al., 2016). Este tratamento usa a combinação de fotossensibilizantes não tóxicos, luzes no espectro visível, que combinadas na presença de oxigênio, gera espécies reativas de oxigênio ou transferência de elétrons do fotossensibilizante para a estrutura celular alvo. Tais eventos acabam gerando a morte celular não tóxica (DAI et al., 2009).

O fotossensibilizante, um dos principais componentes da PDT, possui algumas características que são de extrema importância para o seu uso na técnica. A pureza química, a capacidade de ser absorvida por células alvo, meia vida curta, ser eliminada rapidamente do tecido saudável e também absorver comprimentos de onda com ótima penetração no local alvo para tratamento (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2009), seja ele um tecido tumoral ou uma célula bacteriana.

Um bom exemplo de fotossensibilizante que tem sido amplamente utilizado é a curcumina. A curcumina é um composto fenólico derivado da *Curcuma longa*, mais conhecida como Açafrão-da-Terra. A curcumina possui grande potencial medicinal para aplicação, devido ao fato dela ter atividade anti-inflamatória, anti-séptica, anti-viral e anti-tumoral (ALI; BANERJEA, 2016; SÖKMEN; AKRAM KHAN, 2016; TSAI et al., 2018). Este composto se mostra como um bom fotossensibilizante por absorver luz no espectro visível do azul (ALMEIDA et al., 2017; SANTEZI; REINA; DOVIGO, 2018).

Após a escolha do fotossensibilizante e identificação do melhor espectro de luz para a sua ativação, existem dois possíveis tipos de reações fotoquímicas a serem geradas pela PDT: As reações de tipo I e do tipo II, ilustradas na figura 2. Inicialmente, o fotossensibilizante quando energizado pela luz, em comprimento de onda específico para absorção, irá passar de um estado desenergizado, para um estado singleto energizado. Essa energia irá se dispersar através de um processo de fluorescência, ou, pode continuar a se energizar, pulando de um estado singleto para o tripleto (PRAZMO et al., 2016).

A reação de tipo I ocorre a partir da interação entre o fotossensibilizante em seu estado tripleto com a estrutura alvo, por exemplo, uma membrana celular. Ao decorrer dessa interação, elétrons ou moléculas de hidrogênio são retirados das moléculas para formar radicais livres. Os radicais irão então reagir com o oxigênio para produzir espécies altamente reativas de oxigênio como o ânion superóxido e radicais hidroxila, que são agressivos para a estrutura celular alvo

(PRAZMO et al., 2016).

Quanto a reação do tipo II, a reação ocorre diretamente entre o fotossensibilizante energizado e oxigênio. O fotossensibilizante em seu estado tripleto passará a sua energia para o oxigênio tripleto em seu estado basal, o que irá produzir o oxigênio singleto, que é uma espécie reativa de oxigênio altamente reativa (HUANG et al., 2017).

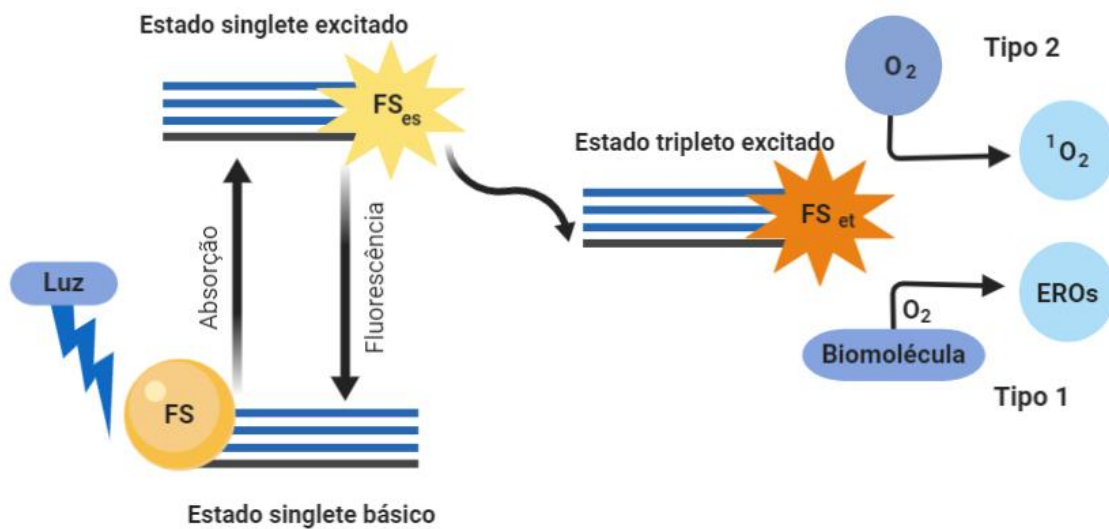


Figura 2. Desenho esquemático dos mecanismos de ação da Terapia Fotodinâmica. O fotossensibilizador (FS), quando submetido à luz, absorve energia e passa do seu estado básico (FS) para o seu estado singlete (FS_{es}). Posteriormente, parte da energia é irradiada sob forma de fluorescência. Assim, o fotossensibilizador passa do seu estado singlete (FS_{es}) para o estado tripleto (FS_{et}). Neste estado o FS pode reagir com biomoléculas e oxigênio, formando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Oxigênio singleto (¹O₂), altamente reativo. Imagem criada por Caroline Vieira Gonçalves no BioRender. Adaptado de CALIXTO *et al.*, 2016.

3 Justificativa

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano associado a uma ampla variedade de quadros clínicos infecciosos. Indivíduos que possuem DMT1 acabam por sofrer

modificações geradas por distúrbio metabólico que acabam por alterar o funcionamento e eficiência de diversos sistemas fisiológicos, tais como o sistema imunológico. Essas modificações no sistema imune estão associadas com respostas menos eficiente no controle de patógenos como *S. aureus* causando, por exemplo, sepse, osteomielite, pé diabético entre outros quadros.

Como ferramenta principal, no que se diz quanto ao tratamento de infecções bacterianas é feito o uso de antibiótico. Entretanto, o uso indevido e descontrolado desta classe de medicamento favoreceu ao longo dos anos o surgimento e espalhamento de diversas cepas bacterianas resistentes à essa classe farmacológica. Tendo em vista este grande problema, que é a resistência microbiana à antibióticos, o interesse em desenvolver medidas terapêuticas no controle alternativo de infecções tem sido crescente. Diversos estudos apontam o potencial da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na redução significativa do número de unidade formadora de colônia (UFC) em modelos *in vitro* como biofilmes e células planctônicas, além de infecções experimentais.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma técnica que faz o uso de um composto químico, chamado de fotossensibilizante, que quando estimulado por uma fonte luminosa adequada, na presença de oxigênio, produz espécies reativas de oxigênio que acabam por controlar a carga bacteriana. É importante ressaltar que, até o momento, não foi descrito na literatura nenhum mecanismo específico de resistência por parte das bactérias aos efeitos da aPDT.

Entretanto, apesar do extenso potencial da técnica, não existem estudos que analisem de maneira aprofundada os efeitos dessa terapia em indivíduos com DMT1 além da ação antibacteriana realizada pela técnica. Muitos fotossensibilizadores têm sido igualmente testados a fim de se padronizar os tempos e concentrações de incubação. Entretanto, as pesquisas experimentais nesta área referem-se em sua maior parte às infecções ósseas e análises *in vitro* relativas à susceptibilidade do *S. aureus* à terapia fotodinâmica.

Diante da maior susceptibilidade e maior dificuldade no tratamento de infecções causadas por cepas resistentes a antibióticos em indivíduos com diabetes, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que estabeleçam protocolos para controle de patógenos em indivíduos com essa condição. Além disso, pouco se sabe sobre a resposta inflamatória associada com o controle bacteriano pela terapia fotodinâmica. Desta forma, novas perspectivas para o tratamento e o entendimento dos mecanismos imunes do controle de infecções bacterianas resistentes a antibióticos podem surgir a contribuir para esse tema de relevância global.

4 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e a resposta inflamatória desenvolvida em um protocolo de Terapia fotodinâmica utilizando a curcumina fotoativada com luz de LED azul (450 nm) *ex vivo* em camundongos com diabetes *mellitus* do tipo 1 induzido por estreptozotocina e infectados intradermicamente com *S. aureus*.

4.1 Objetivos específicos

- Padronização do modelo de indução do DMT1 em camundongos da linhagem C57BL/6 com a utilização da estreptozotocina (STZ);
- Caracterizar a produção de mediadores inflamatórios produzidos por animais com DMT1 e infectados com *S. aureus* após aplicação da PDT utilizando a curcumina fotoativada *ex vivo* com luz de LED azul (450 nm);
- Caracterizar achados anatomopatológicos na orelha dos animais com DMT1 infectados com *S. aureus* após aplicação da PDT utilizando a curcumina fotoativada *ex vivo* com luz de LED azul (450 nm);
- Caracterizar a expressão da enzima Mieloperoxidase (MPO) por células na orelha dos animais com DMT1 infectados com *S. aureus* após aplicação da PDT utilizando a curcumina fotoativada *ex vivo* com luz de LED azul (450 nm);
- Avaliar a hiperplasia do linfonodo drenante da orelha dos animais com DMT1 infectados com *S. aureus* após aplicação da PDT utilizando a curcumina fotoativada *ex vivo* com luz de LED azul (450 nm);
- Avaliar a produção de metabólitos associados ao estresse oxidativo em linfonodos drenantes de camundongos diabéticos infectados e tratados com PDT utilizando a curcumina fotoativada *ex vivo* com luz de LED azul (450 nm).

5 Materiais e métodos

5.1 Cultivo bacteriano

Foi utilizada a cepa de *S. aureus* MRSA ATCC 43300 adquirida na coleção do Instituto de

Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil). Para o cultivo bacteriano, utilizando o fluxo laminar (Prolab, São Paulo, Brasil), a cepa bacteriana foi semeada em meio ágar BHI (Brain Heart Infusion, pH 7,4, HIMEDIA) e então levada para crescimento em estufa BOD (Prolab, São Paulo, Brasil) a 37° C por 24 horas.

Após o cultivo da cultura, a carga bacteriana para preparo do inóculo foi determinada por espectrofotometria. Para a realização deste procedimento, dentro do fluxo laminar, foi preparada uma suspensão contendo de 3 a 5 colônias de *S. aureus* que foram transferidas e concentradas em 1 mL de salina estéril.

Após o preparo da suspensão, 10 µL da solução foi transferida para uma cubeta de quartzo contendo 990 µL de salina. Esta cubeta foi direcionada para o uso no espectrofotômetro (Prolab, São Paulo, Brasil). Como ferramenta de controle para a leitura da absorbância no espectrofotômetro, também foi utilizada uma cubeta contendo 1000 µL de salina como solução branco da leitura.

A etapa de leitura da absorbância, alguns parâmetros foram observados. A leitura foi realizada no espectro de 660 nm e amostra foi diluída com a utilização de solução salina ou concentrada com a adição de mais colônias de bactéria até que a amostra apresentasse a absorbância de 0,135 [0,5 na escala de McFarland, o que é equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadora de colônia (UFC) de *S. aureus*].

5.2 Animais e indução do DMT1 através da aplicação de estreptozotocina

Foram utilizados 15 camundongos machos da linhagens C57BL/6 com idades entre 6 a 8 semanas. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22°C) com acesso livre a água e comida exceto durante o período de indução do DMT1. Todos procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) com protocolo de número 064/2018.

Para indução do DMT1 nos camundongos, foi adotado o modelo de indução de morte das células β utilizando a STZ. Camundongos ficaram 12 horas de jejum e então uma gota de sangue da cauda foi coletada para identificar os animais com glicemia <80 mg/dL com o auxílio de um glicosímetro Accu-Chek Active (Accu-Chek, Santo André, São Paulo). Estes animais foram

inoculados intraperitonealmente, uma única vez, com a solução de STZ (180 mg/kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) diluída em tampão citrato 0,1M (pH 5,0).

Cinco dias após administração da solução de STZ, os animais ficaram novamente em jejum por 12 horas e uma gota de sangue da cauda foi coletada desses animais para mensurar a glicemia dos mesmos com o auxílio de um glicosímetro. Foi considerado que os animais que apresentaram glicemia >380 mg/dL desenvolveram o DMT1 e foram incluídos nos estudos.

5.3 Desenho experimental

Todos animais incluídos no experimento possuíram a confirmação do DMT1. Quinze dias após a indução do DMT1, todos animais foram infectados pelo uso da via intradérmica na orelha esquerda com $1,5 \times 10^7$ UFC da cepa MRSA ATCC 43300. Para a realização da infecção, a cepa MRSA ATCC 43300 foi cultivada durante 24 h a 37°C em meio BHI, assim como no cultivo inicial.

Para a quantificação da quantidade de UFC de *S. aureus*, a leitura foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro configurado no espectro de 660 nm e quando a amostra apresentou a absorbância de 0,135 [0,5 na escala de McFarland, o que é equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadora de colônia (UFC) de *S. aureus*] a solução foi separada. Após a quantificação, foi aplicada a técnica de diluição seriada da solução contendo $1,5 \times 10^8$ UFC para a obtenção de uma quantidade de $1,5 \times 10^7$ UFC de *S. aureus* a cada 10 µL da solução.

Após estabelecimento da concentração $1,5 \times 10^7$ UFC, os 10 µL foram administrados pela via intradérmica na orelha esquerda de todos os animais, que foram previamente anestesiados com uma solução contendo Ketamina (70mg/kg do peso do animal) e Xilazina (5mg/kg do peso do animal). Para o estabelecimento da infecção os animais foram monitorados durante 24 h. Após esse período os tratamentos experimentais foram realizados. Para a realização dos tratamentos os animais foram separados em 3 grupos (n = 5 por grupo).

Como primeiro grupo (Grupo controle salina), foram administrados 10 µL de salina estéril (Vita e Saúde, São Paulo, Brasil) pela via intradérmica no sítio de infecção. Para o segundo grupo (grupo controle curcumina), foram administrados 10µL de uma solução etanólica a 2% contendo 100 µg de curcumina (PDT Pharma, Cravinhos, São Paulo, Brasil). É importante ressaltar que, neste grupo., a curcukmina foi manipulada no escuro e não teve contato com nenhuma fonte de luz além de ter sido filtrada em filtros de 0.22 µm (Kasvii, Campina, Paraná). Para o terceiro grupo

(grupo PDT), a solução de curcumina foi previamente fotoativada com luz de LED azul (450 nm) utilizando o protótipo de número 1.012960 (MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brasil). O protótipo possui como configuração a irradiância de 75 mW/cm². A irradiação de luz para fotoativação da curcumina durou 180 segundos gerando como dose final uma fluência final de 13,5 J/cm². Estes parâmetros foram definidos em experimentos realizados anteriormente em trabalhos do grupo não publicados. Após o processo de fotoativação da curcumina, 10 µL da solução contendo 100 µg de curcumina foi administrado em seguida.

É importante ressaltar que, para a aplicação da luz, o equipamento foi posicionado na distância de 1 cm da superfície da solução contendo a curcumina, que foi alocada dentro de um microtubo de 1,5 mL. Todos as etapas descritas acima foram realizadas em ambiente escuro para evitar possíveis reações com a luz do ambiente. Vinte quatro horas após a aplicação dos tratamentos, os animais foram eutanasiados utilizando uma câmara de gás de CO₂ e as amostras biológicas foram coletadas cirurgicamente.

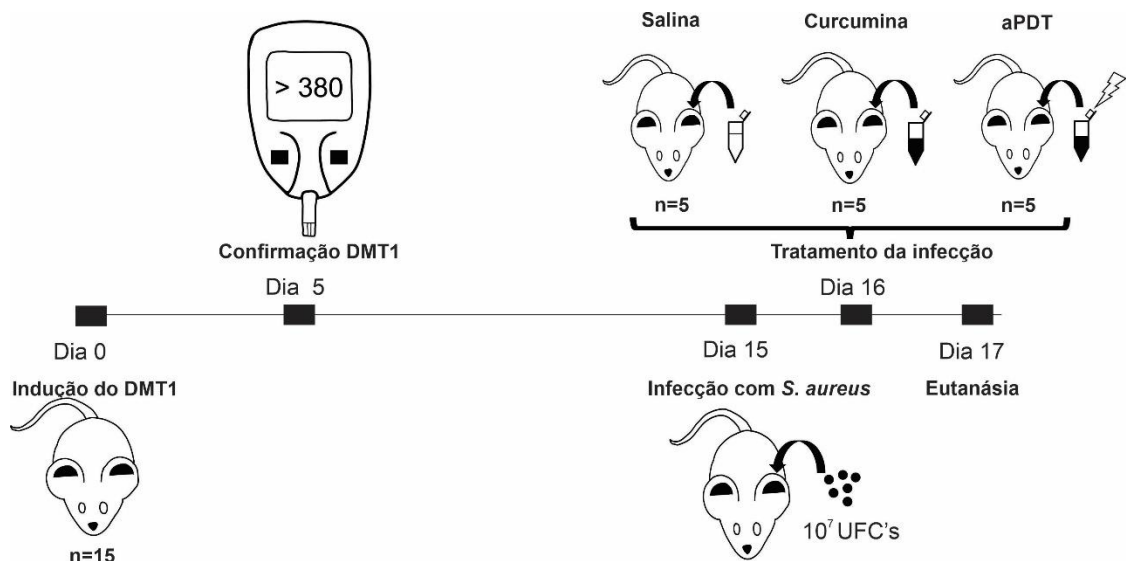


Figura 4- Diagrama ilustrando a linha do tempo do desenho experimental. No dia 0, a estreptozotocina foi administrada nos camundongos infectados C57BL/6 para induzir o DMT1; No dia 5, a glicemia foi mensurada para confirmar o protocolo de indução de DMT1; No dia 15, os animais foram infectados na orelha esquerda com $1,5 \times 10^7$ UFCs de *S. aureus*; Após infecção, no 16º dia, os tratamentos experimentais foram realizados (Salina, Curcumina e aPDT); 24 horas após os tratamentos, no 17º dia, os animais foram eutanasiados.

5.4 Histopatologia

Após a eutanásia, as orelhas esquerdas foram coletadas com o auxílio de material cirúrgico e as áreas de interesse foram seccionadas. As amostras coletadas foram utilizadas para a realização das técnicas histopatológicas e imuno-histoquímica. Os tecidos foram fixados em uma solução de Metacarn (Metanol 60%, Clorofórmio 30% e Ácido acético 10%) por 24 horas. Após as 24 horas, os tecidos foram transferidos para tubos contendo uma solução de álcool 70%. Após fixação, as amostras foram processadas e embebidas em parafina (Casa Alvarez Material Científico S. A., Madrid, Espanha) para confecção dos blocos de tecidos.

Os blocos foram seccionados em cortes de 5µm de espessura. Para a coloração com H&E foi utilizado um protocolo padrão utilizando a Hematoxilina (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e Eosina (EA36, Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil). Para cada lâmina, vinte campos foram fotomicrografados e foram realizadas análises morfométricas como contagem total de células inflamatórias e contagem diferencial de células mononucleares e polimorfonucleares. Para a realização das análises, foi utilizado o software Image J (versão 1.50b, National Institute Health, USA).

5.5 Imunohistoquímica para marcação da Mieloperoxidase (MPO)

As orelhas dos animais previamente fixadas em Metacarn e posteriormente em álcool 70%, foram embebidas em parafina para a confecção dos blocos de parafina. Cortes de 4 µm foram preparados para a aplicação da técnica de imuno-histoquímica visando a marcação da MPO. O anticorpo utilizado para marcar a MPO foi o anticorpo policlonal MPO PA5-16672 (Invitrogen™). Os cortes foram desparafinizados em Xilol e reidratados em álcool utilizando de maneira decrescente (Concentrações de 100%; 95%; 75%) em diferentes soluções de álcool até chegar no último passo de hidratação em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada utilizando o tratamento com tampão citrato. Após a recuperação antigênica a peroxidase tecidual foi bloqueada. Para atingir este objetivo, foi utilizada uma solução contendo peróxido de hidrogênio (0,3%), azida sódica (0,1%) e água destilada por 10 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Após o bloqueio da peroxidase, os cortes foram lavados com PBS-Tween por 5 minutos duas vezes. Após a lavagem, as proteínas do tecido foram bloqueadas utilizando soro de cabra (20%).

Após a adição do soro de cabra, os cortes foram incubados por 30 minutos e então a solução

foi drenada cuidadosamente. Em sequência a este bloqueio, o anticorpo primário (1:200) foi adicionado nos cortes que em seguida foram incubados por 1 hora. Após incubação, os cortes foram lavados em PBS-Tween por 5 minutos duas vezes. Após lavagem, foi adicionado o anticorpo secundário (1:100) e os cortes foram incubados por 45 minutos. Os cortes foram lavados em PBS-Tween por 5 minutos duas vezes. Após a lavagem, o complexo avidina-biotina foi adicionado nos cortes, onde permaneceu por 30 minutos a temperatura ambiente. Os cortes em seguida foram corados usando o Kit cromogênico avançado DAB (eBioscience™).

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina e então cobertos com lamínulas. Para cada lâmina, vinte campos foram fotomicrografados e foram realizadas as análises da expressão da MPO no tecido. Para a realização das análises, foi utilizado o software Image J (versão 1.50b, National Institute Health, USA).

5.6 Obtenção do linfonodo drenante

O linfonodo drenante é responsável pela drenagem do fluxo linfático do sítio de infecção. O linfonodo retromaxilar foi coletado e macerado em 1 mL de salina estéril. Após maceração, 10 µL dessa suspensão foi semeada utilizando a técnica de *spread-plate* em meio ágar BHI que em seguida foi incubado a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram quantificadas com o auxílio de um contador de colônias (CP-600 Plus, Phoenix, EUA).

Além do cultivo bacteriano, as suspensões originadas dos macerados dos linfonodos drenantes foram centrifugadas a 4°C a 8000 RPM. O sobrenadante da solução foi coletado para realizar a mensuração da concentração de citocinas como também para avaliar o estresse oxidativo através da dosagem de nitratos e nitritos. O *pellet* formado foi ressuspensionado em 1 mL de salina estéril e direcionado para a realização de contagem total de células em câmara de Neubauer.

5.7 Contagem de células totais do linfonodo

O volume ressuspensionado após centrifugação do macerado do linfonodo foi utilizado para a contagem de células totais em câmara de Neubauer. Inicialmente, para facilitar a visualização na câmara de Neubauer, as amostras foram diluídas em uma solução de azul de Tukey na proporção 1:10.

Após a diluição, 10 µL da solução foram adicionados à câmara de Neubauer que em seguida

foi transferida para um microscópio de luz para a realização da análise. Os quatro quadrantes foram analisados separadamente. O resultado final para cada amostra se deu a partir da média aritmética simples dos quatro quadrantes.

5.8 Dosagem de citocinas utilizando a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com os anticorpos de captura (100 µL/poço) específicos para cada citocina analisada. As citocinas analisadas foram IL-1 β , IL-12, IL-10 e IL-17 utilizando kits da empresa Invitrogen™ para as respectivas citocinas. As placas foram incubadas overnight a 4°C após sensibilização. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução PBS/Tween para a remoção dos anticorpos que não se ligaram nas placas. Após a lavagem, os poços foram bloqueados com o uso de 200 µL por poço da solução ELISA/ELISASPOT 1 x (ELISA/ELISASPOT Invitrogen™). As placas ficaram em contato com a solução de bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as placas foram lavadas novamente com solução PBS/Tween e 100 µL/poço da solução do macerado do linfonodo foi adicionado. As placas foram incubadas overnight a 4°C. No terceiro dia, as placas foram lavadas com solução PBS/Tween e em seguida foi adicionado 100 µL/poço do anticorpo de detecção. As placas foram incubadas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente com solução PBS/Tween e então 100 µL/poço do conjugado HRP-Avidina foi adicionado nas placas que foram incubadas em temperatura ambiente.

Após adição do conjugado HRP-Avidina, as placas foram lavadas com solução PBS/Tween e então incubadas após a adição de 100 µL da solução de Tetrametilbenzidina (TMB). Após incubação com TMB, foi adicionado 50 µL/poço da solução de parada e então as placas foram levadas para um leitor de placa automático (ThermoPlate, Michigan, EUA) para leitura da intensidade colorimétrica a 450nm. Todos os procedimentos descritos acima foram realizados de acordo as instruções do fabricante e materiais contidos nos kits.

5.9 Quantificação de nitratos e nitritos

Para a quantificação de nitritos e nitratos, a suspensão do macerado do linfonodo foi utilizada como amostra. O protocolo aplicado é baseado em metodologia previamente estabelecida

utilizando o reagente de Griess (GREEN et al., 1982). Inicialmente, foi realizado o preparo das soluções. Primeiramente, foi preparada uma solução N-(1-naftil) Etilenodiamina Dicloridrato 0,1% (0,010 g em 10 mL de água destilada); uma solução de Ácido fosfórico a 5% , onde foi diluído 1,25 mL de ácido fosfórico em 23,75 mL de água destilada.

A solução de ácido fosfórico a 5% (H_3PO_4) foi utilizada para solubilizar o composto Sulfanilamida. Com o objetivo de preparar uma solução de Sulfanilamida a 1%, 0,10 g de Sulfanilamida foi solubilizada utilizando 10 mL da solução de ácido fosfórico a 5%. Para análise da amostra, em placas de 96 poços, foram adicionados 50 μ L do sobrenadante do macerado e 50 μ L da solução de Sulfanilamida a 1% para reagirem durante 10 minutos.

Após a primeira etapa de reação, foi adicionado à solução do segundo reagente composto por N-(1-naftil) Etilenodiamina Dicloridrato (0,1%) durante 10 minutos. Após a reação, as amostras foram transferidas para um leitor de placa automático para leitura da intensidade colorimétrica a 560 nm.

Para análise dos resultados, a absorbância das amostras foi comparada com os resultados de uma curva padrão de nitritos. Para a realização da curva foi preparada uma solução de nitrito a 100 μ M a cada 100 μ L. Esta solução foi diluída em 10 concentrações, utilizando solução salina. As 10 concentrações variaram de 0 μ M de nitritos até 100 μ M de nitritos, aumentando 10 μ M a cada concentração. As absorbâncias emitidas foram utilizadas como parâmetros para construção da curva padrão

5.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism (Versão 8.0, Program Inc., San Diego, California, EUA). Para a verificação da normalidade dos dados foi empregado o teste de Shapiro-Wilk. Testes paramétricos (Teste T-pareado e ANOVA) e não-paramétricos (Wilcoxon e Kruskal-Wallis) foram realizados. O teste de múltiplas comparações de Tukey (dados paramétricos) e o teste de múltiplas comparações de Dunn (dados não-paramétricos) foram utilizados como testes post-hoc. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes de acordo os seguintes p-valores: * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$; **** $<0,0001$ em um intervalo de confiança de 95%.

6 Resultados

6.1 Uma única dose de STZ foi capaz de desenvolver o DMT1 em camundongos C57bl/6

Cinco dias após o protocolo de administração utilizando dose única de STZ (180 mg/kg), parâmetros como peso e glicemia foram mensurados. Como observado na Figura 5, após o tratamento com a STZ, os animais apresentaram maiores concentrações séricas de glicose, além de apresentar redução em seu peso quando comparado a antes do tratamento.

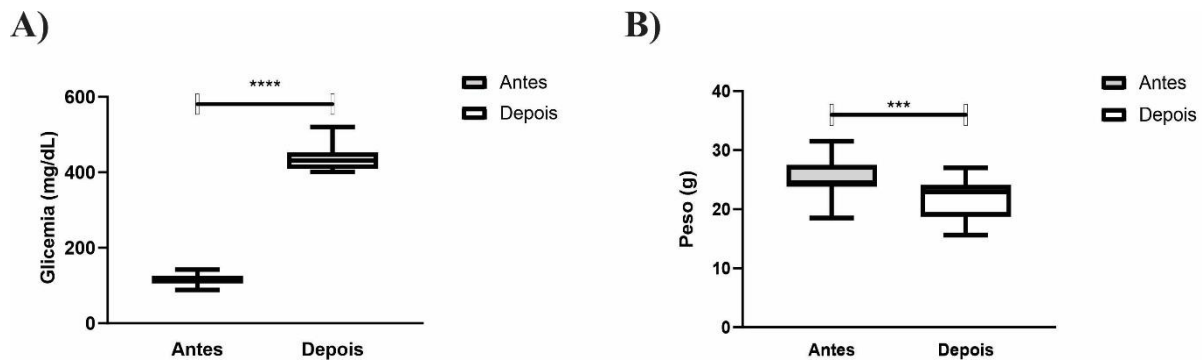


Figura 5. Alterações da glicemia e peso dos animais após aplicação do protocolo de indução de DMT1 em camundongos C57bl/6 com a administração de dose única de STZ (180mg/kg) –A concentração sérica de glicose foi mensurada em dois distintos momentos: antes da indução do DMT1 e cinco dias após a indução (A). O peso dos animais em jejum foi antes da indução do DMT1 e cinco dias após a indução (B). Para realização das análises estatísticas foram utilizados o teste não-paramétrico de Wilcoxon (Figura 5A) e o teste T-pareado (Figura 5B). n= 5 animais por grupo (***) p-valor <0,001; **** p-valor < 0,0001).

6.2 A PDT com curcumina aumenta o estresse oxidativo durante a resposta inflamatória em camundongos com DMT1 infectados com *S. aureus*

Para estimar se a PDT foi efetiva no controle da infecção causada por *S. aureus* em camundongos com DMT1, o linfonodo drenante da orelha esquerda foi coletado. Ao analisar a cultura do linfonodo foi possível observar uma redução significativa da carga bacteriana do grupo tratado com a aPDT quando comparado aos grupos controles tratados com salina ou com a curcumina não-fotoativada (Fig. 6A).

Prosseguindo com as análises do linfonodo, foi observado que o número de células neste órgão não foi diferente quando comparada aos outros tratamentos (Fig. 6B), entretanto, os níveis de produtos finais do estresse oxidativo, como nitratos e nitritos, foram aumentados no grupo em que a PDT foi aplicada (Fig. 6C).

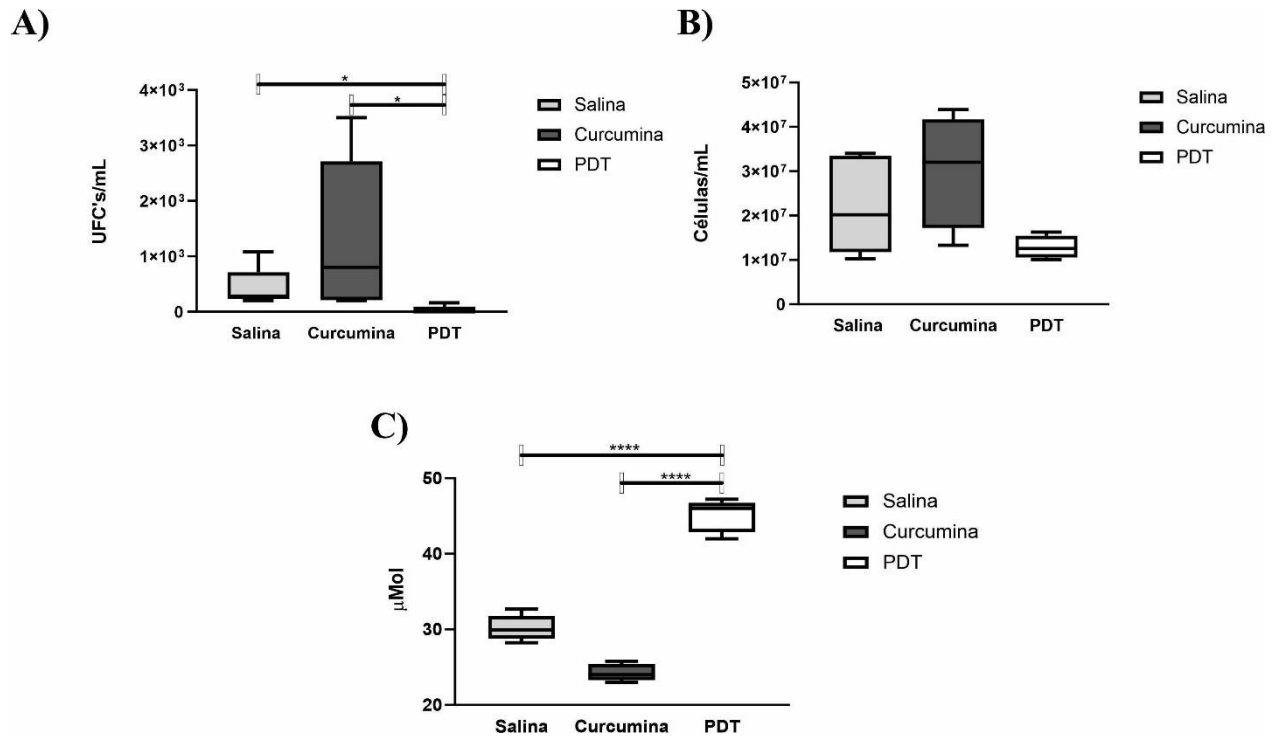


Figura 6. Avaliação dos efeitos da PDT no linfonodo drenante. A suspensão do macerado do linfonodo foi cultivada em ágar BHI por 24 horas e então as colônias (UFC/mL) de *S. aureus* foram contadas (A). Com o auxílio de uma câmara de Neubauer, as células eucarióticas da suspensão (células/mL) do linfonodo foram contadas (B). Para verificar os níveis de estresse oxidativo no linfonodo, os nitratos e nitritos na suspensão foram mensurados (μMol) (C). Para realização das análises estatísticas foram utilizados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn (Figuras 6A e 6B) e teste paramétrico de ANOVA e o pós-teste de Tukey (Figura 6C). $n = 5$ animais por grupo (* p-valor $< 0,05$; **** p-valor $< 0,0001$).

6.3 A PDT com a curcumina não altera o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório em camundongos diabéticos infectados com *S. aureus*

O padrão de recrutamento de células inflamatórias foi observado através de análise histopatológicas na orelha esquerda dos animais, onde as infecções e tratamentos ocorreram (Fig. 7). A quantidade total de células inflamatórias recrutadas para o tecido (Fig. 7A) e contagens

diferenciadas foram realizadas, com as células sendo classificadas em 2 categorias de acordo o formato do núcleo celular: Mononuclear (Fig. 7B) e polimorfonuclear (Fig. 7C).

Com a realização das análises, nenhuma diferença foi observada entre o perfil de recrutamento das células mononucleares e polimorfonucleares no grupo que recebeu PDT quando comparado aos grupos tratados com Salina e Curcumina. Entretanto, foi possível observar que o grupo tratando com apenas a curcumina não fotoativada, apresentou um aumento do recrutamento de polimorfonucleares quando comparado ao grupo tratado apenas com a salina.

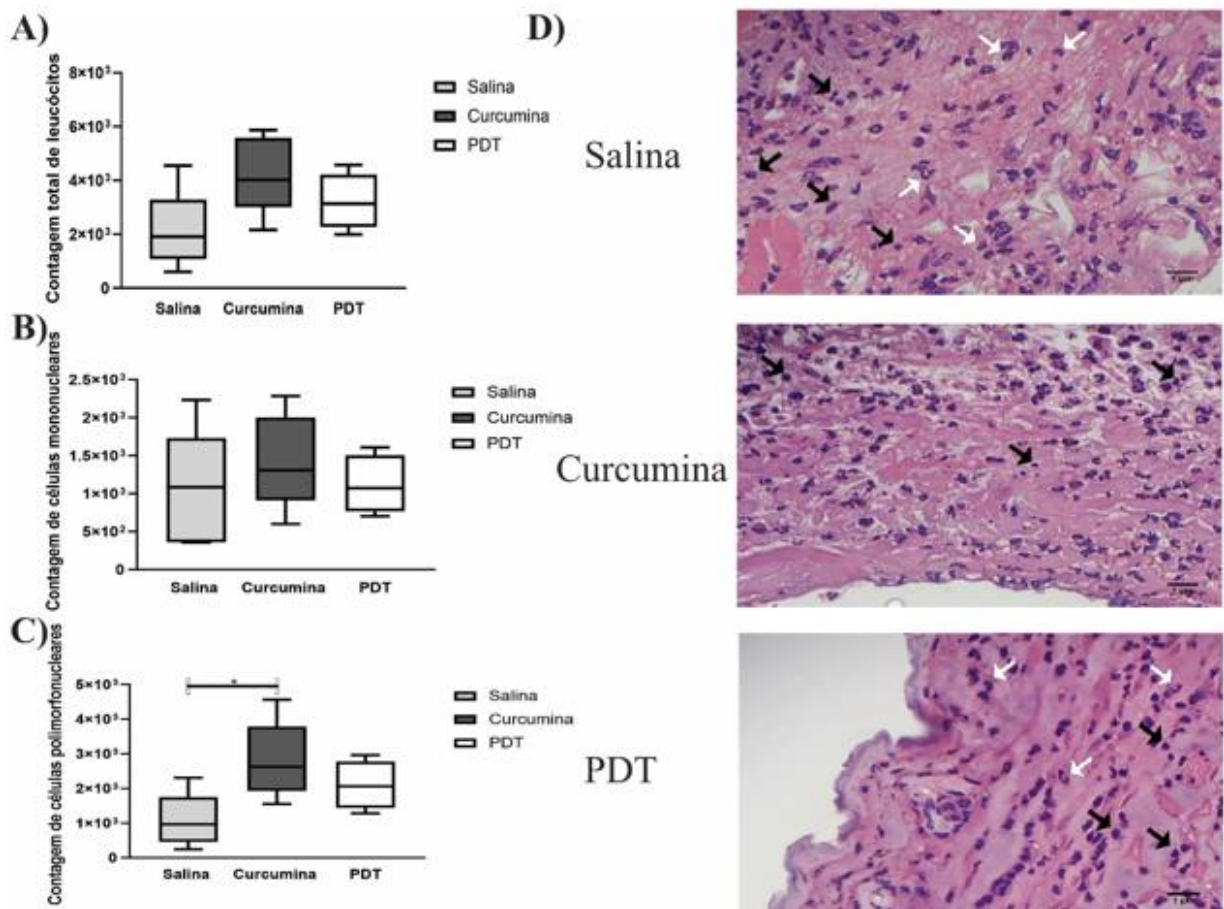


Figura 7. Avaliação do infiltrado inflamatório da orelha após o tratamentos experimentais em cortes coradas por HE.. Todos leucócitos presentes no infiltrado inflamatório foram contados (A). Contagens diferenciais foram realizadas, com células sendo classificadas em 2 classes de acordo a morfologia nuclear: Mononuclear (B) e Polimorfonuclear (C). Fotomicrografias representativas dos grupos estão alocadas de acordo com o tratamento que foi aplicado onde setas pretas indicam células mononucleares e setas brancas indicam células polimorfonucleares (D). Para realização das análises estatísticas foram utilizados o teste paramétrico de ANOVA e o pós-teste de Tukey. $n = 5$ animais por grupo (* p-valor $< 0,05$).

6.4 A PDT com a curcumina não promove o crescimento da expressão da mieloperoxidase no sítio de infecção em camundongos diabeticos infectados com *S. aureus*

Após todos os tratamentos, a expressão da enzima MPO de neutrófilos foi mensurada usando a técnica de imunohistoquímica no sítio inflamatório (Fig. 8). Foi observado que o grupo que foi tratado com a PDT não apresentou aumento na presença da MPO na area de tecido analisado (Fig. 8A) e também não apresentou aumento no numero de células que expressaram esta enzima (Fig. 8B).

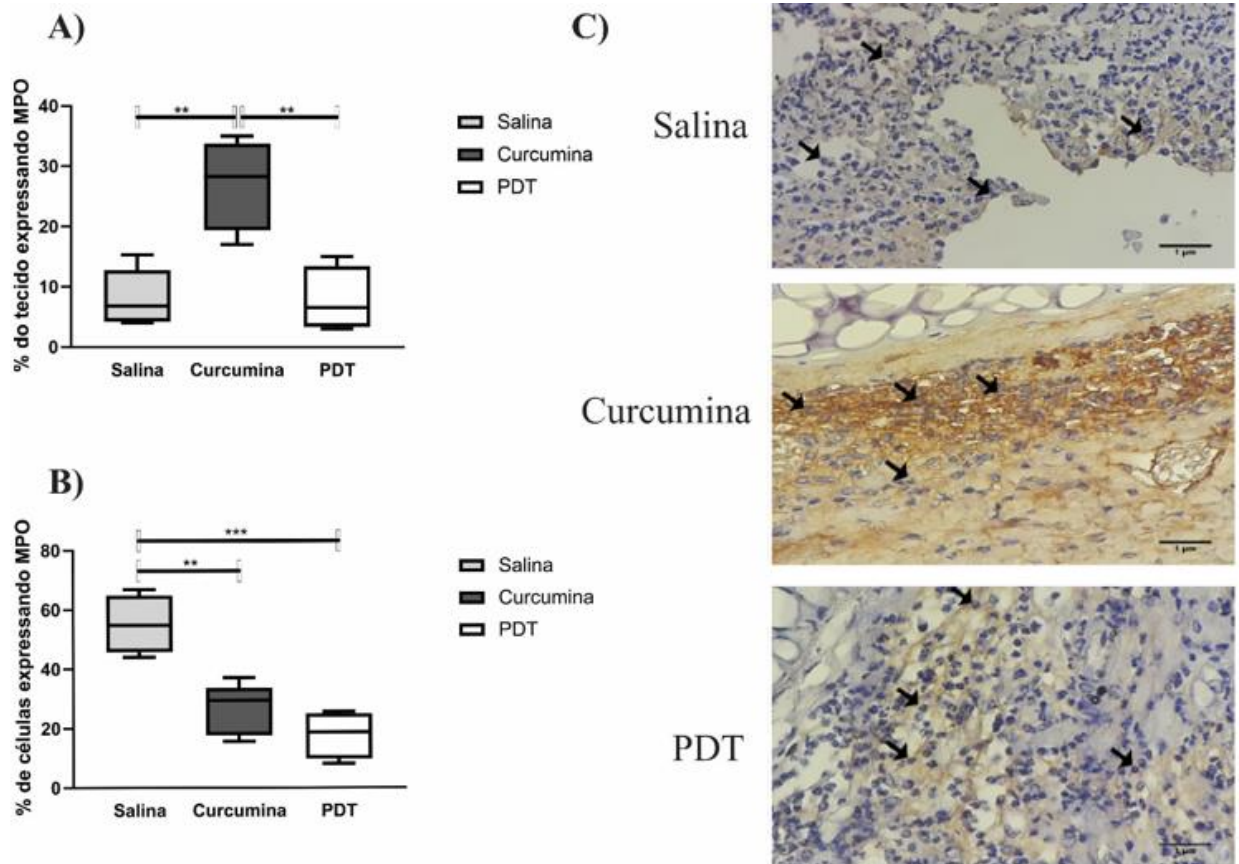
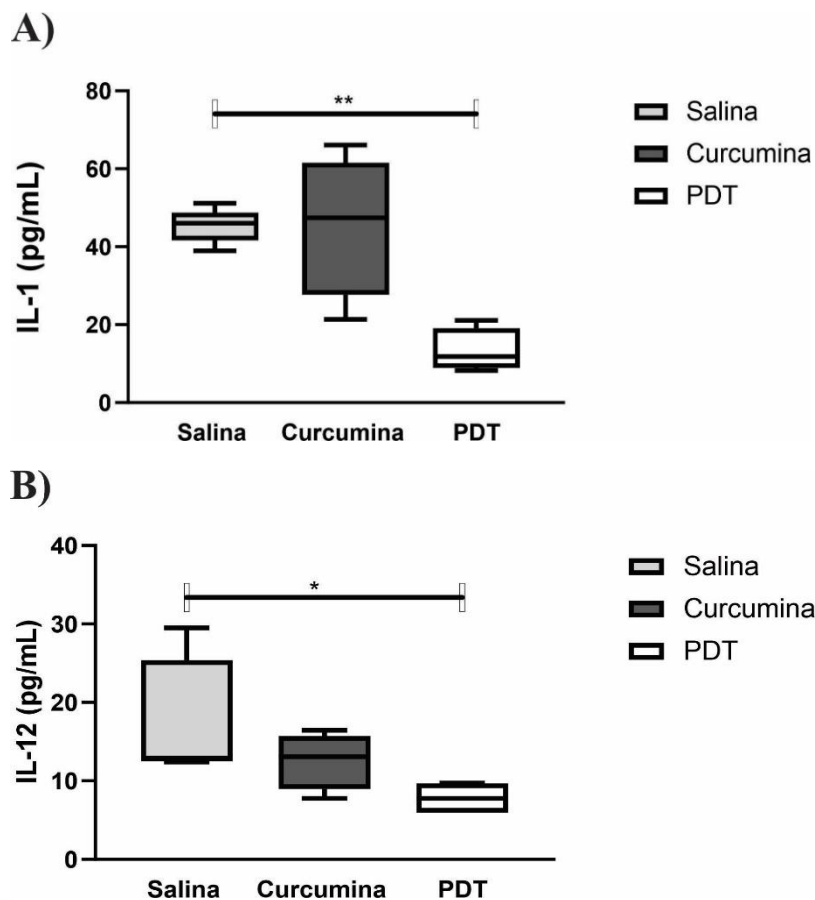


Figura 8. Análise da marcação de MPO na orelha após os tratamentos. . Usando o software ImageJ para análise de imagens, a área tissular marcada com MPO foi calculada (A). Todas células marcadas foram contadas e então relacionadas com o número total de leucócitos presentes no tecido (B). Fotomicrografias

representativas dos grupos estão alocadas de acordo com o tratamento que foi aplicado onde setas indicam as células expressando MPO (C). n= 5 animais por grupo. Para análises estatísticas foram utilizados o teste paramétrico de ANOVA e o pós-teste de Tukey (** p-valor <0,01; *** p-valor < 0,001).

6.5 O grupo tratado com PDT utilizando curcumina teve a concentração das citocinas IL-1, IL-12 e IL-10 diminuída no linfonodo drenante

Usando a técnica de ELISA, as concentrações das citocinas IL-1, IL-10, IL-12 e IL-17 foram mensuradas utilizando a suspensão do linfonodo drenante como amostra. Foi encontrado que a aPDT induziu a diminuição das concentrações das citocinas IL-1 (Fig. 9A), IL-12 (Fig. 9B) e IL-10 (Fig. 9C) quando comparado com o grupo salina. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na análise da citocina IL-17 (Fig. 9D).



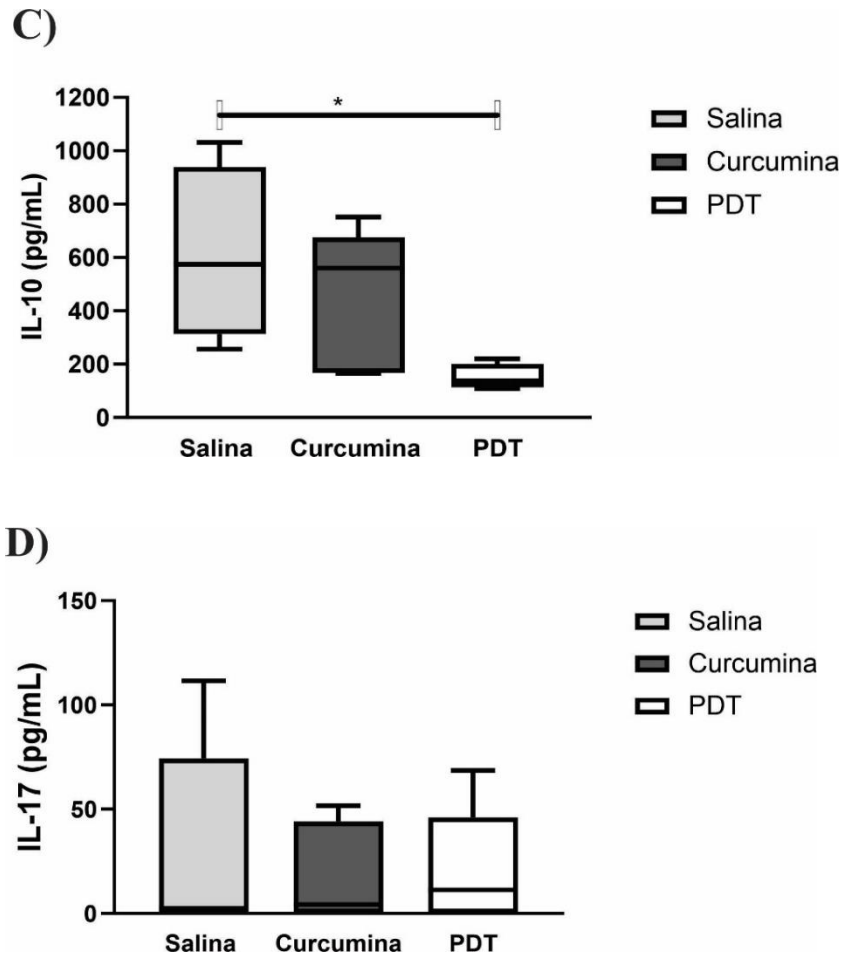


Figura 9. Dosagem de citocinas no linfonodo drenante após os tratamentos experimentais. As seguintes citocinas foram mensuradas: IL-1 (A); IL-12 (B); IL-10 (C); IL-17 (D). Para realização das análises estatísticas foram utilizados o teste paramétrico de ANOVA e o pós-teste de Tukey (figuras 9A e 9D) e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn (Figuras 9B e 9C) (Figura 6C). n= 5 animais por grupo (* p-valor <0,05; ** p-valor < 0,01).

7 Discussão

Este estudo apresentado é o primeiro trabalho que explora o efeito antibacteriano e efeitos sobre a inflamação causados pela aplicação da Terapia Fotodinâmica em camundongos com Diabetes *mellitus* do tipo 1 como tratamento de uma infecção intradérmica causada por *S. aureus*. A rota de infecção intradérmica possui grande importância para a realização de estudos de infecções causadas por *S. aureus*, já que esta via é utilizada por este patógeno para causar uma grande variedade de doenças. Por esta razão, pela primeira vez na literatura, este estudo foi capaz de descrever as modulações que ocorrem na resposta imunológica frente a exposição do tratamento de aPDT além de comprovar a eficiência da aPDT no controle da carga bacteriana em um modelo

de infecção intradérmica na orelha, mesmo em indivíduos com alta susceptibilidade a infecções por possuírem *Diabetes mellitus*. O estudo e desenvolvimento de técnicas que possam auxiliar os tratamentos convencionais de doenças infecciosas, como o uso de antibióticos por exemplo, se apresenta essencial no atual cenário que possui extrema dificuldade no controle de diversos patógenos. Sabendo que *S. aureus* está associado a infecções de difícil controle em indivíduos com diabetes, nosso estudo avaliou os efeitos da resposta inflamatória desenvolvida após aplicação da técnica aPDT, além do efeito antibacteriano no controle deste tipo de infecção.

Neste modelo de estudo foi utilizado a STZ com o objetivo de causar a morte das células β nas ilhotas pancreáticas para interferir na produção do hormônio insulina pelo organismo. A insulina é um hormônio com grandes propriedades anabólicas. Dessa forma, além da hiperglicemia (Fig. 5A), detectada via glicosímetro, outros efeitos sistêmicos como a redução do peso dos animais foram evidentes (Fig. 5B).

Como esperado neste estudo, após o estabelecimento do DMT1, os animais apresentaram perda significativa do seu peso (Fig 5.B) devido à ausência da insulina. A insulina está diretamente relacionada com o estímulo de vias anabólicas como a lipogênese, síntese proteica e a inibição de vias catabólicas como a lipólise pela inibição direta da enzima Lipase Hormônio Sensível. A insulina possui influência direta na atividade de enzimas envolvidas com a lipogênese. A enzima Acetil-coA carboxilase, que converte o acetil-coA em Malonil-coA realiza uma importante atividade no desvio de rotas a favor da lipogênese. A atividade desta enzima é aumentada na presença da insulina, que induz a desfosforilação dessa enzima, aumentando assim a sua atividade (LONGO et al., 2019; MANUEL; HAEUSLER, 2020).

A síntese proteica é outra rota anabólica influenciada pela ação da insulina. A ação da insulina está diretamente ligada ao aumento da síntese proteica em um organismo com grande disponibilidade de aminoácidos (ABDULLA et al., 2016). A insulina estimula o aumento da proteína AKT, que por sua vez, pode atuar em uma via de ação estimulando por fosforilação a atividade da mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) e subsequentemente 4E-BP1 e S6K1. Juntas, essas proteínas formam o complexo MTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex I*). Este complexo está diretamente relacionado com a síntese proteica no músculo esquelético (TIMMERMAN et al., 2010; BARAZZONI et al., 2012).

Ao avaliar os efeitos do tratamento sobre o controle da carga bacteriana foi possível observar neste trabalho que a aPDT, utilizando curcumina, reduziu significativamente a carga

bacteriana no linfonodo drenante de animais com DMT1 (Fig. 6A). Após a aplicação da aPDT, o linfonodo retromaxilar foi coletado para verificar os efeitos da técnica no controle da infecção, sobretudo para averiguar o controle da carga bacteriana nos animais tratados. O linfonodo retromaxilar é o responsável pela drenagem do sítio de infecção na orelha, assim, ao fazer a sua análise, é possível verificar este importante fenômeno de interação entre os dois sítios, já que os linfonodos drenam diversos componentes como proteínas, células e bactérias do sítio infeccioso. *S. aureus* pode ser drenado e sobreviver por dias no linfonodo, sendo possível fazer uma relação de que quão maior for o número de bactérias vivas no sítio infeccioso, maior será o número que alcançará o linfonodo (TAVARES et al., 2011; ALMEIDA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2020).

Estudos anteriores também avaliaram o controle de infecções causadas por *S. aureus* em outros modelos de estudos com o uso da aPDT (ALMEIDA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2019b, 2019a, 2020). A realização dessa pesquisa teve como intenção a ampliação do conhecimento sobre os efeitos da aplicação desta técnica em modelos mais complexos e de poucos estudos na literatura, como por exemplo, o modelo animal de DMT1. Estes mostram que a técnica de aPDT, usando variados tipos de fotossensibilizantes, foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana encontrada no linfonodo drenante neste modelo de infecção intradérmica (ALMEIDA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2019a, 2020).

Outros estudos que visam a aplicação da aPDT no tratamento de infecções em indivíduos com diabetes mostram a eficiência desta técnica no controle da carga bacteriana no tratamento de peri-implante e também úlceras nos pés, utilizando fotossensibilizantes outros como fenotiazinas, azul de metileno e azul de toluidina (AL AMRI et al., 2016; BRANDÃO et al., 2023)

Pensando na aplicação da aPDT para o tratamento de infecções bacteriana, é amplamente relatado que a técnica possui maior eficácia no controle de espécies gram-positivas do que espécies gram-negativas, devido às diferentes estruturas fundamentais da parede celular destes microrganismos (WONG et al., 2018). A membrana de bactérias gram-positivas é composta por uma parede relativamente porosa de peptidoglicano e outros fatores de virulência como o ácido lipoteicóico, que não atribuem cargas ao revestimento destas bactérias. Estas características permitem que o FS consiga ser absorvido e atue com maior eficiência no controle das bactérias gram-positivas, que até então não possuem algum mecanismo de resistência relatado na literatura (HAMBLIN, 2016; WARRIER et al., 2021).

O efeito da aPDT sobre a carga bacteriana é algo que chama a atenção neste estudo e pode, no futuro, alcançar impactos positivos pensando no tratamento de infecções em humanos com DMT1. Este resultado se torna ainda mais importante pelo fato de que este grupo de indivíduos possui o risco duas vezes maior em desenvolver doenças infecciosas quando comparados à indivíduos saudáveis (SIMONSEN et al., 2015).

Levando em consideração o grande risco que indivíduos com DMT1 possuem em serem infectados, os mesmos fazem extenso uso de antibióticos. Por muitas vezes o uso de antibióticos é realizado por profilaxia, o que pode culminar com o favorecimento do surgimento de cepas bacterianas com inúmeros mecanismos de resistência a antibióticos. Estes possíveis eventos acabam por gerar maiores barreiras para o tratamento destas infecções bacterianas (SIMONSEN et al., 2015; JANSEN; LLOR; BJERRUM, 2014; KNIRSCH; ANDERSON, 2018).

No atual panorama, a aPDT se apresenta como uma ferramenta alternativa no tratamento de doenças infecciosas, se provando eficaz em diversos estudos, tanto quando utilizada em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (ALMEIDA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018; SAKIMA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2019a; KUNZ et al., 2019; SAYAR et al., 2019; DOS SANTOS et al. 2020). Apesar do avanço da informação a partir da realização de mais estudos da área, a avaliação desta terapia em um modelo *in vivo* para o tratamento de infecções e o efeito sobre parâmetros da inflamação desta técnica em indivíduos com diabetes se encontrava inexplorada até a realização deste trabalho.

A curcumina tem sido utilizada em vários estudos como FS para a realização de diversos protocolos de PDT. Este FS é ativado pela luz azul, próxima ao espectro de 450 nm, e em diversos estudos se mostra efetiva no controle de carga bacteriana (ALMEIDA et al., 2017; SANITÁ et al., 2017; WU et al., 2016). Entretanto, um importante destaque é que nenhum desses estudos avaliou a resposta inflamatória desenvolvida como também a sua eficiência quando utilizada em um protocolo de aPDT no tratamento de infecções em um modelo *in vivo de* camundongos com DMT1 infectados pela via intradérmica com *S. aureus*.

A derme é um sítio corpóreo para *S. aureus*, onde o mesmo se apresenta extremamente capacitado em estabelecer um processo infeccioso. Entretanto, é importante ressaltar que neste sítio corpóreo existe uma rica quantidade de células APC's como células de Langerhans e Macrófagos, capazes de responder rapidamente à presença deste patógeno e iniciar o processo inflamatório com recrutamento e ativação de células do sistema imunológico atuando através de mecanismos

oxidantes, por exemplo. (YASUDA et al., 2016; LEE et al., 2018).

É possível observar que uma das mudanças geradas no grupo de animais tratados com a aPDT foi o aumento significativo da concentração de nitritos e nitratos encontrados no linfonodo drenante (Fig. 6C). Os nitritos e nitratos são moléculas que podem atuar no processo de estresse oxidativo, onde o nitrito pode ser reduzido e então gerar NO, assim, potenciando a via oxidativa para a produção de mais radicais (YARUBE, 2012). Apesar de não ser tratado como uma via clássica, a enzima MPO, que é expressa em células imunes como o neutrófilo, é capaz de usar o nitrito para a produção de dióxido de nitrogênio, que possui grande atividade antimicrobiana (BEAVERS; SKAAR, 2016).

Nitratos e nitritos são produtos do óxido nítrico (NO) que são utilizados durante o “*burst oxidativo*” na defesa de hospedeiros por células como macrófagos e neutrófilos (BEAVERS; SKAAR, 2016; CARNEIRO et al., 2016; DAVIES et al., 2017), e é um dos principais mecanismos utilizados pelo hospedeiro no controle de *S. aureus* (BEAVERS; SKAAR, 2016).

Após a avaliação de parâmetros como controle da carga bacteriana e concentração de nitritos e nitratos, frutos do estresse oxidativo, no linfonodo gerados pela aPDT, as seguintes análises foram realizadas no sítio infeccioso, na orelha dos animais. Apesar da redução na carga bacteriana, o número total de leucócitos (Fig. 7A), mononucleares e polimorfonucleares (Fig. 7B e 7C, respectivamente) no sítio de infecção não diferiu entre o grupo aPDT comparado aos grupos controles.

É importante ressaltar que alguns estudos apontam através de diferentes modelos, utilizando camundongos não-diabéticos, que o perfil de recrutamento celular para o sítio de infecção após a aplicação da aPDT é direcionado para o recrutamento de células que possam atuar diretamente no controle da infecção, principalmente polimorfonucleares (DOS SANTOS et al., 2019b, 2019a; TANAKA et al., 2012). Estes dados mostram que, através de diferentes mecanismos, a aPDT aplicada em animais com DMT1 é capaz de também exercer uma resposta eficiente no controle da infecção causada por MRSA.

Para avaliar os possíveis mecanismos que foram desempenhados pelos animais tratados com a aPDT foi analisada a atividade celular no tecido infectado e tratado. Através do emprego da técnica de imuno-histoquímica para marcação da enzima mieloperoxidase (MPO) foi realizada tanto a análise de proporção de células expressando MPO quanto a área tecidual marcada com MPO (Fig. 8A e Fig. 8B, respectivamente), onde foi possível observar eventos marcantes. O grupo

em que a PDT foi aplicada apresentou a mesma área tecidual marcada com MPO quando comparado com o grupo onde a salina foi aplicada, enquanto isso, o grupo tratado apenas com a curcumina apresentou grande expressão dessa enzima (Fig. 8A). Entretanto, a proporção de células expressando MPO no grupo que recebeu a aPDT foi menor em comparação ao grupo que recebeu apenas salina, e apresentou uma expressão similar ao padrão apresentado pelo grupo tratado apenas com curcumina (Fig. 8B).

Estes resultados mostram que os animais tratados com a aPDT apresentaram uma expressão mais intensa da MPO no tecido mesmo com menos células apresentando a sua expressão quando comparado ao grupo controle, o que demonstra uma otimização da resposta via MPO no sítio infeccioso.

Apesar de não ter sido detectada diferença entre os grupos testados em relação ao recrutamento de células no sítio inflamatório, a atividade celular de células de defesa no sítio infeccioso, como por exemplo, a atividade de neutrófilos pode ser modificada. Um dos possíveis mecanismos antimicrobianos utilizado pelo neutrófilo é através da expressão e atividade de enzimas como a MPO. A MPO participa da cascata enzimática que resulta na produção do ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio, um potente agente antimicrobiano capaz de controlar infecções causadas por patógenos, tais como *S. aureus* (DE JONG et al., 2018; GUERRA et al., 2017).

Na membrana interna dos lisossomos de neutrófilos, a enzima NADPH Oxidase (NOX_2), tem a capacidade de reduzir o oxigênio molecular no íon superóxido, que neste contexto é pouco reativo (DAVIES, 2021). Subsequentemente e rapidamente, a enzima superóxido dismutase catalisa a transformação do íon superóxido em peróxido de hidrogênio, que posteriormente, na presença de cloro, será convertido em HClO pela MPO (METZLER et al., 2011; ARNHOLD, 2020).

Os nitritos e nitratos, além de atuarem no ciclo para formação do NO, que então é utilizado diretamente no *burst* oxidativo para o controle de bactérias como *S. aureus*, podem ser utilizados em outras vias oxidativas para o controle de patógenos. É relatado na literatura que essas moléculas podem ser utilizadas para reagir diretamente com o HClO, assim, formando potentes espécies reativas, como o dióxido de nitrogênio (BEAVERS; SKAAR, 2016). Neste contexto, o dióxido de nitrogênio derivado de moléculas como o nitrito, pode reagir diretamente com o íon superóxido, que é formado pela reação fotodinâmica e formar o peroxinitrito que atua diretamente na morte de

bactérias, tanto gram-positivas, como *S. aureus*, quanto gram-negativas, como *Escherichia coli* (HUANG et al., 2019).

Desta maneira, é possível inferir que o perfil de resposta desencadeado pela aplicação da aPDT neste experimento aumentou a produção de moléculas capazes de auxiliar de maneira efetiva o controle da carga bacteriana, auxiliando assim em um processo de cura mais eficiente do processo infeccioso causado por *S. aureus*.

Estes resultados mostram que o tratamento com a PDT apresenta um balanço no controle da infecção que não foi observado nos outros grupos testados, já que os mesmos não controlaram a carga bacteriana. É importante ressaltar que nesta análise, o grupo tratado com curcumina não-fotoativada, apesar de não mostrar algum aumento no número de células expressando a MPO, apresentou uma forte expressão dessa enzima nas células que apresentaram sua expressão. De acordo a associação dos dados obtidos neste experimento, apesar de gerar uma intensa expressão de MPO pelo tecido, este perfil de resposta não foi capaz de controlar a infecção.

A análise realizada indica que a aPDT pode estimular a expressão da MPO sem aumentar drasticamente a população de neutrófilo no sítio infeccioso. Além disso, com este resultado, é possível aferir que o tratamento aplicado ao grupo aPDT levou a formação de um novo balanço entre o recrutamento e ativação de neutrófilos, balanço este que se provou eficiente para o controle da infecção causada por *S. aureus* em camundongos com DMT1.

A aplicação da PDT usando vários fotossensibilizantes, em diferentes modelos de estudo, mostrar a expressão aumentada de MPO em células após a aplicação da terapia em animais infectados com *S. aureus* quando comparados os grupos controles (DOS SANTOS et al., 2019a, 2020), o que não ocorreu neste estudo. Entretanto, é importante ressaltar que tais estudos fizeram o uso de modelos com animais hípidos, que em essência, são diferentes do modelo utilizado neste trabalho.

Indivíduos com diabetes acabam por possuir um sistema de defesa fragilizado. Processos como produção de mediadores químicos e, conseqüentemente, recrutamento e ativação de células do sistema imune acabam se tornando ineficientes. Processos celulares que são importantes para as células imunes, como fagocitose e vias oxidativas, relacionados intimamente com o controle de patógenos, são afetados negativamente em células como as do sistema imune inato (BONYEK-SILVA et al., 2020; NIE et al., 2021).

Os processos celulares envolvidos na resposta imune durante o controle da infecção, como

por exemplo, recrutamento e ativação, eventos tratados neste estudo (Fig. 7 e Fig. 8, respectivamente), podem ser regulados por mediadores químicos como as citocinas (MEHROTRA et al., 2017; PUTNAM et al., 2019). Como ressaltado ao longo deste trabalho, o linfonodo drenante recebe fluidos do sítio inflamatório, se apresentando como uma viável fonte para análise destas moléculas produzidas durante a resposta inflamatória no controle da infecção.

É sabido que quanto maior a carga bacteriana no sítio de lesão, maior será o número de bactérias que serão drenadas, como também células e citocinas produzidas durante a inflamação que podem atuar no desenvolvimento da resposta adaptativa (DOS SANTOS et al., 2019b; YI et al., 2020). Neste sentido é possível observar que, apesar da citocina IL-1 estar diretamente relacionada com processos, como o recrutamento de células de defesa, no sítio infeccioso e o grupo tratado com a aPDT apresentar menor concentração da citocina (Fig. 9A), não ocorreu a diminuição esperada da intensidade do processo de recrutamento de células de defesa para o sítio de infecção, já que não houve diferenças significativas detectadas (Fig. 7A).

As células residentes do sistema imune na pele respondem inicialmente à presença das bactérias através do reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) pelo uso dos seus receptores TLRs (*Toll-like receptors*). No caso de *S. aureus*, o TLR2 é um receptor central no reconhecimento de componentes desta bactéria como o peptidoglicano, lipoproteínas e o ácido teicóico. A partir do reconhecimento deste patógeno, as células do sistema imune irão iniciar a resposta inflamatória através da expressão de citocinas pró-inflamatórias gerando o recrutamento e ativação de células de defesa (FOURNIER, 2013; YIMIN et al., 2013; KIM et al., 2020).

A ativação de receptores TLR está diretamente associada com vias de produção de citocinas, como por exemplo, a produção da citocina IL-1 β via inflamossoma. O reconhecimento de antígenos como o peptidoglicano via TLR é capaz de iniciar a produção da pró-IL1 β , que posteriormente, pela formação do inflamossoma via NLRP3, converte esta proteína em IL-1 β ativa através da Caspase-1 (NETEA et al., 2010; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

Na inflamação aguda, a citocina IL-1 está relacionada com o início da resposta inflamatória. Ao se ligar em seu respectivo receptor IL-1 β está relacionada em processos celulares como recrutamento e ativação de células de defesa, como também, estímulo de produção de citocinas como TNF- α e IL-6. Além de atuar diretamente sobre as células de defesa, IL-1 é responsável por gerar os sinais de febre e síntese de proteínas de fase aguda da inflamação, como a proteína C-

reativa, por exemplo (NETEA et al., 2010; ANDERS, 2016; KANEKO et al., 2019).

Como ressaltado anteriormente, células polimorfonucleares, como os neutrófilos, exercem função de extrema importância para o controle de infecções causadas por *S. aureus*. Uma citocina, diretamente relacionada com a ativação e recrutamento de neutrófilos para o controle bem sucedido de infecções bacteriana, é a IL-17. Entretanto, analisando os dados deste trabalho, não foi possível observar diferença nos níveis de IL-17 entre os grupos testados (Fig. 9D). Todavia, é importante ressaltar que a produção desta citocina se torna mais evidente a partir de cerca de 3 dias após a infecção na pele (MARCHITTO et al., 2019) tempo diferente do analisado neste desenho experimental. Este resultado mostra que, 48 h após a infecção e 24 h após o tratamento com a aPDT, o mecanismo gerado para o controle da carga bacteriana não acontece através de uma produção diferenciada da citocina IL-17 entre os grupos testados.

As principais fontes de produção de IL-17 são as células T CD4⁺ do perfil Th17 na imunidade adquirida, e, na imunidade inata, as células T $\gamma\delta$, que são extremamente importantes na defesa de infecções na pele causadas por *S. aureus*, migrando do linfonodo para a pele durante a infecção (MARCHITTO et al., 2019). Tanto, células de linhagem hematopoiética, como neutrófilos e macrófagos, quanto de linhagem não-hematopoiética, como células mesenquimais, células endoteliais e células epiteliais, possuem receptores para IL-17. A citocina IL-17 possui um importante papel na defesa contra *S. aureus*.

Neste contexto, essa citocina pode atuar de diversas maneiras, como por exemplo, recrutando e potencializando o “burst” oxidativo de neutrófilos no sítio de infecção, além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β e TNF α , IL-6 bem como a produção de peptídeos para defesa do hospedeiro, como as β -defensinas, Calprotectinas (GU; WU; LI, 2013; ABUSLEME; MOUTSOPOULOS, 2017; MARCHITTO et al., 2019).

Dos Santos et al. (2019), em um modelo *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6, mostrou que animais infectados com *S. aureus* e tratados com aPDT utilizando o resveratrol como FS apresentaram um aumento da concentração de IL-17. O aumento desta citocina foi relacionado ao recrutamento e ativação de neutrófilos, que se mostrou um mecanismo efetivo no controle da infecção no trabalho de Dos Santos e colaboradores (2019), diferentemente do resultado obtido nesta tese, onde a produção da IL-17 não se mostra diferentemente expressa entre os grupos em animais com DMT1 neste estudo.

Em adição ao recrutamento celular, a ativação de células imune para a realização de

mecanismos como fagocitose e eliminação de patógenos, como *S. aureus*, são extremamente importantes, destacando a participação de citocinas como IL-12 neste processo. Células mononucleares, como células *Natural Killers* (NK) e Linfócitos T, podem ser ativadas por IL-12, que em resposta produzem IFN- γ , citocina que atua ativando diretamente macrófagos, assim, aumentando a eficiência da defesa contra *S. aureus* (LISBETH; INGMER; FRØKIÆR, 2016).

Outra citocina que possuiu sua produção modulada pelo tratamento realizado com a aPDT foi a IL-12. Os animais tratados com a PDT apresentaram baixos níveis de IL-12 no linfonodo drenante (Fig. 9B). Esse dado pode ser relacionado com a baixa carga bacteriana encontrada nesse sítio, já que com uma baixa carga bacteriana, a necessidade de ativar células imunes para a defesa é menor, apesar de IL-12 ser apontada como uma citocina envolvida na ativação de células imune, potencializando o poder oxidativo (NGUYEN et al., 2015),

O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias é descrito em indivíduos com DMT1 em diferentes estágios, podendo ser utilizadas como marcadores da progressão da doença (RIBEIRO et al., 2019). Este aumento crônico dos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode resultar em estado de inflamação intensa, se tornando um processo danoso para o organismo, podendo causar lesões e doenças nos sítios corpóreos como a pele (FENINI; CONTASSOT; FRENCH, 2017).

O estabelecimento de uma inflamação elevada em indivíduos com Diabetes *mellitus* tem sido cada vez mais constatado. Moléculas como o Leucotrieno B4 (LTB₄) têm sido indicadas como uma possível via para a manutenção deste aumento basal da resposta inflamatória de indivíduos diabéticos quando comparado a indivíduos não diabéticos (BONYEK-SILVA et al., 2021).

O LTB₄ é um eicosanoide, um mediador lipídico, envolvido com diversos processos inflamatórios, tais como a quimiotaxia de leucócitos, além de estar envolvida com o estabelecimento de uma intensa inflamação, aumentando os níveis de IL-1 através da ativação do inflamossoma (CAROLINA GUERTA SALINA et al., 2002; AFONSO et al., 2012). Com seus efeitos em diabéticos, o LTB₄, que é um produto da via do ácido araquidônico, produzido pela 5-Lipooxigenase, está relacionado com a maior susceptibilidade a infecções por bactérias como *S. aureus* (BRANDT et al., 2018; BONYEK-SILVA et al., 2020).

A intensa produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas, pode ser capaz de gerar uma grande disfunção na coordenação do sistema imunológico. Concentrações exacerbadas de citocinas em indivíduos que possuem doenças crônicas não-transmissíveis como o diabetes podem

se relacionar com uma resposta desorganizada de células do sistema imune, levando à uma fragilidade destes sistemas de defesa (BONYEK-SILVA et al., 2020)

Considerando todo este estado pró-inflamatório causado pelo DMT1, é sabido que para compensar, o organismo lança mão de ferramentas como a produção de moléculas com potencial anti-inflamatório para estabelecer um balanço no controle glicêmico e na resposta inflamatória (CODELLA et al., 2015). Para examinar o que poderia ter gerado a menor produção das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-12, os níveis de IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória, foram mensurados (Fig. 9C). A análise de mediadores anti-inflamatórios nesse contexto é de suma importância, já que a IL-10, por exemplo, é um importante mediador na regulação de mediadores pró-inflamatórios (ROSE et al., 2017). Uma das principais funções desta citocina é proteger o organismo de danos gerados por intensas inflamações causadas por infecções causadas por patógenos como vírus e bactérias (OUYANG et al., 2011).

Avaliando a produção de IL-10 nos grupos experimentados, foi possível notar que o grupo tratado com aPDT apresentou baixos níveis desta citocina (Fig. 9C). É possível que os efeitos diretos da aPDT, pela produção de espécies reativas (Fig. 6C), foram responsáveis pela redução da carga bacteriana detectada no linfonodo drenante. Sendo assim, a necessidade de estabelecer uma resposta inflamatória é reduzida, o que reduziria a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 e IL-12, desta maneira, também havendo uma menor produção de IL-10, já que se trata de uma inflamação mais branda.

Pensando sobre possíveis futuras associações com o nosso estudo, a aplicação da aPDT usando a curcumina como FS em animais com DMT1, além de controlar a carga bacteriana, consegue modular uma produção branda de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção. Isto pode ser de grande interesse para futuras aplicações levando em conta que indivíduos com DMT1 possuem um estado basal de alta produção de mediadores inflamatórios (RIBEIRO et al., 2019).

Células como macrófagos, células dendríticas, além das células Treg, são produtoras de IL-10. Esta citocina regula a resposta inflamatória através de uma cascata de sinalização que leva a atuação do fator de transcrição STAT3. STAT3 pode atuar por diferentes mecanismos, por exemplo, diminuindo a expressão de receptores TLR, como também, regulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias e desenvolvimento de perfis de resposta imune adquirida (SARAIVA; O’GARRA, 2010; WANG et al., 2019; SARAIVA; VIEIRA; O’GARRA, 2020).

A menor produção de IL-10 neste cenário pode apresentar benefícios, levando em

consideração que trabalhos anteriores mostram a capacidade de *S. aureus* em manipular o aumento da produção de IL-10 para evadir de mecanismos de defesa do sistema imune (HEIM; VIDLAK; KIELIAN, 2015; LEECH et al., 2017). Altos níveis de IL-10 durante infecções causadas por esse patógeno estão associadas a um alto índice de mortalidade em indivíduos com o quadro de bacteremia (ROSE et al., 2017).

Observando o padrão de produção de citocinas no grupo que foi tratado com a aPDT é possível afirmar que uma resposta inflamatória branda foi estabelecida quando comparada aos grupos controles. Entretanto, mesmo sendo branda, é importante ressaltar que a resposta inflamatória ainda ocorre, mesmo com a ação direta do tratamento ao reduzir a carga bacteriana (Fig. 3A), pois mesmo com a morte das bactérias, antígenos de *S. aureus* serão drenados, reconhecidos e então a resposta inflamatória será desencadeada no linfonodo (EGAWA et al., 2020).

8 Conclusão

Este foi o primeiro trabalho mostrando que a aPDT, fotoativando a curcumina *ex vivo*, quando aplicada como tratamento em camundongos C57BL/6, com *Diabetes Mellitus* do tipo 1 induzida por estreptozotocina, e infectados intradérmicamente na orelha com *S. aureus*, desencadeia respostas fisiológicas que culminam com o melhor controle da infecção (MUNIZ et al., 2021). Com estes dados, foi possível observar pela primeira vez na literatura que, camundongos com DMT1, quando tratados com aPDT utilizando a curcumina como FS, apresentam altos níveis de nitratos e nitritos e um controle significativo da carga bacteriana 48 horas após a infecção e 24 horas após tratamento.

O protocolo de aPDT aplicado, usando curcumina (100 µg) sendo ativada *ex vivo* por luz de LED azul (450 nm), com fluência de 13.5 J/cm², foi testado pela primeira vez neste modelo de estudo com animais DMT1 infectados intradérmicamente na orelha com *S. aureus* e se mostrou eficiente no controle da carga bacteriana além de modular a formação de um microambiente inflamatório menos agressivo e mais eficiente para o hospedeiro. Anteriormente, a aplicação da aPDT utilizando a curcumina como fotossensibilizante já havia sido aplicado e se mostrado eficiente no controle de *S. aureus* resistente a meticilina pela via de infecção intradérmica (ALMEIDA et al., 2017). Entretanto, nunca havia sido realizado nenhum estudo utilizando o modelo de DMT1 induzido por Estreptozotocina. Por estas razões, o protocolo realizado no atual

estudo se mostra promissor para futuras aplicações em indivíduos que possuam o *diabetes mellitus* e que possam ser infectados com *S. aureus*.

Apesar do controle da carga bacteriana ter sido evidenciado no linfonodo após a aPDT, é importante destacar que este estudo possuiu limitações por ter sido o primeiro a realizar este tipo de abordagem. Mais estudos devem ser realizando visando a aplicação de técnicas mais robustas para a análise molecular da resposta desencadeada pelo tratamento além da avaliação de um maior espectro de mediadores inflamatórios. Desta maneira gerando uma descrição dos perfis celulares com maior profundidade durante a resposta de defesa dos leucócitos recrutados para a via intradérmica em animais com DMT1 no controle de *S. aureus* resistente a metilina.

9 Referências

ABDULLA, Haitham; SMITH, Kenneth; ATHERTON, Philip J.; IDRIS, Iskandar. Role of insulin in the regulation of human skeletal muscle protein synthesis and breakdown: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 44–55, 2016. DOI: 10.1007/s00125-015-3751-0.

ABU EL-ELLA, S. S.; KHATTAB, E. S. A. E. H.; EL-MEKKAWY, M. S.; EL-SHAMY, A. A. CD226 gene polymorphism (rs763361 C>T) is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus among Egyptian children. **Archives de Pediatrie**, [S. l.], p. 6–10, 2018. DOI: 10.1016/j.arcped.2018.06.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2018.06.009>.

ABUSLEME, L.; MOUTSOPOULOS, N. M. **IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome**. **Oral Diseases** Blackwell Publishing Ltd, , 2017. DOI: 10.1111/odi.12598.

ADI, Saleh; GERARD-GONZALEZ, Andrea. Type 1 Diabetes Mellitus: An overview. **Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 287–304, 2018. DOI: 10.1016/B978-1-4377-1604-7.00561-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00561-3>.

AFONSO, Philippe V.; JANKA-JUNTILA, Mirka; LEE, Young Jong; MCCANN, Colin P.; OLIVER, Charlotte M.; AAMER, Khaled A.; LOSERT, Wolfgang; CICERONE, Marcus T.; PARENT, Carole A. LTb4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. **Developmental Cell**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 1079–1091, 2012. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.02.003.

AL AMRI, Mohammad D.; KELLESARIAN, Sergio Varela; AHMED, Asma; AL-KHERAIF, Abdulaziz A.; ROMANOS, Georgios E.; JAVED, Fawad. Efficacy of periimplant mechanical debridement with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 14, p. 166–169, 2016. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.04.015.

AL KINDI, Arwa; ALKAHTANI, Abdullah M.; NALUBEGA, Mayimuna; EL-CHAMI, Cecile; O'NEILL, Catherine; ARKWRIGHT, Peter D.; PENNOCK, Joanne L. Staphylococcus aureus internalized by skin keratinocytes evade antibiotic killing. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. SEP, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02242.

ALI, Amjad; BANERJEA, Akhil C. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1038/srep27539. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27539>.

ALMEIDA, Palloma Porto; PEREIRA, Ítalo Sousa; RODRIGUES, Karine Bitencourt; LEAL, Lorena Santos; MARQUES, Andressa Souza; ROSA, Luciano Pereira; DA SILVA, Francine Cristina; DA SILVA, Robson Amaro Augusto. Photodynamic therapy controls of Staphylococcus aureus intradermal infection in mice. **Lasers in Medical Science**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1337–1342, 2017. DOI: 10.1007/s10103-017-2247-1.

ALNEK, Kristi; KISAND, Kalle; HEILMAN, Kaire; PEET, Aleksandr; VARIK, Karin; UIBO, Raivo. Increased blood levels of growth factors, proinflammatory cytokines, and Th17 cytokines in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1–16, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0142976.

ANDERS, Hans Joachim. **Of Inflammasomes and alarmins: IL-1 β and IL-1 α in kidney disease**. **Journal of the American Society of Nephrology**. American Society of Nephrology, , 2016. DOI: 10.1681/ASN.2016020177.

ANDRADE, Carine Sousa; RIBEIRO, Guilherme Sousa; SANTOS, Carlos Antonio Souza Teles; NEVES, Raimundo Celestino Silva; MOREIRA, Edson Duarte. Factors associated with high levels of glycated haemoglobin in patients with type 1 diabetes: a multicentre study in Brazil. **BMJ open**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. e018094, 2017. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-018094.

ANUPAM, Kumari; KAUSHAL, Jyotsana; PRABHAKAR, Nirmal; BHATNAGAR, Archana. Effect of redox status of peripheral blood on immune signature of circulating regulatory and cytotoxic T cells in streptozotocin induced rodent model of type I diabetes. **Immunobiology**, [S. l.], v. 223, n. 10, p. 586–597, 2018. DOI: 10.1016/j.imbio.2018.07.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.07.004>.

ARNHOLD, Jürgen. The dual role of myeloperoxidase in immune response. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 2020. DOI: 10.3390/ijms21218057.

ASHTON, Michelle P. et al. Incomplete immune response to coxsackie B viruses associates with early autoimmunity against insulin. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. May, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1038/srep32899. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep32899>.

AUDET, Julie; KILKENNY, Dawn M.; ROCHELEAU, Jonathan V. Fibroblast growth factor receptor 5 (FGFR5) is a co-receptor for FGFR1 that is up-regulated in beta-cells by cytokine-induced inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 1–25, 2018. DOI: 10.1074/jbc.RA118.003036. Disponível em: <http://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003036>.

BAHARLOU, Rasoul; AHMADI-VASMEHJANI, Abbas; DAVAMI, Mohammad Hasan; FARAJI, Fatemeh; ATASHZAR, Mohammad Reza; KARIMIPOUR, Firoozeh; SADEGHI, Alireza; ASADI, Mohammad Ali; KHOUBYARI, Mahshid. Elevated Levels of T-helper 17-associated Cytokines in Diabetes Type I Patients: Indicators for Following the Course of Disease. **Immunological Investigations**, [S. l.], v.

45, n. 7, p. 641–651, 2016. DOI: 10.1080/08820139.2016.1197243.

BAPTISTA, Maurício S. et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. **Photochemistry and Photobiology**. Blackwell Publishing Inc., , 2017. DOI: 10.1111/php.12716.

BARAZZONI, Rocco; SHORT, Kevin R.; ASMANN, Yan; COENEN-SCHIMKE, Jill M.; ROBINSON, Matthew M.; NAIR, K. Sreekumaran. Insulin fails to enhance mTOR phosphorylation, mitochondrial protein synthesis, and ATP production in human skeletal muscle without amino acid replacement. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 303, n. 9, 2012. DOI: 10.1152/ajpendo.00067.2012.

BARRATT, Bryan J. et al. Brief Genetics Report Remapping the Insulin Gene/IDDM2 Locus in Type 1 Diabetes. **Diabetes**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://diabetes.diabetesjournals.org>].

BEAVERS, William N.; SKAAR, Eric P. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and Disease**, [S. l.], v. 74, n. 6, p. 1–15, 2016. DOI: 10.1093/femspd/ftw060.

BONNET, Isabelle; MILLON, Brune; MAURIN, Max; PAVESE, Patricia; BOISSET, Sandrine. High prevalence of spa type t571 among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients in a French University Hospital. [S. l.], p. 1–11, 2018.

BONYEK-SILVA, Icaro et al. Unbalanced production of LTB4/PGE2 driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1275–1286, 2020. DOI: 10.1080/22221751.2020.1773744.

BONYEK-SILVA, Icaro et al. LTB4-Driven Inflammation and Increased Expression of *ALOX5 / ACE2* During Severe COVID-19 in Individuals With Diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 70, n. 9, p. 2120–2130, 2021. DOI: 10.2337/db20-1260. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/70/9/2120/137716/LTB4-Driven-Inflammation-and-Increased-Expression>.

BRANDÃO, Maria Gírlane Sousa Albuquerque; XIMENES, Maria Aline Moreira; SOUSA, Danilo Ferreira De; VERAS, Vivian Saraiva; BARROS, Lívia Moreira; RABEH, Soraia Assad Nasbine; COSTA, Idevania Geraldina; ARAÚJO, Thiago Moura De. Photodynamic therapy for infected foot ulcers in people with diabetes mellitus: a systematic review. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, [S. l.], v. 141, n. 6, p. e2022476, 2023. DOI: 10.1590/1516-3180.2022.0476.27022023.

BRANDT, Stephanie L.; WANG, Sue; DEJANI, Naiara N.; KLOPFENSTEIN, Nathan; WINFREE, Seth; FILGUEIRAS, Luciano; MCCARTHY, Brian P.; TERRITO, Paul R.; SEREZANI, C. Henrique. Excessive localized leukotriene B4 levels dictate poor skin host defense in diabetic mice. **JCI insight**, [S. l.], v. 3, n. 17, 2018. DOI: 10.1172/jci.insight.120220.

BURIAN, Marc et al. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *staphylococcus aureus* nasal colonization. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 201, n. 9, p. 1414–1421, 2010. DOI: 10.1086/651619.

BURRACK, Adam L.; MARTINOV, Tijana; FIFE, Brian T. T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. **Frontiers in Endocrinology**. Frontiers Media S.A., , 2017. DOI: 10.3389/fendo.2017.00343.

CAMPOS, Carlos. Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: Pathology and clinical sequelae. **Postgraduate Medicine**, [S. l.], v. 124, n. 6, p. 90–97, 2012. DOI: 10.3810/pgm.2012.11.2615.

CARNEIRO, Pedro Paulo; CONCEIÇÃO, Jacilara; MACEDO, Michael; MAGALHÃES, Viviane; CARVALHO, Edgar M.; BACELLAR, Olivia. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0148084.

CAROLINA GUERTA SALINA, Ana et al. Leukotriene B₄ licenses inflammasome activation to enhance skin host defense. **IMMUNOLOGY AND INFLAMMATION**, [S. l.], v. 117, n. 48, p. 30619–30627, 2002. DOI: 10.1073/pnas.2002732117/-DCSupplemental.

CODELLA, Roberto; LANZONI, Giacomo; ZOSO, Alessia; CAUMO, Andrea; MONTESANO, Anna; TERRUZZI, Ileana M.; RICORDI, Camillo; LUZI, Livio; INVERARDI, Luca. Moderate intensity training impact on the inflammatory status and glycemic profiles in NOD mice. **Journal of Diabetes Research**, [S. l.], v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/737586.

CONDORELLI, Rosita A.; VIGNERA, Sandro La; MONGIOÌ, Laura M.; ALAMO, Angela; CALOGERO, Aldo E. Diabetes mellitus and infertility: Different pathophysiological effects in type 1 and type 2 on sperm function. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 9, n. MAY, 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00268.

COTTON, James A.; PLATNICH, Jaye M.; MURUVE, Daniel A.; JIJON, Humberto B.; BURET, Andre G.; BECK, Paul L. **Interleukin-8 in gastrointestinal inflammation and malignancy: Induction and clinical consequences**. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**. Dove Medical Press Ltd, , 2016. DOI: 10.2147/IJICMR.S63682.

CSOBONYEIOVA, Maria; POLAK, Stefan; DANISOVIC, Lubos. Generation of Pancreatic β -cells From iPSCs and their Potential for Type 1 Diabetes Mellitus Replacement Therapy and Modelling. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1055/a-0661-5873. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30114722%0Ahttp://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0661-5873>.

CUNHA, Daniel A. et al. Death protein 5 and p53-upregulated modulator of apoptosis mediate the endoplasmic reticulum stress-mitochondrial dialog triggering lipotoxic rodent and human β -cell apoptosis. **Diabetes**, [S. l.], v. 61, n. 11, p. 2763–2775, 2012. DOI: 10.2337/db12-0123.

DADRAS, Sara; ABDOLLAHIFAR, Mohammad Amin; NAZARIAN, Hamid; GHOREISHI, Seyed Kamran; FALLAHNEZHAD, Somaye; NASERZADEH, Parvaneh; JAJARMI, Vahid; CHIEN, Sufan; BAYAT, Mohammad. Photobiomodulation improved stereological parameters and sperm analysis factors in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 186, n. June, p. 81–87, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.06.018>.

DAI, Tianhong; TEGOS, George P.; LU, Zongshun; HUANG, Liyi; ZHIYENTAYEV, Timur; FRANKLIN, Michael J.; BAER, David G.; HAMBLIN, Michael R. Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 53, n. 9, p. 3929–3934, 2009. DOI: 10.1128/AAC.00027-09.

DAI, Xiaomei; CHEN, Xuelei; ZHAO, Yu; YU, Yunjian; WEI, Xiaosong; ZHANG, Xinge; LI, Chaoping. A Water-Soluble Galactose-Decorated Cationic Photodynamic Therapy Agent Based on BODIPY to

Selectively Eliminate Biofilm. **Biomacromolecules**, [*S. l.*], v. 19, n. 1, p. 141–149, 2018. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01316.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. a History of Photodynamic Therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, [*S. l.*], v. 61, n. 5, p. 340–348, 1991. DOI: 10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x.

DAVIES, Luke C.; RICE, Christopher M.; PALMIERI, Erika M.; TAYLOR, Philip R.; KUHNS, Douglas B.; MCVICAR, Daniel W. Peritoneal tissue-resident macrophages are metabolically poised to engage microbes using tissue-niche fuels. **Nature Communications**, [*S. l.*], v. 8, n. 1, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-02092-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02092-0>.

DAVIES, Michael J. Myeloperoxidase: Mechanisms, reactions and inhibition as a therapeutic strategy in inflammatory diseases. **Pharmacology and Therapeutics**. Elsevier Inc., , 2021. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107685.

DE GROOT, Pieter et al. Faecal microbiota transplantation halts progression of human new-onset type 1 diabetes in a randomised controlled trial. **Gut**, [*S. l.*], v. 70, n. 1, p. 92–105, 2021. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322630.

DE JONG, Nienke W. M. et al. A structurally dynamic N-terminal region drives function of the staphylococcal peroxidase inhibitor (SPIN). **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 293, n. 7, p. 2260–2271, 2018. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000134.

DE OLIVEIRA, Sofia; ROSOWSKI, Emily E.; HUTTENLOCHER, Anna. Neutrophil migration in infection and wound repair: Going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.49.

DE SOUZA FERREIRA, Cláudia; ARAÚJO, Tomaz Henrique; ÂNGELO, Marilene Lopes; PENNACCHI, Paula Commune; OKADA, Sabrina Sayori; DE ARAÚJO PAULA, Fernanda Borges; MIGLIORINI, Silene; RODRIGUES, Maria Rita. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: Modulation of myeloperoxidase activity. **Cell Biochemistry and Function**, [*S. l.*], v. 30, n. 7, p. 604–610, 2012. DOI: 10.1002/cbf.2840.

DEAN, Joseph W. et al. Innate inflammation drives NK cell activation to impair Treg activity. **Journal of Autoimmunity**, [*S. l.*], v. 108, 2020. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102417.

DESAI, Minal et al. The variable number of tandem repeats upstream of the insulin gene is a susceptibility locus for latent autoimmune diabetes in adults. **Diabetes**, [*S. l.*], v. 55, n. 6, p. 1890–1894, 2006. DOI: 10.2337/db06-0089.

DIMEGLIO, Linda A.; EVANS-MOLINA, Carmella; ORAM, Richard A. Type 1 Diabetes. HHS Public Access. **Lancet (London, England)**, [*S. l.*], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.Type.

DOOLEY, Kelly E.; CHAISSON, Richard E. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics Kelly. **Lancet Infect. Ds.**, [*S. l.*], v. 9, n. 12, p. 737–746, 2010. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70282-8.Tuberculosis.

DOS SANTOS, D. P. et al. Individual variation is the key to the development of a vaccine against staphylococcus aureus: A comparative study between mice lineages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [*S. l.*], v. 51, n. 5, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1590/1414-431X20186773.

DOS SANTOS, Denisar Palmito; GALANTINI, Maria Poliana Leite; RIBEIRO, Israel Souza; MUNIZ, Igor Pereira Ribeiro; PEREIRA, Italo Sousa; DA SILVA, Robson Amaro Augusto. Photoactivated resveratrol controls intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in mice: a pilot study. **Lasers in Medical Science**, [S. l.], 2020. a. DOI: 10.1007/s10103-019-02942-x.

DOS SANTOS, Denisar Palmito; LOPES, Diego Patrick Soares; DE MELO CALADO, Stefano Pedro; GONÇALVES, Caroline Vieira; MUNIZ, Igor Pereira Ribeiro; RIBEIRO, Israel Souza; GALANTINI, Maria Poliana Leite; DA SILVA, Robson Amaro Augusto. Efficacy of photoactivated *Myrciaria cauliflora* extract against *Staphylococcus aureus* infection – A pilot study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 191, n. July 2018, p. 107–115, 2019. a. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.12.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.011>.

DOS SANTOS, Denisar Palmito; SOARES LOPES, Diego Patrick; DE MORAES, Ricardo Costa; VIEIRA GONÇALVES, Caroline; PEREIRA ROSA, Luciano; DA SILVA ROSA, Francine Cristina; DA SILVA, Robson Amaro Augusto. Photoactivated resveratrol against *Staphylococcus aureus* infection in mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 25, n. March, p. 227–236, 2019. b. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.005>.

DUNCAN, Bruce Bartholow; COUSIN, Ewerton; NAGHAVI, Mohsen; AFSHIN, Ashkan; FRANÇA, Elisabeth Barboza; PASSOS, Valéria Maria De Azeredo; MALTA, Deborah; NASCIMENTO, Bruno R.; SCHMIDT, Maria Inês. The burden of diabetes and hyperglycemia in Brazil: A global burden of disease study 2017. **Population Health Metrics**, [S. l.], v. 18, n. Suppl 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1186/s12963-020-00209-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12963-020-00209-0>.

EGAWA, Gyohei; ROEDIGER, Ben; TAY, Szun S.; CAVANAGH, Lois; GUY, Tom; BRZOSKA, Anthony J.; FIRTH, Neville; WENINGER, Wolfgang. Bacterial antigen is directly delivered to the draining lymph nodes and activates CD8 + T cells during *Staphylococcus aureus* skin infection . **Immunology & Cell Biology**, [S. l.], p. 0–2, 2020. DOI: 10.1111/imcb.12410.

EGUNSOLA, Oluwaseun; CLEMENT, Fiona; TAPLIN, John; MASTIKHINA, Liza; LI, Joyce W.; LORENZETTI, Diane L.; DOWSETT, Laura E.; NOSEWORTHY, Tom. Immunogenicity and Safety of Reduced-Dose Intradermal vs Intramuscular Influenza Vaccines: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA network open**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. e2035693, 2021. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.35693.

EIZIRIK, Décio L.; COLLI, Maikel L.; ORTIS, Fernanda. The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, 2009. DOI: 10.1038/nrendo.2009.21.

FENINI, Gabriele; CONTASSOT, Emmanuel; FRENCH, Lars E. Potential of IL-1, IL-18 and inflammasome inhibition for the treatment of inflammatory skin diseases. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 8, n. MAY, p. 1–20, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00278.

FORAY, Anne Perrine; DIETRICH, Céline; PECQUET, Coralie; MACHAVOINE, François; CHATENOUD, Lucienne; LEITE-DE-MORAES, Maria. IL-4 and IL-17 Are Required for House Dust Mite-Driven Airway Hyperresponsiveness in Autoimmune Diabetes-Prone Non-Obese Diabetic Mice. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2020.595003.

FOURNIER, Bénédicte. **The function of TLR2 during staphylococcal diseases**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2013. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00167.

GIRI, Biplab; DEY, Sananda; DAS, Tanaya; SARKAR, Mrinmoy; BANERJEE, Jhimli; DASH, Sandeep

Kumar. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.157.

GOMES, Laura et al. Current epidemiology of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: a national multicenter study in Brazil. **BMC Public Health**, [S. l.], p. 1–9, 2018. DOI: 10.1186/s12889-018-5859-x. Disponível em: <https://bmcpublihealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-018-5859-x>.

GREEN, Laura C.; WAGNER, David A.; GLOGOWSKI, Joseph; SKIPPER, Paul L.; WISHNOK, John S.; TANNENBAUM, Steven R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.

GRIECO, Fabio Arturo et al. MicroRNAs miR-23a-3p, miR-23b-3p, and miR-149-5p regulate the expression of proapoptotic bcl-2 only proteins DP5 and PUMA in human pancreatic β -cells. **Diabetes**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 100–112, 2017. DOI: 10.2337/db16-0592.

GU, Chunfang; WU, Ling; LI, Xiaoxia. **IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling**. **Cytokine**, 2013. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.07.022.

GUERRA, Fermin E.; BORGOGNA, Timothy R.; PATEL, Delisha M.; SWARD, Eli W.; VOYICH, Jovanka M. Epic immune battles of history: Neutrophils vs. Staphylococcus aureus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. JUN, p. 1–19, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00286.

HAMBLIN, Michael R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**. Elsevier Ltd, , 2016. DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008.

HARDING, Jessica L.; PAVKOV, Meda E.; MAGLIANO, Dianna J.; SHAW, Jonathan E.; GREGG, Edward W. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. **Diabetologia**. Springer Verlag, , 2019. DOI: 10.1007/s00125-018-4711-2.

HEIM, Cortney E.; VIDLAK, Debbie; KIELIAN, Tammy. Interleukin-10 production by myeloid-derived suppressor cells contributes to bacterial persistence during Staphylococcus aureus orthopedic biofilm infection . **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 1003–1013, 2015. DOI: 10.1189/jlb.4vma0315-125rr.

HORIKAWA, Tsuneki; HIRAMOTO, Keiichi; GOTO, Kenji; SEKIJIMA, Hidehisa; OOI, Kazuya. Differences in the mechanism of type 1 and type 2 diabetes-induced skin dryness by using model mice. **International Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 474–481, 2020. DOI: 10.7150/ijms.50764.

HOSSEINI, Arezoo; GHARIBI, Tohid; MAROFI, Farooq; BABALOO, Zohreh; BARADARAN, Behzad. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. **International Immunopharmacology** Elsevier B.V., , 2020. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106221.

HUANG, Liyi; SZEWCZYK, Grzegorz; SARNA, Tadeusz; HAMBLIN, Michael R. Potassium Iodide Potentiates Broad-Spectrum Antimicrobial Photodynamic Inactivation Using Photofrin. **ACS Infectious Diseases**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 320–328, 2017. DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00004.

HUANG, Ying Ying; RAJDA, Paweł J.; SZEWCZYK, Grzegorz; BHAYANA, Brijesh; CHIANG, Long Y.; SARNA, Tadeusz; HAMBLIN, Michael R. Sodium nitrite potentiates antimicrobial photodynamic

inactivation: possible involvement of peroxy-nitrate. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 505–515, 2019. DOI: 10.1039/C8PP00452H.

HUANG, Zhen; PEI, Xiyan; GRAVES, Dana T. **The Interrelationship Between Diabetes, IL-17 and Bone Loss**. **Current Osteoporosis Reports**. Springer, , 2020. DOI: 10.1007/s11914-020-00559-6.

JAFAR, Nagham; EDRISS, Hawa; NUGENT, Kenneth. The effect of short-term hyperglycemia on the innate immune system. **American Journal of the Medical Sciences**. Elsevier B.V., , 2016. DOI: 10.1016/j.amjms.2015.11.011.

JAÏDANE, H.; SANÉ, F.; HIAR, R.; GOFFARD, A.; GHARBI, J.; GEENEN, V.; HOBER, D. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: Enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. **Clinical and Experimental Immunology**, 2012. a. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04558.x.

JAÏDANE, Hela et al. Persistent Infection of Thymic Epithelial Cells with Cocksackievirus B4 Results in Decreased Expression of Type 2 Insulin-Like Growth Factor. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 86, n. 20, p. 11151–11162, 2012. b. DOI: 10.1128/jvi.00726-12.

JAKIMIUK, Katarzyna; GESEK, Jakub; ATANASOV, Atanas G.; TOMCZYK, Michał. Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. Taylor and Francis Ltd., , 2021. DOI: 10.1080/14756366.2021.1927006.

JANSEN, Kathrin U.; KNIRSCH, Charles; ANDERSON, Annaliesa S. The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 10–20, 2018. DOI: 10.1038/nm.4465.

JNEID, Joanne; CASSIR, Nadim; SCHULDINER, Sophie; JOURDAN, Nathalie; SOTTO, Albert; LAVIGNE, Jean-Philippe; LA SCOLA, Bernard. Exploring the Microbiota of Diabetic Foot Infections With Culturomics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. August, p. 1–8, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00282. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00282/full>.

JUNHEE SEOK et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 9, p. 3507–3512, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1222878110.

KALKA, Katrin; MERK, Hans; MUKHTAR, Hasan. Photodynamic therapy in dermatology. **Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods**, [S. l.], p. 241–280, 2009. DOI: 10.1007/978-3-540-36693-5_11.

KANEKO, Naoe; KURATA, Mie; YAMAMOTO, Toshihiro; MORIKAWA, Shinnosuke; MASUMOTO, Junya. The role of interleukin-1 in general pathology. **Inflammation and Regeneration** BioMed Central Ltd., , 2019. DOI: 10.1186/s41232-019-0101-5.

KATSAROU, Anastasia; GUDBJÖRNSDOTTIR, Soffia; RAWSHANI, Araz; DABELEA, Dana; BONIFACIO, Ezio; ANDERSON, Barbara J.; JACOBSEN, Laura M.; SCHATZ, Desmond A.; LERNMARK, Ake. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 3, p. 1–18, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.16. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>.

KERNER, W.; BRÜCKEL, J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**. Georg Thieme Verlag, , 2014. DOI: 10.1055/s-0034-1366278.

KHARROUBI, Akram T. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**, [*S. l.*], v. 6, n. 6, p. 850, 2015. DOI: 10.4239/wjd.v6.i6.850.

KHURANA, Amit; TEKULA, Sravani; GODUGU, Chandraiah. Nanoceria suppresses multiple low doses of streptozotocin-induced Type 1 diabetes by inhibition of Nrf2 / NF- κ B pathway and reduction of apoptosis. [*S. l.*], n. Iii, 2018.

KIM, Bhumsoo; FELDMAN, Eva L. Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. **Experimental & molecular medicine**, [*S. l.*], v. 47, n. 3, p. e149, 2015. DOI: 10.1038/emm.2015.3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2015.3>.

KIM, Nak Hyun et al. Toll-like receptor 2 downregulation and cytokine dysregulation predict mortality in patients with Staphylococcus aureus bacteremia. **BMC Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 20, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12879-020-05641-z.

KNIP, Mikael; VIRTANEN, Sm; ÅKERBLÖM, Hk. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. **The American journal of ...**, [*S. l.*], v. 22, p. 1506–1513, 2010. DOI: 10.3945/ajcn.2010.28701C.1506S. Disponível em: <http://ajcn.nutrition.org/content/91/5/1506S.short>.

KRISCHER, Jeffrey P. et al. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. **Diabetologia**, [*S. l.*], v. 58, n. 5, p. 980–987, 2016. DOI: 10.1007/s00125-015-3514-y.The.

KUNZ, Daniel; WIRTH, Jessica; SCULEAN, Anton; EICK, Sigrun. In- vitro-activity of additive application of hydrogen peroxide in antimicrobial photodynamic therapy using LED in the blue spectrum against bacteria and biofilm associated with periodontal disease. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [*S. l.*], v. 26, n. February, p. 306–312, 2019. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.015>.

KWIATKOWSKI, Stanisław et al. **Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.

LAARMAN, Alexander; MILDNER, Fin; VAN STRIJP, Jos; ROOIJAKKERS, Suzan. **Complement inhibition by gram-positive pathogens: Molecular mechanisms and therapeutic implications. Journal of Molecular Medicine**, 2010. DOI: 10.1007/s00109-009-0572-y.

LACY, Mary E.; GILSANZ, Paola; KARTER, Andrew J.; QUESENBERRY, Charles P.; PLETCHER, Mark J.; WHITMER, Rachel A. Long-term glycemic control and dementia risk in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, [*S. l.*], v. 41, n. 11, p. 2339–2345, 2018. DOI: 10.2337/dc18-0073.

LEBOUX, Romain J. T.; SCHIPPER, Pim; VAN CAPEL, Toni M. M.; KONG, Lily; VAN DER MAADEN, Koen; KROS, Alexander; JISKOOT, Wim; DE JONG, Esther C.; BOUWSTRA, Joke A. Antigen Uptake After Intradermal Microinjection Depends on Antigen Nature and Formulation, but Not on Injection Depth. **Frontiers in Allergy**, [*S. l.*], v. 2, 2021. DOI: 10.3389/falgy.2021.642788.

LEE, Andie S.; DE LENCASTRE, Herminia; GARAU, Javier; KLUYTMANS, Jan; MALHOTRA-KUMAR, Surbhi; PESCHEL, Andreas; HARBARTH, Stephan. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Nature Reviews Disease Primers**, [*S. l.*], v. 4, 2018. DOI: 10.1038/nrdp.2018.33.

LEECH, John M.; LACEY, Keenan A.; MULCAHY, Michelle E.; MEDINA, Eva; MCLOUGHLIN, Rachel

M. IL-10 Plays Opposing Roles during Staphylococcus aureus Systemic and Localized Infections . **The Journal of Immunology**, [*S. l.*], v. 198, n. 6, p. 2352–2365, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1601018.

LI, Qiang; YIN, Yating; ZHENG, Yuqing; CHEN, Feifei; JIN, Peisheng. Inhibition of autophagy promoted high glucose/ROS-mediated apoptosis in ADSCs 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. **Stem Cell Research and Therapy**, [*S. l.*], v. 9, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s13287-018-1029-4.

LISBETH, Lund Drozd; INGMER, Hanne; FRØKIÆR, Hanne. D-alanylation of teichoic acids and loss of poly-N-acetyl glucosamine in Staphylococcus aureus during exponential growth phase enhance IL-12 production in murine dendritic cells. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, p. 1–20, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0149092.

LLOR, Carl; BJERRUM, Lars. Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. **Therapeutic Advances in Drug Safety**, [*S. l.*], v. 5, n. 6, p. 229–241, 2014. DOI: 10.1177/2042098614554919.

LONGO, Raffaella; PERI, Carolina; CRICRÌ, Dalma; COPPI, Lara; CARUSO, Donatella; MITRO, Nico; DE FABIANI, Emma; CRESTANI, Maurizio. **Ketogenic diet: A new light shining on old but gold biochemistry**. **Nutrients**MDPI AG, , 2019. DOI: 10.3390/nu11102497.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. **Understanding the mechanism of IL-1 β secretion**. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2011. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.

LU, Xiya; ZHAO, Cuimei. Exercise and Type 1 Diabetes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [*S. l.*], v. 1228, n. 107, p. 107–121, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-1792-1_7.

MACKOVA, Katerina; DA CUNHA, Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori; KROFTA, Ladislav; ALBERSEN, Maarten; DEPREST, Jan. The importance of developing relevant animal models to assess existing and new materials. **Current Opinion in Urology**, [*S. l.*], v. 29, n. 4, p. 400–406, 2019. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000625.

MALGRANGE, D. Physiopathology of the diabetic foot [French] Physiopathologie du pied diabetique. **Revue de Medecine Interne**, [*S. l.*], v. 29, n. SUPPL. 2, p. S231–S237, 2008.

MANANDHAR, Sarita; SINGH, Anjana; VARMA, Ajit; PANDEY, Shanti; SHRIVASTAVA, Neeraj. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by staphylococcal clinical isolates. **BMC Research Notes**, [*S. l.*], p. 4–9, 2018. DOI: 10.1186/s13104-018-3820-9. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1186/s13104-018-3820-9?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=MKEF_USG_Researcher_inbound.

MANUEL, Clarence R.; HAEUSLER, Rebecca A. **Insulin-stimulated lipogenesis gets an epigenetic makeover**. **Journal of Clinical Investigation**American Society for Clinical Investigation, , 2020. DOI: 10.1172/JCI137050.

MARCHITTO, Mark C. et al. Clonal V γ 6+V δ 4+ T cells promote IL-17–mediated immunity against Staphylococcus aureus skin infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*S. l.*], v. 166, n. 22, p. 10917–10926, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1818256116.

MARIUZZA, Roy A.; AGNIHOTRI, Pragati; ORBAN, John. **The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma**. **Journal of Biological Chemistry**American Society for

Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 2020. DOI: 10.1074/jbc.REV119.009411.

MEHROTRA, Purvi; COLLETT, Jason A.; MCKINNEY, Seth D.; STEVENS, Jackson; IVANCIC, Carlie M.; BASILE, David P. IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: Compensatory role of natural killer cells in athymic rats. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, [S. l.], v. 312, n. 3, p. F385–F397, 2017. DOI: 10.1152/ajprenal.00462.2016.

MENNE, Erin N.; SONABEND, Rona Yoffe; MASON, Edward O.; LAMBERTH, Linda B.; HAMMERMAN, Wendy A.; MINARD, Charles G.; KAPLAN, Sheldon L.; HULTEN, Kristina G. Staphylococcus aureus infections in pediatric patients with diabetes mellitus. **Journal of Infection**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 135–141, 2012. DOI: 10.1016/j.jinf.2012.04.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.04.001>.

METZLER, Kathleen D.; FUCHS, Tobias A.; NAUSEEF, William M.; REUMAUX, Dominique; ROESLER, Joachim; SCHULZE, Ilka; WAHN, Volker; PAPAYANNOPOULOS, Venizelos; ZYCHLINSKY, Arturo. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation - implications for innate immunity Metzler Blood 2011.pdf. **Blood Journal**, [S. l.], v. 117, n. 3, p. 953–960, 2011. DOI: 10.1182/blood-2010-06-290171.

MOREY, Mangesh; O'GAORA, Peadar; PANDIT, Abhay; HÉLARY, Christophe. Hyperglycemia acts in synergy with hypoxia to maintain the pro-inflammatory phenotype of macrophages. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 8, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0220577.

MUNIZ, Igor Pereira Ribeiro et al. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin controls intradermal infection by Staphylococcus aureus in mice with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 224, p. 112325, 2021. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112325. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134421002049>.

NAHDI, Arwa M. T. Al; JOHN, Annie; RAZA, Haider. Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic β -Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2017, 2017. DOI: 10.1155/2017/7054272.

NAITO, Tatsuhiko; OKADA, Yukinori. **HLA imputation and its application to genetic and molecular fine-mapping of the MHC region in autoimmune diseases**. **Seminars in Immunopathology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 2022. DOI: 10.1007/s00281-021-00901-9.

NETEA, Mihai G.; SIMON, Anna; VAN DE VEERDONK, Frank; KULLBERG, Bart Jan; VAN DER MEER, Jos W. M.; JOOSTEN, Leo A. B. **IL-1 β processing in host defense: Beyond the inflammasomes**. **PLoS Pathogens**, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000661.

NGUYEN, Quang Tam; FURUYA, Yoichi; ROBERTS, Sean; METZGER, Dennis W. Role of interleukin-12 in protection against pulmonary infection with Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 59, n. 10, p. 6308–6316, 2015. DOI: 10.1128/AAC.00968-15.

NIE, Lulingxiao; ZHAO, Peng Fei; YUE, Ziqi; ZHANG, Peng; JI, Ning; CHEN, Qianming; WANG, Qi. Diabetes induces macrophage dysfunction through cytoplasmic dsDNA/AIM2 associated pyroptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 110, n. 3, p. 497–510, 2021. DOI: 10.1002/JLB.3MA0321-745R.

NISHISAKA, Nobuyasu; MORSE, Philo; JONES, Richard F.; WANG, Ching Y.; HAAS, Gabriel P. Murine Animal Model. *Em: [s.l: s.n.]*. v. 53p. 251–264. DOI: 10.1385/1-59259-144-2:255.

OCHOA, T. J.; MOHR, J.; WANGER, A; MURPHY, J. R.; HERESI, G. P. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric patients. **Emerg Infect Dis.**, [*S. l.*], v. 11, n. 6, p. 966–968, 2005. Disponível em: c:%5CKarsten%5CPDFs%5CStaphylokokken-PDFs%5CStaph-2005%5COchoa et al.-Community-associated Methicillin-resistant S.aureus in Pediatric Patients.pdf.

ORESKOVIC, Zrinka; NECHVATALOVA, Katerina; KREJCI, Josef; KUMMER, Vladimir; FALDYNA, Martin. Aspects of intradermal immunization with different adjuvants: The role of dendritic cells and Th1/Th2 response. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 14, n. 2, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0211896.

ORIANO, Martina et al. Sputum neutrophil elastase associates with microbiota and *Pseudomonas aeruginosa* in bronchiectasis. **European Respiratory Journal**, [*S. l.*], v. 56, n. 4, 2020. DOI: 10.1183/13993003.00769-2020.

OUYANG, Wenjun; RUTZ, Sascha; CRELLIN, Natasha K.; VALDEZ, Patricia A.; HYMOWITZ, Sarah G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, [*S. l.*], v. 29, p. 71–109, 2011. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312.

PAPAYANNOPOULOS, Venizelos; METZLER, Kathleen D.; HAKKIM, Abdul; ZYCHLINSKY, Arturo. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, [*S. l.*], v. 191, n. 3, p. 677–691, 2010. DOI: 10.1083/jcb.201006052.

PASCHOU, Stavroula A.; PAPADOPOULOU-MARKETOU, Nektaria; CHROUSOS, George P.; KANAKA-GANTENBEIN, Christina. **On type 1 diabetes mellitus pathogenesis**. **Endocrine Connections**BioScientifica Ltd., , 2018. DOI: 10.1530/EC-17-0347.

PATTERSON, Chris; GUARIGUATA, Leonor; DAHLQUIST, Gisela; SOLTÉSZ, Gyula; OGLE, Graham; SILINK, Martin. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [*S. l.*], v. 103, n. 2, p. 161–175, 2014. DOI: 10.1016/j.diabres.2013.11.005.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiol Rev**, [*S. l.*], v. 98, p. 2133–2223, 2018. DOI: 10.1152/physrev. Disponível em: www.prv.org.

PETTUS, Jeremy et al. Effect of a glucagon receptor antibody (REMD-477) in Type 1 Diabetes: A randomized controlled trial. **Diabetes Obes Metab**, [*S. l.*], p. 1–27, 2018. DOI: 10.1002/jbmr.3081.

PHIFER-RIXEY, Megan; NACHMAN, Michael W. THE NATURAL HISTORY OF MODEL ORGANISMS Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. **eLife**, [*S. l.*], 2015. DOI: 10.7554/eLife.05959.001.

PRAZMO, Ewa J.; KWASNY, Mirosław; LAPINSKI, Mariusz; MIELCZAREK, Agnieszka. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used. **Adv. Clin. Exp. Med.**, [*S. l.*], v. 25, n. 4, p. 799–807, 2016. DOI: 10.17219/acem/32488.

PROCTOR, Richard A. Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? **Vaccine**, [*S. l.*], v. 30, n. 19, p. 2921–2927, 2012. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.11.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.006>.

PUTNAM, Nicole E.; FULBRIGHT, Laura E.; CURRY, Jacob M.; FORD, Caleb A.; PETRONGLO, Jenna R.; HENDRIX, Andrew S.; CASSAT, James E. MyD88 and IL-1R signaling drive antibacterial immunity and osteoclast-driven bone loss during *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. [s.l.: s.n.]. v. 15 DOI: 10.1371/journal.ppat.1007744.

REDONDO, Maria J.; JEFFREY, Joy; FAIN, Pamela R.; EISENBARTH, George S.; ORBAN, Tihamer. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. **The New England journal of medicine**, [S. l.], v. 359, n. 26, p. 2849–50, 2008. DOI: 10.1056/NEJMc0805398. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109586>.

RESTREPO, Blanca I.; TWAHIRWA, Marcel; RAHBAR, Mohammad H.; SCHLESINGER, Larry S. Phagocytosis via complement or Fc-gamma receptors is compromised in monocytes from type 2 diabetes patients with chronic hyperglycemia. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 3, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0092977.

REYNISSON, Birker; ALVAREZ, Bruno; PAUL, Sinu; PETERS, Bjoern; NIELSEN, Morten. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 48, n. W1, p. W449–W454, 2021. DOI: 10.1093/NAR/GKAA379.

RIBEIRO, Israel S. et al. Association between body composition and inflammation: A central role of IL-17 and IL-10 in diabetic and hypertensive elderly women. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 127, n. February, p. 110734, 2019. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110734. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110734>.

ROSALES, Carlos. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types?. **Frontiers in Physiology**. Frontiers Media S.A., , 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.00113.

ROSE, Warren E. et al. Increased Endovascular *Staphylococcus aureus* Inoculum Is the Link between Elevated Serum Interleukin 10 Concentrations and Mortality in Patients with Bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 64, n. 10, p. 1406–1412, 2017. DOI: 10.1093/cid/cix157.

SAKIMA, Vinicius Tatsuyuji; BARBUGLI, Paula Aboud; CERRI, Paulo Sérgio; CHORILLI, Marlus; CARMELLO, Juliana Cabrini; PAVARINA, Ana Cláudia; DE OLIVEIRA MIMA, Ewerton Garcia. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by curcumin-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 8, 2018. DOI: 10.3390/molecules23082075.

SANITÁ, Paula Volpato; PAVARINA, Ana Cláudia; DOVIGO, Livia Nordi; RIBEIRO, Ana Paula Dias; ANDRADE, Mariana Carvalho; MIMA, Ewerton Garcia De Oliveira. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. **Lasers in Medical Science**, [S. l.], p. 1–9, 2017. DOI: 10.1007/s10103-017-2382-8.

SANTEZI, Carolina; REINA, Bárbara Donadon; DOVIGO, Livia Nordi. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections-A Review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, [S. l.], v. 21, n. January, p. 409–415, 2018. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378256>.

SARAIVA, Margarida; O’GARRA, Anne. **The regulation of IL-10 production by immune cells**. **Nature Reviews Immunology**, 2010. DOI: 10.1038/nri2711.

SARAIVA, Margarida; VIEIRA, Paulo; O’GARRA, Anne. Biology and therapeutic potential of interleukin-

10. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 217, n. 1, 2020. DOI: 10.1084/jem.20190418.

SAYAR, Ferena; CHINIFORUSH, Nasim; BAHADOR, Abbas; ETEMADI, Ardavan; AKHONDI, Nasrin; AZIMI, Changiz. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for elimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm on Laser-Lok titanium discs. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 27, n. July, p. 462–466, 2019. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.07.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.012>.

SCHWARTZ, Franziska A.; LERCHE, Christian J.; CHRISTOPHERSEN, Lars; JENSEN, Peter Østrup; LAULUND, Anne Sofie; WOETMANN, Anders; HØIBY, Niels; MOSER, Claus. Distinct contribution of hyperbaric oxygen therapy to human neutrophil function and antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. **APMIS**, [S. l.], v. 129, n. 9, p. 566–573, 2021. DOI: 10.1111/apm.13164.

SEO, Keun Seok; PARK, Nogi; RUTTER, Jaime K.; PARK, Youngkyung; BAKER, Carol L.; THORNTON, Justin A.; PARK, Joo Youn. Role of Glucose-6-Phosphate in Metabolic Adaptation of *Staphylococcus aureus* in Diabetes. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2021. DOI: 10.1128/spectrum.00857-21.

SHETTIGAR, Kavitha; MURALI, Thokur Sreepathy. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. [S. l.], [s.d.]. DOI: 10.1007/s10096-020-03984-8/Published. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03984-8>.

SHIN, Yoo Seob; JUNG, Chang-Gyu; PARK, Hae-Sim. Prevalence and clinical characteristics of local allergic rhinitis to house dust mites. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], p. 1, 2017. DOI: 10.1097/ACI.0000000000000413. Disponível em: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00130832-900000000-99275>.

SILVA, Maísa; LIMA, Wanderson Geraldo De; SILVA, Marcelo Eustáquio; PEDROSA, Maria Lucia. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 46–53, 2011. DOI: 10.1590/S0004-27302011000100006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302011000100006&lng=pt&tlng=pt.

SIMONSEN, Johan R.; HARJUTSALO, Valma; JÄRVINEN, Asko; KIRVESKARI, Juha; FORSBLOM, Carol; GROOP, Per Henrik; LEHTO, Markku. Bacterial infections in patients with type 1 diabetes: A 14-year follow-up study. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2015. DOI: 10.1136/bmjdr-2014-000067.

SOHAIL, Muhammad; LATIF, Zakia; SOHAIL, Muhammad; LATIF, Zakia. Molecular analysis, biofilm formation, and susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing community- and health care-associated infections in central venous catheters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 603–609, 2018. DOI: 10.1590/0037-8682-0373-2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822018000500603&lng=en&tlng=en.

SÖKMEN, Münevver; AKRAM KHAN, M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, [S. l.], v. 24, n. 2–3, p. 81–86, 2016. DOI: 10.1007/s10787-016-0264-5.

SPAAN, Andrés N.; SUREWAARD, Bas G. J.; NIJLAND, Reindert; VAN STRIJP, Jos A. G. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: A biological tug of war*. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 67, p. 629–650, 2013. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155746.

STEGENGA, Michiel E.; VAN DER CRABBE, Saskia N.; E BLÜ MER, Regje M.; LEVI, Marcel; MEIJERS, Joost C.; SERLIE, Mireille J.; T TANCK, Michael W.; SAUERWEIN, Hans P.; VAN DER POLL, Tom. Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. *[S. l.]*, 2008. DOI: 10.1182/blood-2007. SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res.** *[S. l.]*, p. 536–546, 2001. Disponível em: <http://www.biomed.cas.cz/physiolres/s.htm>Physiol.Res.50:536-546,2001.

TANAKA, Masamitsu et al. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial Arthritis via Neutrophil accumulation. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 7, n. 6, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0039823.

TATULIAN, Suren A. Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling. **Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 54, n. 36, p. 5523–5532, 2015. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00805.

TAVARES, Natalia M. et al. Lutzomyia longipalpis saliva or salivary protein LJM19 protects against Leishmania braziliensis and the saliva of its vector, Lutzomyia intermedia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 5, n. 5, 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001169.

TEKULA, Sravani; KHURANA, Amit; ANCHI, Pratibha; GODUGU, Chandraiah. Withaferin-A attenuates multiple low doses of Streptozotocin (MLD-STZ) induced type 1 diabetes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, *[S. l.]*, v. 106, n. July, p. 1428–1440, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.090. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.090>.

THAMMAVONGSA, Vilasack; KIM, Hwan Keun; MISSIAKAS, Dominique; SCHNEEWIND, Olaf. **Staphylococcal manipulation of host immune responses**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3521.

TIMMERMAN, Kyle L. et al. Insulin stimulates human skeletal muscle protein synthesis via an indirect mechanism involving endothelial-dependent vasodilation and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, *[S. l.]*, v. 95, n. 8, p. 3848–3857, 2010. DOI: 10.1210/jc.2009-2696.

TOKARZ, Victoria L.; MACDONALD, Patrick E.; KLIP, Amira. **The cell biology of systemic insulin function**. **Journal of Cell Biology** Rockefeller University Press, , 2018. DOI: 10.1083/jcb.201802095.

TSAI, Wen Hsuan; YU, Kun Hua; HUANG, Yi Cheng; LEE, Cheng I. EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, *[S. l.]*, v. 13, p. 903–916, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S148305.

TUCHSCHERR, Lorena et al. Staphylococcus aureus requires less virulence to establish an infection in diabetic hosts. **International Journal of Medical Microbiology**, *[S. l.]*, 2018. DOI: 10.1016/j.ijmm.2018.05.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.004>.

UNNIKRISHNAN, Ranjit; ANJANA, Ranjit Mohan; MOHAN, Viswanathan. **Diabetes mellitus and its complications in India**. **Nature Reviews Endocrinology** Nature Publishing Group, , 2016. DOI: 10.1038/nrendo.2016.53.

VANDERSCHULDEN, Anne; LELUBRE, Christophe; RICHARD, Thibault; LALI, Salah Eddine; CHERIFI, Soraya. Outcome of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) bacteremia: impact of diabetes. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, *[S. l.]*, v. 38, n. 12, p. 2215–2220, 2019. DOI: 10.1007/s10096-019-03659-z.

VISKARI, Hanna R. et al. Maternal first-trimester enterovirus infection and future risk of type 1 diabetes in the exposed fetus. **Diabetes**, [*S. l.*], v. 51, n. 8, p. 2568–2571, 2002. DOI: 10.2337/diabetes.51.8.2568.

WANG, Guizhen; GAO, Yawen; WANG, Hongsu; WANG, Jianfeng; NIU, Xiaodi. Phloretin reduces cell injury and inflammation mediated by *Staphylococcus aureus* via targeting sortase B and the molecular mechanism. [*S. l.*], 2018.

WANG, Xiaoting; WONG, Kit; OUYANG, Wenjun; RUTZ, Sascha. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, 2019. DOI: 10.1101/cshperspect.a028548.

WARRIER, Anjali; MAZUMDER, Nirmal; PRABHU, Sudharshan; SATYAMOORTHY, Kapaettu; MURALI, Thokur Sreepathy. **Photodynamic therapy to control microbial biofilms. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** Elsevier B.V., , 2021. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102090.

WELLS, Saran et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Patients With Congenital Heart Disease in the Pediatric Intensive Care Unit. **World J Pediatr Congenit Heart Surg**, [*S. l.*], v. 4, n. 4, p. 344–348, 2013. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.07.004.Enhanced.

WERTHEIM, Heiman F. L.; WALSH, Evelyn; CHOUDHURRY, Roos; MELLE, Damian C.; BOELEN, Hélène A. M.; MIAJLOVIC, Helen; VERBRUGH, Henri A.; FOSTER, Timothy; VAN BELKUM, Alex. Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. **PLoS Medicine**, [*S. l.*], v. 5, n. 1, p. 0104–0112, 2008. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050017.

WONG, Tak Wah; WU, En Chi; KO, Wen Chien; LEE, Ching Chi; HOR, Lien I.; HUANG, I. Hsiu. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by indocyanine green and near infrared light. **Dermatologica Sinica**, [*S. l.*], v. 36, n. 1, p. 8–15, 2018. DOI: 10.1016/j.dsi.2017.08.003.

WU, Juan; MOU, Haijin; XUE, Changhu; LEUNG, Albert Wingnan; XU, Chuanshan; TANG, Qing Juan. Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [*S. l.*], v. 15, p. 34–39, 2016. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.05.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.05.004>.

WU, Shi; HUANG, Jiahui; WU, Qingping; ZHANG, Feng; ZHANG, Jumei; LEI, Tao; CHEN, Moutong; DING, Yu; XUE, Liang. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from retail vegetables in China. **Frontiers in Microbiology**, [*S. l.*], v. 9, n. JUN, p. 1–10, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01263.

WU, Xuan; ZHANG, Yunpeng; XING, Yixiao; ZHAO, Bin; ZHOU, Cong; WEN, Yong; XU, Xin. High-fat and high-glucose microenvironment decreases Runx2 and TAZ expression and inhibits bone regeneration in the mouse. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, [*S. l.*], v. 14, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s13018-019-1084-2.

YAMAGUCHI, Rui; YAMAMOTO, Takatoshi; SAKAMOTO, Arisa; NARAHARA, Shinji; SUGIUCHI, Hiroyuki; YAMAGUCHI, Yasuo. Neutrophil elastase enhances IL-12p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via transactivation of the PAR-2/EGFR/TLR4 signaling pathway. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [*S. l.*], v. 59, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1016/j.bcmd.2016.03.006.

YAMASAKI, Fumi; TAKEUCHI, Seisho; UEHARA, Yoshio; MATSUSHITA, Masahide; ARISE,

Kazumi; MORIMOTO, Norihito; SEO, Hiromi. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community residents of Japan. **Journal of General and Family Medicine**, [S. l.], n. November 2017, p. 77–81, 2018. DOI: 10.1002/jgf2.160. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jgf2.160>.

YAN, Juming; SMYTH, Mark J.; TENG, Michele W. L. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and their conflicting roles in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 10, n. 7, 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a028530.

YARUBE, IU. Nitrate-Induced Oxidative Stress and the Effects of Dietary Antioxidant Vitamins C, E And A: Insights from Experimental and Clinical Studies. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2012. DOI: 10.4314/bajopas.v4i2.14.

YASUDA, Takuwa; URA, Takehiro; TANIGUCHI, Masaru; YOSHIDA, Hisahiro. Intradermal delivery of antigens enhances specific IgG and Diminishes IgE production: Potential use for vaccination and allergy immunotherapy. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 12, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0167952.

YI, XIAO; KUI, ZHANG; SI-YU, ZHU; XIANG-LIANG, DENG; XIAO-YIN, CHEN; NAN-LIN, FU; JIA, CHEN. Shenling Baizhu Powder (参苓白术散) Ameliorates Pi (Spleen)-Deficiency-Induced Functional Diarrhea in Rats. **Chin J Integr Med**, [S. l.], n. 510062, p. 1–6, 2020.

YIMIN; KOHANAWA, Masashi; ZHAO, Songji; OZAKI, Michitaka; HAGA, Sanae; NAN, Guangxian; KUGE, Yuji; TAMAKI, Nagara. Contribution of Toll-Like Receptor 2 to the Innate Response against *Staphylococcus aureus* Infection in Mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0074287.

ZHANG, Na; HUANG, Weihuang; DONG, Fang; LIU, Yang; ZHANG, Baohuan; JING, Lipeng; WANG, Man; YANG, Guang; JING, Chunxia. Insulin gene VNTR polymorphisms –2221MspI and –23HphI are associated with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: a meta-analysis. **Acta Diabetologica**, [S. l.], v. 52, n. 6, p. 1143–1155, 2015. DOI: 10.1007/s00592-015-0805-1.

ZHANG, Xue-song et al. Antibiotic-induced acceleration of type 1 diabetes alters maturation of innate intestinal immunity. **Elife**, [S. l.], v. 7, p. 1–59, 2018. DOI: 10.7554/eLife.37816. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30039798>.

ZHU, Bao Ting. Pathogenic Mechanism of Autoimmune Diabetes Mellitus in Humans: Potential Role of Streptozotocin-Induced Selective Autoimmunity against Human Islet β -Cells. **Cells**, [S. l.], v. 11, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/cells11030492.

ZIPRIS, Danny. Visceral Adipose Tissue: A New Target Organ in Virus-Induced Type 1 Diabetes. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., , 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.702506.

10 Manuscrito publicado diretamente relacionado com a tese

Fator de impacto: 6.252; Qualis: A1

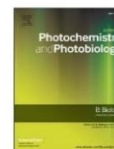
Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 224 (2021) 112325



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol



Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin controls intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in mice with type 1 diabetes mellitus: a pilot study

Igor Pereira Ribeiro Muniz^a, Maria Poliana Leite Galantini^a, Israel Souza Ribeiro^{a,c}, Caroline Vieira Gonçalves^a, Denisar Palmito dos Santos^a, Tatyana Chagas Moura^a, Emely Soares Silva^a, Nathalia Rosa Silva^a, Barbara Porto Cipriano^a, Thiago Macêdo Lopes Correia^a, Telma de Jesus Soares^a, Leandro Martins de Freitas^a, Dirceu Joaquim Costa^b, Robson Amaro Augusto da Silva^{a,*}

^a Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira - Instituto Multidisciplinar em Saúde, Rua Rio de Contas, 58, Bairro Candéias, CEP: 45.029-094 Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

^b Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus Vitória da Conquista, Av. Edmundo Silveira Flores, 27-43 - Lot, Alto da Boa Vista, CEP: 45029-066 Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

^c Universidade Federal do Sul da Bahia, Campus Paulo Freire, 250 Praça Joana Angélica, Bairro São José, 45.988-058, Teixeira de Freitas, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Type 1 diabetes mellitus
Microbiology
Infection treatment
Antimicrobial resistance

ABSTRACT

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is one of the main pathogens that cause infections in diabetic individuals. In this paper, we report the outcomes of our investigation on the intradermal application of antimicrobial photodynamic therapy (PDT) with curcumin in an infection induced by MRSA ATCC 43300 strain in the ear of mice with Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM). A solution containing 100 µg of curcumin was photo-activated *ex vivo* with a LED light (450 nm) delivering a fluency of 13.5 J/cm². This solution was administered in the ear intradermally, at the same inoculum site as the MRSA ATCC 43300 strain (PDT Group). This study also included the use of two control groups (both infected): One was treated with saline and the other was treated with non-photoactivated curcumin. The animals were euthanized 24 h after these treatments and samples of draining lymph node and treated ear were collected for examination. The PDT group showed lower bacterial load in the draining lymph node when compared to the saline and curcumin groups (*p*-value <0.05) 24 h after treatment. In addition to bacterial load, the PDT group presented a higher concentration of nitrates and nitrites in the draining lymph node when compared to the saline and curcumin groups (*p*-value <0.001). Examining the infectious site, despite apparently having similar inflammatory cell recruitment compared with the control groups, the PDT group showed a profile with less intense activity in the myeloperoxidase expression when compared to the saline group (*p*-value <0.001). Additionally, the detected concentration of cytokines such as IL-1β, IL-12, and IL-10 was significantly lower in the PDT group when compared to the saline group (*p*-value <0.01; *p*-value <0.05; *p*-value <0.05, respectively), thus presenting a less intense inflammatory response during infection resolution. Our pilot study showed for the first time the therapeutic potential of PDT using curcumin when administered intradermally in the treatment of infections caused by *S. aureus* in mice with T1DM.

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune chronic non-communicable disease. The autoimmune reaction causes the destruction of beta cells in the pancreatic islets and, consequently, the loss of the

ability to produce insulin. In this setting, symptoms such as hyperglycemia and loss of lean mass are displayed [1].

Different physiological systems are affected due to changes caused by the T1DM [2–4], among them, the immune system [5,6]. Under these circumstances, several cellular mechanisms involved, both with innate

* Corresponding author.

E-mail address: ramaro@ufba.br (R.A.A. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112325>

Received 4 March 2021; Received in revised form 16 September 2021; Accepted 20 September 2021

Available online 23 September 2021

1011-1344/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

and acquired immunity are modified because of the metabolic changes arising from T1DM [7,8]. Taking these conditions into account, several studies have indicated that individuals, who have this condition, are part of a risk group with high chances for the appearance of infectious diseases [9].

Due to increased susceptibility to infectious diseases, individuals with T1DM have an increased risk of skin and respiratory tract infections, endocarditis, bacteremia and diabetic foot. [10]. A major pathogen that causes the aforementioned conditions in diabetic individuals is the gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [11–13]. Nowadays, one of the biggest problems in the treatment of infections caused by this pathogen is antimicrobial resistance, where the strain *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) has been widely distributed worldwide, representing a serious public health issue [14].

Therefore, alternatives such as antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), appear as possible tools for the treatment of infections. The aPDT is based on the photoreaction that occurs when a photosensitizer (PS) absorbs a light source at the appropriate wavelength which can produce reactive oxygen species (ROS). The ROS production occurs through two different mechanisms, the type I and type II mechanisms. In the type I mechanism, the excited PS interacts with cellular compounds such as lipid and proteins producing free radicals and generating the superoxide anion as a final product. In the type II mechanism, the excited PS interacts directly with molecular oxygen producing singlet oxygen, which has great oxidizing power [15,16]. That way, with the production of ROS, this technique can be used to control microorganisms such as bacteria.

Curcumin, a polyphenolic constituent derived from *Curcuma longa* has been used as a PS in several *in vivo* and *in vitro* studies that assess the efficiency of various aPDT protocols [17–20]. This photosensitizer has been used in several studies, and besides coming from a natural source, it does not present cytotoxicity in low levels exhibiting characteristics of a compound that can be properly used as a photosensitizer for the application of PDT [21].

In vivo models using animals have a reliable value due to results that can be observed in the experimentation, and in our current scenario, studies regarding the response in physiological processes of animal models with T1DM using aPDT as an infection treatment are very scarce. Due to this issue, our study had as goal to verify physiological responses caused by an aPDT-curcumin protocol applied in mice with streptozotocin-induced T1DM intradermally infected with *S. aureus* in the ear.

2. Material and methods

2.1. Bacterial load

ATCC 43300 MRSA strain was acquired in the collection of the Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brazil). For bacterial culture, the strain was plated, within the laminar flow (Prolab, São Paulo, Brazil), on BHI agar (Brain Heart Infusion, pH 7.4, HIMEDIA), and then taken to the BOD incubator (Prolab, São Paulo, Brazil) at 37 °C for 24 h.

After culture, bacterial load was determined by spectrophotometry. For this procedure, in laminar flow, a suspension containing about 3 to 5 bacterial colonies of *S. aureus* were held in 1 mL of sterile saline. Then an aliquot suspension was transferred to a quartz cuvette for use in the spectrophotometer (Prolab, São Paulo, Brazil). In this step, some parameters were monitored such as: reading absorbance of 0.135 on the 660 nm spectrum [0.5 on the McFarland scale, which is equivalent to 1.5×10^8 colony forming units (CFU's) of *S. aureus*.

2.2. Animals

C57Bl/6 mice with six to eight weeks old came from the vivarium of

the Universidade Federal da Bahia – Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira. The animals were kept under controlled temperature conditions (22 °C) with free access to water and food, except during the period of T1DM induction. All procedures involving the use of animals were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) IMS-CAT UFBA, under protocol number 064/2018. The bacterial inoculum was held during experimentation using the intradermal ear infection model [22].

2.3. T1DM induction protocol

For the induction of T1DM, the model utilizing streptozotocin (STZ) was adopted [23,24]. Mice spent 12 h fasting before administration of STZ and then received intraperitoneally a single dose of a solution of freshly prepared inoculum of 180 mg/kg of STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). All animals involved in this work went through this procedure.

After 5 days of STZ administration, the animals spent 12 h fasting, and then a drop of blood was taken from the tail of each mouse to measure their glycemia with the aid of a glucometer Accu-Chek Active (Accu-Chek, Santos André, São Paulo, Brazil). Animals with blood glucose >380 mg/dL were considered diabetic and included in this study.

2.4. Experimental design

Fifteen days after T1DM induction, all animals were infected by intradermal route in the left ear with the amount of 10^7 CFU's of *S. aureus* MRSA 43300. For the establishment of the infection, the animals were monitored for 24 h, so that the suitable treatments could be conducted.

After infection, animals ($n = 15$) were divided into 3 groups ($n = 5$ per group). For the control group, 10 μ L of sterile saline solution (Vita e Saúde, São Paulo, Brazil) were inoculated at the infection site. The control group for the photosensitizer received 10 μ L of a curcumin solution containing 100 μ g of the compound however, this group was not treated with light. PDT group received 10 μ L of a curcumin solution containing 100 μ g of the compound. Before the solution administration, curcumin was photoactivated with blue LED light (450 nm), through the prototype number 1.012960 (MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brazil). After photoactivation, the solution was rapidly inoculated at the infection site.

The irradiation was carried through over 180 s, with an intensity of 75 mW/cm² and fluency of 13.5 J/cm². For the application of light, the equipment was positioned at a distance of 1 cm from the surface of the solution in a microtube. All these steps were performed in a dark environment. Twenty-four hours after the treatment application, the animals were euthanized using a CO₂ gas chamber. The main experimental procedures are illustrated in the diagram (Fig. 1).

2.5. Histopathology

After euthanasia, the left ears were detached and the areas of interest were sectioned. The selected tissues were used to perform histopathology and immunohistochemistry techniques. The tissues were fixed in a Metacarn solution for 24 h, and then processed and embedded in paraffin (Casa Álvarez Material Científico S.A, Madrid, Spain).

Slices with 5 μ m were prepared and then stained using a standard staining protocol with hematoxylin (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) and eosin (EA36, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Twenty image fields were photomicrographed and the morphometric analysis to count the total inflammatory, mononuclear and polymorphonuclear cells were performed with the aid of the Image J software (version 1.50b, National Institute Health, USA).

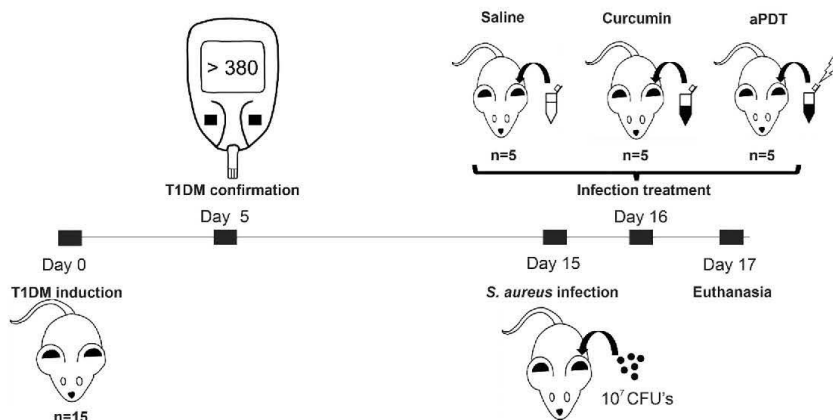


Fig. 1. Diagram showing the timeline of the main experimental design. On day 0, streptozotocin was administered to C57BL/6 mice to induce T1DM; On day 5, blood glucose was measured to confirm T1DM induction; On day 15th, animals were infected in the left ear with 10^7 CFU's of *S. aureus*; After infection, on the 16th day, experimental treatments (saline, curcumin, and aPDT) were performed; 24 h after the treatments, on the 17th day, the animals were euthanized.

2.6. Myeloperoxidase immunohistochemistry

The animals ears previously fixed in Metacarn, were embedded in paraffin (Paraffin Santa Cruz, São Paulo, Brazil), and then we made histological sections ($4 \mu\text{m}$) to prepare the slides for the immunohistochemistry technique. The antibody used to label myeloperoxidase was the MPO, PA5-16672 (Invitrogen™). We deparaffinized the slides in xylol and rehydrated in decreasing degrees of alcohol until they reached the step with distilled water. We performed the antigen retrieval by using the citrate buffer treatment [25].

After the antigenic retrieval, the tissue peroxidase was blocked. For this purpose, we used a solution of hydrogen peroxide (0,3%), sodium azide (0,1%), and distilled water for 10 min at room temperature in a dark environment. After blocking, the slides were washed with PBS-Tween twice for five minutes.

After peroxidase blockage, we blocked tissue proteins by using goat serum (20%). After adding goat serum, we incubated the slides for 30 min, and then we drained off the solution carefully.

After blocking, we added the primary antibody (1, 200) under the samples, which were incubated for 1 h. After this, we performed two washes in PBS-Tween for 5 min. After washing, we added the secondary antibody (1, 100), and we incubated the samples for 45 min.

The samples were washed with PBS twice for five minutes. After washing them, the avidin-biotin complex was added, which was in contact with the samples for 30 min at room temperature. Slides were stained using the DAB Advanced Chromogenic Kit (eBioscience™). Finally, slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated, cleaned and the coverslips were added. Twenty image fields were photomicrographed, and we performed the morphometric analyzes with the aid of the Image J software (version 1.50b, National Institute Health, USA).

2.7. Draining lymph node obtaining

The draining lymph node is responsible for draining the lymphatic flow of an infection site. The lymphatic flow will contain inflammatory mediators produced at the infection site, as well as viable and non-viable bacteria [26,27].

The retromaxillary lymph node was removed and macerated in 1 mL of sterile saline (Vita e Saúde, São Paulo, Brazil). Ten μL of this suspension was grown using the spread plate technique on BHI agar medium and incubated for 24 h at 37°C . After incubation, we quantified

bacterial colonies with the help of a colony counter (CP-600 Plus, Phoenix, USA). The lymph node suspension was used for the total cell counting in a Neubauer chamber, for the analysis of cytokine production using the ELISA technique (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), and nitrite and nitrate dosage.

2.8. Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

A 96-well plate was sensitized with the capture antibody ($100 \mu\text{L}$ / well) being specific for each cytokine. All analyzed cytokine were: IL-1 β , IL-12, IL-17 and IL- 10 (Invitrogen™). The plates were incubated overnight at 4°C .

The next day, we washed the plate with PBS/Tween solution to remove free antibodies, and then we blocked it with ELISA/ELISASPOT 1 \times diluent (ELISA/ELISASPOT, Invitrogen™) ($200 \mu\text{L}$ /well) at room temperature. After the blocking, plates were washed again, and then, we added $100 \mu\text{L}$ /well of the lymph node suspension samples. We incubated the plate overnight at 4°C .

On the third day, the plate was washed with PBS/Tween solution and $100 \mu\text{L}$ /well of detection antibodies were added and incubated at room temperature. After this step, we washed the plate again then $100 \mu\text{L}$ /well of Avidin-HRP conjugate was added and incubated at room temperature. The plate was washed and then incubated with a solution of Tetramethylbenzidine (TMB) ($100 \mu\text{L}$ /well), and the color change pattern was observed. We added the stop reaction solution ($50 \mu\text{L}$ /well), and we measured the colorimetric intensity with an automatic plate reader (ThermoPlate, Michigan, USA) at 450 nm . All procedures were performed according to factory recommendations.

2.9. Quantification of nitrates and nitrites

To quantify nitrites and nitrates, we used the lymph node suspension as a sample. The protocol applied is based on the methodology established by previous work [28] using the Gries reagent. The sample initially reacted with a solution consisting of 1% sulfanilamide (previously diluted in 5% H_3PO_4 solution) for 10 min. After this first reaction, we added a solution of a second reagent composed of N- (1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (0.1%) for 10 min. After the time reaction, we read samples' absorbance on a spectrophotometer (560 nm).

2.10. Statistical analysis

Statistical analyses of the experiments were developed by using the GraphPad Prism software (version 8.0, GraphPad Program Inc., San Diego, CA, USA). To verify the normality of the data, the Shapiro-Wilk test was performed. Parametric (paired *t*-test and ANOVA) and non-parametric (Wilcoxon and Kruskal-Wallis) tests were performed. Tukey's multiple comparisons test (parametric data) and Dunn's multiple comparisons test (non-parametric data) were used as post-hoc. Statistical differences were considered significant at *p* values: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001; **** < 0.0001.

3. Results

3.1. A single dose of STZ administration led to the development of T1DM in C57bl/6 mice

Five days after a single dose of STZ (180 mg/kg) administration, parameters such as weight and blood glucose were measured. As seen in Fig. 2 mice treated with STZ showed higher blood glucose levels, besides presenting weight loss when compared to the previous treatment.

3.2. Photodynamic therapy with curcumin increases oxidative stress during the inflammatory response in T1DM mice infected with *S. aureus*

To estimate if the photodynamic therapy is effective in controlling infection caused by *S. aureus* in T1DM mice, the draining lymph node of the left ear was assessed. In the lymph node culture was possible to note a significant reduction of bacterial load in the group treated with aPDT when compared to all control groups (Fig. 3A).

Proceeding with the lymph node analyzes, we observed that the number of cells in the lymph node was not different among the groups that received different treatments (Fig. 3B) however, the levels of final products of oxidative stress, such as nitrates and nitrites, were increased in the group in which the aPDT was applied (Fig. 3C).

3.3. Photodynamic therapy with curcumin does not change leukocyte recruitment to the inflammation site in diabetic mice infected with *S. aureus*

The recruitment pattern of inflammatory cells was observed through the histopathological analysis of the left ear, where infection and treatment occurred (Fig. 4). The total amount of inflammatory cells recruited to the tissue (Fig. 4A) and differentiated counts were assessed, with the cells being classified into 2 categories according to the shape of their nucleus: Mononuclear (Fig. 4B) and polymorphonuclear (Fig. 4C). With the assessments performed, no difference was observed among the mononuclear and polymorphonuclear cells recruitment pattern in the group that received aPDT when compared to the saline and curcumin

groups.

3.4. Photodynamic therapy with curcumin does not promote increased myeloperoxidase expression at the infection site in diabetic mice infected with *S. aureus*

After all infection treatments, the myeloperoxidase enzyme expression of neutrophils was assessed using immunohistochemistry at the inflammatory site (Fig. 5). It was observed that the group that were treated with aPDT did not show an increase in the presence of MPO in the analyzed tissue area (Fig. 5A) and also did not show an increase in the number of cells that expressed MPO (Fig. 5B).

3.5. The group that received photodynamic therapy with curcumin had decreased expression of cytokines IL-1, IL-12 and IL-10 in the draining lymph node

Using the ELISA technique, IL-1, IL-10, IL-12, and IL-17 production were measured in the draining lymph node suspension (Fig. 6). It was found that aPDT treatment induced a decreased expression of IL-1 (Fig. 6A), IL-10 (Fig. 6B), and IL-12 when compared with saline control group (Fig. 6C). No significant differences were detected in the expression of the cytokine IL-17 (Fig. 6D).

4. Discussion

This study is the first one that investigates the immunomodulatory effects and antibacterial potential of aPDT in the treatment of intradermal infection by *S. aureus* in animals with Type 1 Diabetes Mellitus. The intradermal route is an extremely important route to be assessed, especially when talking about *S. aureus*, which causes several types of infections in this body site. For this reason, this study brings an innovative alternative to study the treatment of skin infections caused by this pathogen in individuals with T1DM.

The development of techniques that will assist conventional treatments, such as antibiotics use, for infection treatments is essential in the current scenario, where there is a difficulty to control several pathogens. Since *S. aureus* is associated with infections that are difficult to control in diabetic individuals, our study assessed the potential of aPDT in controlling this infection and its immunomodulatory potential. Our research group has verified throughout its existence the effect of aPDT applied in the control of different models of infections caused by *S. aureus* [17,18,27,29]. Currently, after all these studies, we have deepened our view seeking the application of this technique in more complex and little-studied models such as the T1DM model.

Previous work carried out by our group showed that the aPDT technique using several compounds, such as PS, significantly reduced the bacterial load found in the draining lymph node [17,18,29]. Based

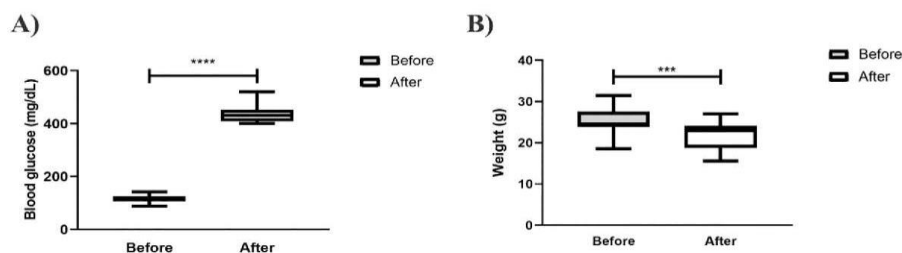


Fig. 2. Protocol for inducing T1DM in C57bl/6 mice with a single dose of STZ (180 mg/kg) - C57BL/6 mice spent 12 h fasting, and then a single dose of STZ was administered. Blood glucose levels were measured, before STZ administration and five days after administration in the same animals (A), besides mice weight was measured when they were fasting, before administration and five days after STZ administration in the same animals (B).

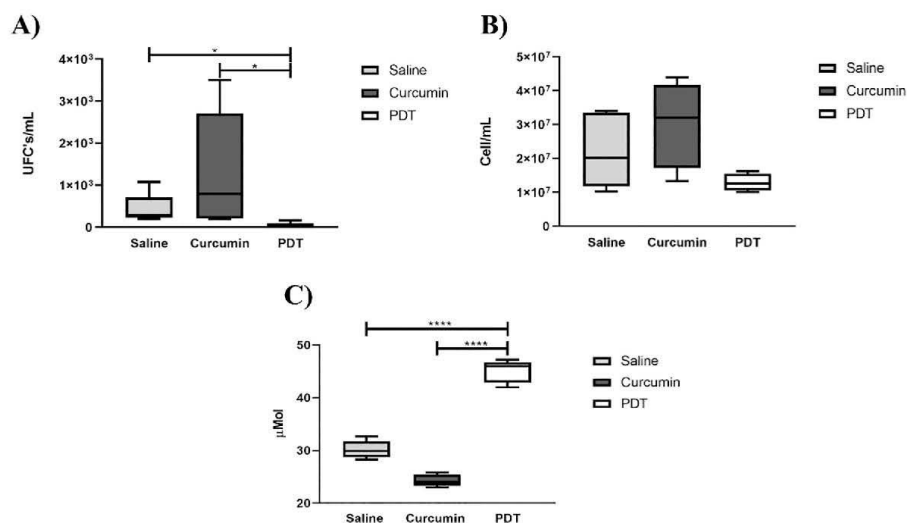


Fig. 3. Evaluation of the effects of photodynamic therapy on the draining lymph node. Animals were euthanized 24 h after experimental treatments and the left retroaxillary lymph node was extracted. In a sterile environment, the lymph node was macerated in 1 mL of sterile saline. The suspension was grown on BHI agar medium for 24 h and then the *S. aureus* colonies were counted (A). With a Neubauer chamber, the eukaryotic cell number in lymph node suspension was verified (B). To verify the oxidative stress levels in the analyzed draining lymph node, we measured nitrates and nitrites in the suspension (C).

on this information as well as the immunological fragility of individuals with T1DM, we found that aPDT using curcumin can also efficiently reduce the bacterial load in the draining lymph node (Fig. 3A).

The effect of aPDT on bacterial load is something that calls our attention and may, in the future, have positive impacts regarding the clinical treatment of infections in humans with T1DM. This result is relevant since this group of individuals has twice the risk of becoming infected when compared to healthy individuals [10].

Since this group of individuals has a higher risk of becoming infected, they make greater use of antibiotics, for prophylaxis many times, which can culminate in the arising of bacterial strains with antibiotic resistance generating greater barriers for the treatment of these infections [10,30,31]. aPDT presents itself as an alternative tool in the treatment of infectious diseases, proving to be efficient in several studies, both with *in vitro* models and, in fewer studies, *in vivo* models [17,18,22,29,32–34]. In any case, the study of this therapy on *in vivo* models for treating infections in diabetics and the immunomodulation exerted by this technique is still unexplored.

Curcumin has already been used in several studies as PS for PDT when this one is activated by blue light, near the 450 nm spectrum, being efficient in controlling bacterial load [17,19,20]. However, none of these studies evaluated the inflammatory response and the efficiency in the use of aPDT protocols with curcumin in the treatment of *S. aureus* infections in a diabetic mouse model.

Nitrates and nitrites are products of the use of nitric oxide (NO), which is used during the oxidative burst in defense of the host by cells such as macrophages and neutrophils [35–37], being one of the main mechanisms used for the control of *S. aureus* [37]. In our work, Fig. 3C shows a significant increase in nitrites and nitrates in the lymph node suspension of group treated with aPDT. In addition, nitrates and nitrites are molecules that can act within the process of oxidative stress, where nitrite can be reduced to become NO again potentiating this way, the production of more free radicals [38].

Some studies have verified in different mouse models, all non-diabetic, the profile of cell recruitment for the site of infection after aPDT, and they show that there is a direction in cell recruitment,

occurring a new balance that culminates with better control of infection [18,27,39]. However, 48 h after infection and, respectively, 24 h after the treatments, despite the aPDT having decreased the bacterial load in mice with T1DM (Fig. 3A), the number of total inflammatory cells (Fig. 4A), mononuclear (Fig. 4B) and polymorphonuclear cells (Fig. 4C) did not differ among the group in which PDT was applied and all the control groups tested.

Although there was no difference between the recruitment of inflammatory cells among the group in which aPDT was applied and all control groups, cells' behavior, like neutrophils activity could be modified in the infection site. One of the possible antimicrobial pathways of action taken by neutrophils is through MPO expression. MPO participates in an enzymatic cascade that results in the production of hypochlorous acid, a potent antimicrobial agent resulting from oxidative stress that is capable to control *S. aureus* infection [40,41].

When we evaluated by immunohistochemistry, both the proportion of cells expressing MPO and the MPO staining area in the tissue (Fig. 5A and Fig. 5B, respectively), it was possible to observe some interesting details. The group in which the aPDT was applied showed the same area of a tissue marking for MPO when compared to the group in which the saline was applied as a treatment, while the group treated only with curcumin showed great expression of this enzyme (Fig. 5A). However, the proportion of cells expressing MPO in the group that received aPDT is lower in comparison to the group that received only saline, and the aPDT group displayed similar expression pattern compared to the curcumin group (Fig. 5B).

These results show that the treatment with aPDT presents a balance not found in the control groups since they were not able to control the infection. The saline group showed an increase in the number of cells expressing MPO, however, that protein was weakly expressed. Meanwhile, the curcumin group, despite not showing an increase in the number of cells expressing MPO, showed a strong expression of this enzyme, which, in any case, was not able to control the infection.

The analysis indicates that aPDT may be stimulating MPO expression without necessarily increasing the neutrophil population at the infection site. Therefore, the treatment applied to the aPDT group led to the

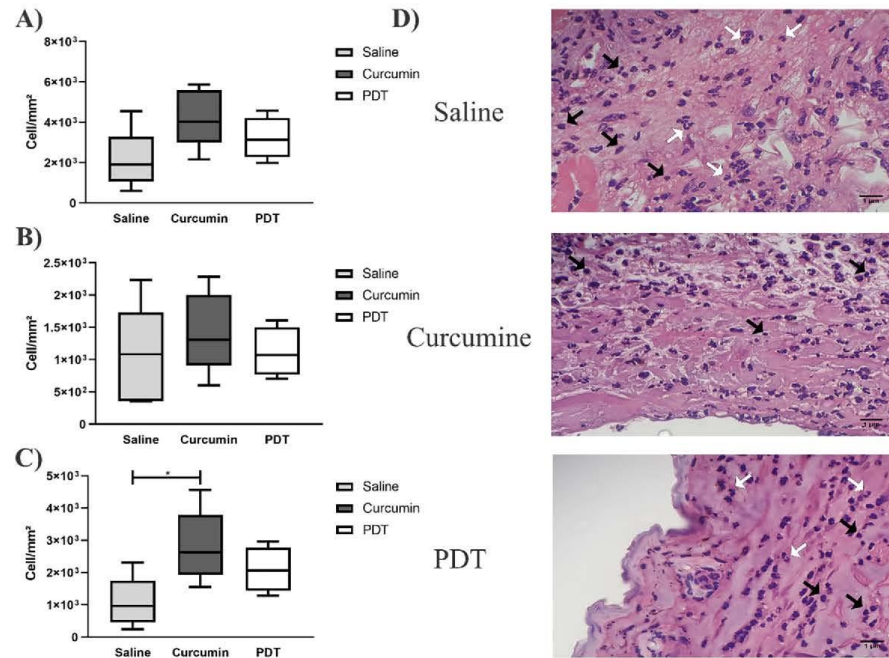


Fig. 4. Ear inflammatory infiltrate evaluation after experimental treatments in slides stained by HE. Animals were euthanized 24 h after experimental treatments and the left ear was collected. We applied histotechnological techniques for tissue fixation and paraffinization. Slides (4 μ m) were made and stained by HE. All slides were observed under a microscope (400x magnification) and about 20 image fields were captured and analyzed. All leukocytes present in the inflammatory infiltrate were counted (A). In addition to the total count, differential counts were made, with the cells being classified according to nuclear morphology into two classes: Mononuclear (B) and polymorphonuclear (C). Representative images of the groups according to the treatment that was applied with black arrows indicating representative mononuclear cells and white arrows indicating representative polymorphonuclear cells (D).

formation of a new balance between the recruitment and activation of neutrophils, which proved to be efficient in mice with T1DM.

Some studies that applied aPDT using various photosensitizers and using other study models assessed MPO expression, showed an increase in the levels of cells expressing MPO in the groups that received aPDT for animals infected with *S. aureus* when compared to their control groups [18,29], which did not happen in our study. However, it is very important to point out that such studies used non-diabetic models which were different from the ones used in our research.

The cellular processes involved in the immune response during infection control, such as cell recruitment and activation, events treated in our work (Figs. 4 and 5, respectively), can be regulated by chemical mediators such as cytokines [42,43]. The draining lymph node receives fluids from the inflammation site. Therefore, the higher the bacterial load in the lesion site, the greater is the number of bacteria that will be drained, as well as cells and cytokine produced during the inflammation that act on the development of adaptive immunity [27,44]. Despite having lower levels of IL-1 in the aPDT group regarding the draining of lymph nodes (Fig. 6A), the recruitment of total inflammatory cells to the infection site in the ear was not decreased (Fig. 4A).

Dos Santos et al. (2019), in an *in vivo* model using C57BL/6 mice, showed that animals infected with *S. aureus* and treated with aPDT using resveratrol as PS, had an increase in the cytokine IL-17. The increase in this cytokine was related to the recruitment and neutrophil activation, which was effective in controlling the infection in this study analysis. However, when we assessed our data on IL-17 levels, we were unable to find any difference between groups. This result could suggest that the mechanisms that occur in our model using mice with T1DM, react in

other ways compared to healthy animals, or by the use of a different PS in aPDT.

In addition to recruitment, the activation of immune cells for phagocytosis and clearance of pathogens, such as *S. aureus*, is extremely important, highlighting the participation of cytokines such as IL-12 in this process. Mononuclear cells, such as Natural Killers (NK) cells and T lymphocytes, can be activated by IL-12, and in response, produce interferon- γ , which can activate macrophages, increasing the efficiency of defense against *S. aureus* [45]. Although IL-12 is identified as a cytokine involved in the activation of immune cells, enhancing the oxidative power [46], in this work, the animals that passed through PDT had lower levels of IL-12 on draining lymph node. This data could be related to the lower bacterial load seen in this body site.

The increase in the production of pro-inflammatory cytokines is described in individuals with T1DM in different stages, with the possibility of being used as biochemical markers for the disease [47]. This chronic increase in pro-inflammatory cytokines levels can result in a state of intense inflammation, being a harmful process to the organism, which can cause injuries and diseases in body sites like the skin [48].

Considering this pro-inflammatory state T1DM, it is shown in Non-obese Diabetic (NOD) mice that eliciting the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, through mechanisms such as exercise, can establish a better balance in glycemic control and immune response [49].

Therefore, thinking about possible future associations with our study, the application of aPDT using curcumin as PS in animals with T1DM, besides controlling the bacterial load, caused a mild production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 and IL-12. This may be of

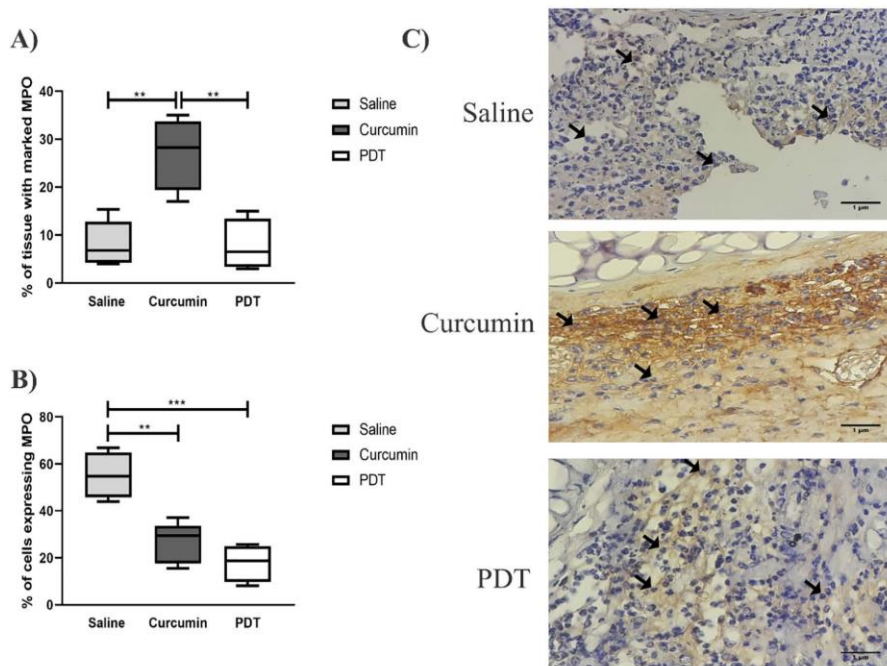


Fig. 5. Myeloperoxidase marking analysis in the ear after treatments. Animals were euthanized 24 h after experimental treatments and the left ear was collected. We applied histotechnological techniques for tissue fixation and paraffinization. Slides (4 μm) were made and targeted for myeloperoxidase marking by immunohistochemistry technique. Slides were observed under a microscope (400 x magnification) and about 20 image fields were captured. Using the Image J analysis software, the entire tissue area that marked the MPO was calculated (A). All marked cells were also counted and then related to the total number of leukocytes present in the tissue (B). Representative images of the groups according to the treatment that was applied with arrows indicating the cells expressing MPO (C).

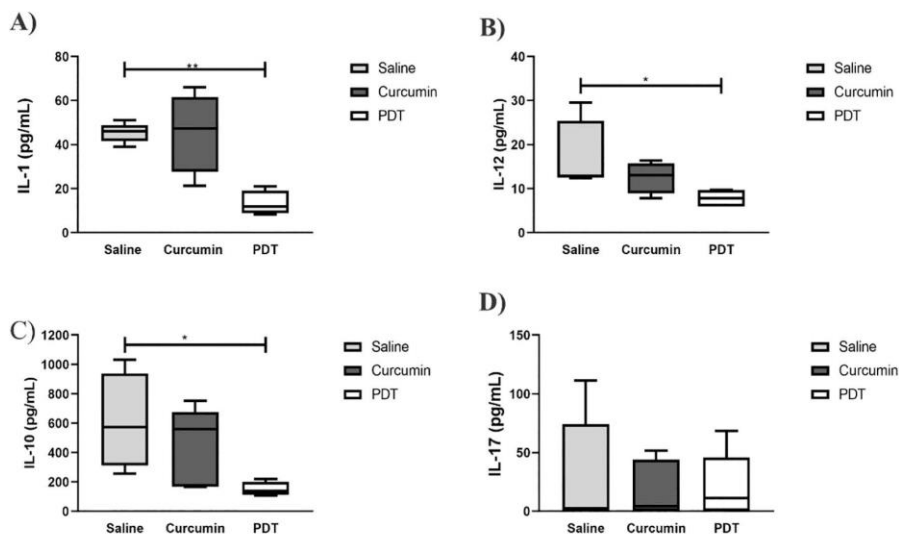


Fig. 6. Cytokines dosage in the draining lymph node after experimental treatments. The draining lymph node from the left ear was removed, macerated in 1 mL of sterile saline, and using the ELISA technique; cytokines were measured, as follows: IL-1 (A); IL-12 (B); IL-10 (C); IL-17 (D).

great interest for future applications since individuals with T1DM have a baseline state of high production of inflammatory mediators [47].

To examine what may have generated the lower production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and IL-12, IL-10 levels, a mediator with an important role in the regulation of pro-inflammatory molecules [50] was measured. Fig. 6D shows a lower IL-10 production in the group that received aPDT. We assume that the direct effects of aPDT by producing reactive species (Fig. 3C) may have been accountable for the clearance of many bacteria at the site of infection in the ear. So, the need to establish an intense inflammatory reaction would be reduced, resulting in less production of pro-inflammatory mediators such as IL-1 and IL-12, and consequently less production of IL-10, since the pro-inflammatory response was mild.

The lower production of IL-10, in this addressed scenario, may be beneficial to the host, since it has been reported that some strains of *S. aureus* are capable of manipulating the increase in IL-10 production as an evasion mechanism from the host immune system [51,52]. High IL-10 levels during infection with this pathogen may be associated with a high mortality rate in individuals with bacteremia [50].

Observing the results of cytokines produced in the group that were treated with PDT, there is a mild inflammatory response when compared to control groups. However, the inflammatory response still occurs, because even though the treatment may have reduced the bacterial load (Fig. 3A), *S. aureus* antigens can be drained, recognized, and trigger an inflammatory response in the lymph node [53].

This paper is the first one to show that aPDT, when applied as a treatment to C57BL/6 mice with STZ-induced T1DM infected intradermally with *S. aureus*, provides physiological responses that culminate in better control of the infection. With our data, it is possible to observe that mice with T1DM when treated with aPDT using curcumin as PS present higher levels of nitrites and nitrates and control of bacterial load up to 48 h after infection.

Our aPDT protocol application, using curcumin (100 µg) being activated *ex vivo* by blue LED (450 nm) with fluency of 13.5 J/cm², was efficient in controlling the bacterial load of *S. aureus* and established a less aggressive inflammatory microenvironment to the host. For these reasons, this is a promising technique for future clinical use. Although bacterial load control has been evidenced, is important to highlight that this is a pilot study that measured the production of only a few inflammatory mediators and used a small number of animals for group experimentation. This way, there is a need for further studies that investigate more mechanisms that can arise during the application of aPDT using curcumin in individuals with T1DM.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This work was supported by the following funding agencies and research support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

References

- D.O.F. Diabetes, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 31 (2008) 55–60, <https://doi.org/10.2337/di08-S055>.
- M.A. Saleh, C. De Miguél, D.I. Stevens, P.K. Carmine, D.M. Pollock, J.S. Pollock, Free radical scavenging decreases endothelin-1 excretion and glomerular albumin permeability during type 1 diabetes, *Phys. Rep.* 4 (2016) 1–9, <https://doi.org/10.14814/phy2.13055>.
- J. Schofield, J. Ho, H. Soran, Cardiovascular Risk in Type 1 Diabetes Mellitus, *Diabetes Ther.* 10 (2019) 773–789, <https://doi.org/10.1007/s13300-019-0612-8>.
- B. Stoniński, J. Myśliwska, M. Ryba-Stanisławowska, M. Skrzypkowska, M. Myśliwiec, Estrogen receptor α gene polymorphism and vascular complications in girls with type 1 diabetes mellitus, *Mol. Cell. Biochem.* 437 (2018) 153–161, <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3103-0>.
- K. Alnek, K. Kisan, K. Heilman, A. Peet, K. Varik, R. Uibo, Increased blood levels of growth factors, proinflammatory cytokines, and Th17 cytokines in patients with newly diagnosed type 1 diabetes, *PLoS One* 10 (2015) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142976>.
- R. Baharlou, A. Ahmadi-Vasmejhani, M.H. Davami, F. Faraji, M.R. Atashzari, F. Karimipour, A. Sadeghi, M.A. Asadi, M. Khoubyari, Elevated levels of T-helper 17-associated cytokines in diabetes Type 1 patients: indicators for following the course of disease, *Immunol. Investig.* 45 (2016) 641–651, <https://doi.org/10.1089/08820139.2016.1197243>.
- B. Ayeleign, M. Negash, M. Genetu, T. Wondmagegn, T. Shibabaw, Immunological impacts of diabetes on the susceptibility of mycobacterium tuberculosis, *J Immunol Res* 2019 (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/6196532>.
- K. Hodgson, J. Morris, T. Bridson, B. Govan, C. Rush, N. Ketheesan, Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections, *Immunology* 144 (2015) 171–185, <https://doi.org/10.1111/imm.12394>.
- I.M. Carey, J.A. Critchley, S. Dewilde, T. Harris, F.J. Hosking, D.G. Cook, Risk of infection in type 1 and type 2 diabetes compared with the general population: a matched cohort study, *Diabetes Care* 41 (2018) 513–521, <https://doi.org/10.2337/dc17-2131>.
- J.R. Simonsen, V. Harjutsalo, A. Järvinen, J. Kirveskari, C. Forsblom, P.H. Groop, M. Lehto, Bacterial infections in patients with type 1 diabetes: a 14-year follow-up study, *BMJ Open Diabetes Res. Care* 3 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2014-000067>.
- C.W. Farnsworth, E.M. Schott, A. Bervie, S.L. Kates, E.M. Schwarz, S.R. Gill, M. J. Zusek, R.A. Mooney, Exacerbated *Staphylococcus aureus* foot infections in obese/diabetic mice are associated with impaired germinal center reactions, Ig class switching, and humoral immunity, *J. Immunol.* 201 (2018) 560–572, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800253>.
- E.M. Menne, R.Y. Sonabend, E.O. Mason, L.B. Lamberth, W.A. Hammerman, C. G. Minard, S.L. Kaplan, K.G. Hulten, *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients with diabetes mellitus, *J. Inf. Secur.* 65 (2012) 135–141, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.04.001>.
- P. Kananzadeh, S.O. Moghadam, Y. Sadeghi, A.R. Foroushani, H. Adibi, M. R. Pourmand, Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from diabetic foot infection, *Iran. J. Pathol.* 14 (2019) 329–337, <https://doi.org/10.30699/IJP.2019.101092.2035>.
- A.S. Lee, H. De Lencastre, J. Garau, J. Nyttmans, S. Malhotra-Kumar, A. Peschel, S. Harbarth, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4 (2018) 1–23, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>.
- B. Mansoori, A. Mohammadi, M. Amin Doustvandi, F. Mohammadnejad, F. Kamari, M.F. Gjerstorff, B. Baradaran, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for cancer: role of natural products, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 26 (2019) 395–404, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.033>.
- R.R. Allison, K. Moghissi, Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms, *Clin. Endosc.* 46 (2013) 24–29, <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>.
- P.P. Almeida, I.S. Pereira, K.B. Rodrigues, L.S. Leal, A.S. Marques, L.P. Rosa, F.C. da Silva, R.A.A. da Silva, Photodynamic therapy controls of *Staphylococcus aureus* intradermal infection in mice, *Lasers Med. Sci.* 32 (2017) 1337–1342, <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2247-1>.
- D.P. dos Santos, D.P.S. Lopes, S.P. de Melo Calado, C.V. Gonçalves, I.P.R. Muniz, I. S. Ribeiro, M.P.L. Galantini, R.A.A. da Silva, Efficacy of photoactivated Myricaria caulliflora extract against *Staphylococcus aureus* infection – A pilot study, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 191 (2019) 107–115, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.011>.
- J. Wu, H. Mou, C. Xue, A.W. Leung, C. Xu, Q.J. Tang, Photodynamic effect of curcumin on *Vibrio parahaemolyticus*, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 15 (2016) 34–39, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.05.004>.
- P.V. Sanitá, A.C. Pavarina, L.M. Dovigo, A.P.D. Ribeiro, M.C. Andrade, E.G.D. O. Mima, Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms, *Lasers Med. Sci.* (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2382-8>.
- H.H. Jha, D. Ghosh, S. Das, A. Anoop, R.S. Jacob, P.K. Singh, N. Ayyagari, I.H. N. Nambhothiri, S.K. Maji, Effect of curcumin analogs on α -synuclein aggregation and cytotoxicity, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–15, <https://doi.org/10.1038/srep28511>.
- D.P. Dos Santos, I.P.R. Muniz, A.F. Queiroz, I.S. Pereira, M.P.A. Souza, L.J. Lima, L. R.O. Sousa, I.S. Ribeiro, M.P.L. Galantini, L.M. Marques, T.B. Figueiredo, R.A.A. Da Silva, Individual variation is the key to the development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*: a comparative study between mice lineages, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 51 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20186773>.
- U. Pannasch, D. Freche, G. Dall'era, G. Ghézali, C. Escartin, P. Ezan, M. Cohen-Salmon, K. Benchenane, V. Abudara, A. Dufour, J.H.R. Lübke, N. Déglon, G. Knott, D. Holzman, N. Rouach, Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion, *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 549–558, <https://doi.org/10.1038/nn.3662>.
- A. Sachin, K.O. Shreeves, V. Divya, Characterization of streptozotocin induced diabetes mellitus in SWISS ALBINO mice, *Glob. J. Pharmacol.* 3 (2009) 81–84, [http://doi.org/gjip/3\(2\)09/5.pdf](http://doi.org/gjip/3(2)09/5.pdf).
- D. Almeida da Silva, T.M. Lopes Correia, R. Pereira, R.A. Augusto da Silva, O. Augusto, R.F. Queiroz, Tempol reduces inflammation and oxidative damage in cigarette smoke-exposed mice by decreasing neutrophil infiltration and activating the Nrf2 pathway, *Chem. Biol. Interact.* 109210 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109210>.

- [26] M. Tozuka, T. Oka, N. Jounai, G. Egawa, K.J. Ishii, K. Kabashima, F. Takeshita, Efficient antigenic delivery to the draining lymph nodes is a key component in the immunogenic pathway of the intradermal vaccine, *J. Dermatol. Sci.* 82 (2016) 38–45, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.11.008>.
- [27] D.P. dos Santos, D.P. Soares Lopes, R.C. de Moraes, C. Vieira Gonçalves, L. Pereira Rosa, F.C. da Silva Rosa, R.A.A. da Silva, Photoactivated resveratrol against *Staphylococcus aureus* infection in mice, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 25 (2019) 227–236, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.005>.
- [28] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 131–138, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X).
- [29] D.P. dos Santos, M.P.L. Galantini, I.S. Ribeiro, I.P.R. Muniz, I.S. Pereira, R.A.A. da Silva, Photoactivated resveratrol controls intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in mice: a pilot study, *Lasers Med. Sci.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02942-x>.
- [30] K.U. Jansen, C. Knirsch, A.S. Anderson, The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance, *Nat. Med.* 24 (2018) 10–20, <https://doi.org/10.1038/nm.4465>.
- [31] C. Ilor, L. Bjerrum, Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem, *Ther. Adv. Drug Saf.* 5 (2014) 229–241, <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>.
- [32] D. Kunz, J. Wirth, A. Seulean, S. Eick, In-vitro-activity of additive application of hydrogen peroxide in antimicrobial photodynamic therapy using LED in the blue spectrum against bacteria and biofilm associated with periodontal disease, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 26 (2019) 306–312, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.015>.
- [33] V.T. Sakima, P.A. Barbugli, P.S. Cerri, M. Chorilli, J.C. Carmello, A.C. Pavarina, E. G. De Oliveira Mima, Antimicrobial photodynamic therapy mediated by curcumin-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis, *Molecules* 23 (2018), <https://doi.org/10.3390/molecules23082075>.
- [34] F. Sayar, N. Chiniforush, A. Bahador, A. Etemadi, N. Akhondi, C. Azimi, Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for elimination of Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm on Laser-Lak titanium discs, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 27 (2019) 462–466, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.012>.
- [35] P.P. Carneiro, J. Conceição, M. Macedo, V. Magalhães, E.M. Carvalho, O. Bacellar, The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis, *PLoS One* 11 (2016) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148084>.
- [36] L.C. Davies, C.M. Rice, E.M. Palmieri, P.R. Taylor, D.B. Kuhns, D.W. McVicar, Peritoneal tissue-resident macrophages are metabolically poised to engage microbes using tissue-niche fuels, *Nat. Commun.* 8 (2017), <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02092-0>.
- [37] W.N. Beavers, E.P. Skaar, Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*, *Pathog. Dis.* 74 (2016) 1–15, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw060>.
- [38] I. Yarube, Nitrate-induced oxidative stress and the effects of dietary antioxidant vitamins C, E and A: insights from experimental and clinical studies, *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 4 (2012), <https://doi.org/10.4314/bajopas.v4i2.14>.
- [39] M. Tanaka, P. Mroz, T. Dai, L. Huang, Y. Morimoto, M. Kinoshita, Y. Yoshihara, K. Nemoto, N. Shinomiya, S. Seki, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial Arthritis via Neutrophil accumulation, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039823>.
- [40] F.E. Guerra, T.R. Borgogna, D.M. Patel, E.W. Sward, J.M. Voyich, Epic immune battles of history: neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 1–19, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00286>.
- [41] N.W.M. De Jong, N.T. Ploscaru, K.X. Ranyar, B.L. Garcia, A.I. Herrera, O. Prakash, B.B. Katz, K.G. Leidal, W.M. Nauseef, K.P.M. Van Kessel, J.A.G. Van Strijp, B. V. Geisbrecht, A structurally dynamic N-terminal region drives function of the staphylococcal peroxidase inhibitor (SPIH), *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 2260–2271, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000134>.
- [42] N.E. Putnam, L.E. Fulbright, J.M. Curry, C.A. Ford, J.R. Petronglo, A.S. Hendrix, J. E. Cassat, MyD88 and IL-1R Signaling Drive Antibacterial Immunity and Osteoclast-driven Bone Loss during *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis, 2019, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007744>.
- [43] P. Mehrotra, J.A. Collett, S.D. McKinney, J. Stevens, C.M. Ivancic, D.P. Basile, IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 312 (2017) F385–F397, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00462.2016>.
- [44] X. Yi, Z. Kui, Z. Si-yu, D. Xiang-Hang, C. Xiao-yin, F. Nan-lin, C. Jia, Shending Baizhu Powder (參苓白朮散) Ameliorates PI (Spleen)-Deficiency-Induced Functional Diarrhea in Rats, *Chin. J. Integr. Med.* (2020) 1–6.
- [45] L.D. Lisbeth, H. Ingmer, H. Frøkiær, D-alanylation of teichoic acids and loss of poly-N-acetyl glucosamine in *Staphylococcus aureus* during exponential growth phase enhance IL-12 production in murine dendritic cells, *PLoS One* 11 (2016) 1–20, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149092>.
- [46] Q.T. Nguyen, Y. Furuya, S. Roberts, D.W. Metzger, Role of interleukin-12 in protection against pulmonary infection with Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 6308–6316, <https://doi.org/10.1128/AAC.00968-15>.
- [47] I.S. Ribeiro, I.S. Pereira, D.P. Santos, D.S. Lopes, A.O. Prado, S.P.M. Calado, C. V. Gonçalves, M.P.L. Galantini, I.P.R. Muniz, G.S. Santos, R.A.A. Silva, Association between body composition and inflammation: a central role of IL-17 and IL-10 in diabetic and hypertensive elderly women, *Exp. Gerontol.* 127 (2019) 110734, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110734>.
- [48] G. Fenini, E. Contassot, L.E. French, Potential of IL-1, IL-18 and inflammasome inhibition for the treatment of inflammatory skin diseases, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 1–20, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00278>.
- [49] R. Coddola, G. Lanzoni, A. Zoso, A. Caumo, A. Montesano, I.M. Terruzzi, C. Ricordi, L. Lazi, L. Invernardi, Moderate intensity training impact on the inflammatory status and glycemic profiles in NOD mice, *J. Diabetes Res.* 2015 (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/737586>.
- [50] W.E. Rose, S.K. Shukla, A.D. Berti, M.S. Hayney, K.M. Henriquez, A. Ranzoni, M. A. Cooper, R.A. Proctor, V. Nizet, G. Sakoulas, Increased endovascular *Staphylococcus aureus* inoculum is the link between elevated serum interleukin 10 concentrations and mortality in patients with bacteremia, *Clin. Infect. Dis.* 64 (2017) 1406–1412, <https://doi.org/10.1093/cid/cix157>.
- [51] J.M. Leech, K.A. Lacey, M.E. Mulcahy, E. Medina, R.M. McLoughlin, IL-10 plays opposing roles during *Staphylococcus aureus* systemic and localized infections, *J. Immunol.* 198 (2017) 2352–2365, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601018>.
- [52] C.E. Heim, D. Vidlak, T. Kielian, Interleukin-10 production by myeloid-derived suppressor cells contributes to bacterial persistence during *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection, *J. Leukoc. Biol.* 98 (2015) 1003–1013, <https://doi.org/10.1189/jlb.4vma0315-125rr>.
- [53] G. Egawa, B. Roediger, S.S. Tay, L. Cavanagh, T. Guy, A.J. Brzoska, N. Firth, W. Weninger, Bacterial antigen is directly delivered to the draining lymph nodes and activates CD8⁺ T cells during *Staphylococcus aureus* skin infection, *Immunol. Cell Biol.* (2020) 2, <https://doi.org/10.1111/imcb.12410>.

11 Manuscritos publicados durante doutoramento não relacionados diretamente com a tese

Fator de impacto:4.032 ;Qualis: A3

Experimental Gerontology 127 (2019) 110734



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero



Association between body composition and inflammation: A central role of IL-17 and IL-10 in diabetic and hypertensive elderly women



Israel S. Ribeiro^{a,b}, Ítalo S. Pereira^a, Denisar P. Santos^a, Danilo S. Lopes^a, Alice O. Prado^a,
Stéfano P.M. Calado^a, Caroline V. Gonçalves^a, Maria P.L. Galantini^a, Igor P.R. Muniz^a,
Gilvanéia S. Santos^a, Robson A.A. Silva^{a,*}

^a Multidisciplinary Institute of Health, Av. Itá Teixeira Campus - Federal University of Bahia, 58 Rio de Contas Street - 17 Block - 58 Lot | Cardeiros, 45.029-094 Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

^b Training Center in Health Sciences, Federal University of Southern Bahia, 58 Joana Angélica Square, São José, 45.988-058, Teixeira de Freitas, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Systemic arterial hypertension
Type 2 diabetes mellitus
Inflammation
Body composition

ABSTRACT

In women, aging is evidenced by physiological hormonal alterations that trigger changes in body composition, emergence of chronic low-grade inflammation, which is an important pre-disposition to the development of chronic diseases such as Systemic Arterial Hypertension (SAH) and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Although it is a strong pro-inflammatory nature disorder, little is known about how body composition interferes with inflammatory markers in diabetic and hypertensive elderly women. Therefore, this study's objective was to evaluate the inflammation in diabetic and hypertensive elderly women, and their association with fat mass. It comprised the evaluation of 144 women aged between 60 and 80 years old, diagnosed with SAH and T2DM, assisted by Family Health Units in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. According to body mass index (BMI), these women were classified as either eutrophic or overweight. In the eutrophic females, the IL-10 / IL-17A ratio was increased when compared to those overweight. In addition, IL-17 correlated negatively with HDL and positively with total cholesterol, LDL, triglycerides, VLDL, and glucose in the eutrophic ones, but not in the overweight individuals. IL-10 also showed differences in the correlation pattern observed between the groups, since for this eutrophic cytokine, it presented positive correlation with the waist circumference, waist/height ratio, and negative association with IL-17, while in overweight elderly women, it was not observed such pattern. Hence, this work demonstrates how the amount of fat mass interferes with the balance of cytokines, especially IL-10 and IL-17, and how it may exert an effect on biochemical parameters and risk factors associated with T2DM and SAH.

1. Introduction

Over the years, the more prevalent comorbidities profile has been altered, changing from a picture wherein infectious diseases were the most representative disorder to a significant increase in chronic non-communicable diseases (NCDs) (Malta et al., 2012; Murray et al., 2015; Bankoff et al., 2017). Among the NCDs, systemic arterial hypertension (SAH) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) stand out as leading the first cause of mortality and hospitalizations (Duncan et al., 2010; Freitas and Garcia, 2012). SAH is a chronic condition of multiple origins, being considered one of the most relevant risk factors related to the development of cardiovascular diseases (Lima et al., 2016). T2DM, on the other hand, consists of a multiple etiology syndrome, resulting of the lack of insulin and/or its incapacity of properly exert its functions, characterized by chronic hyperglycemia and changes in carbohydrates,

lipids, and proteins metabolism (Miranji et al., 2008). Such diseases are strongly related to chronic low-grade inflammation, which is considerably intensified in obese individuals (Carter et al., 2010). It happens due to the fact that, in obese individuals, visceral white adipose tissue is characterized by hypertrophic and hyperplastic adipocytes, with large inflammatory infiltrate of macrophages, endothelial cells activation, and fibrosis (Maury and Brichard, 2010). Tissue-infiltrated macrophages are responsible for proinflammatory cytokines release, such as TNF- α , into the vascular wall (Britton and Fox, 2011). Also, obese individuals exhibit intensified polarization of T helper 1 and T helper 17 cells, culminating in IL-17 release and other proinflammatory cytokines, leading these individuals to present vascular lesion (Harrison et al., 2012; Schiffrin, 2014). In this context, occurs the IL-1 β release, a cytokine straightly related to the development of insulin resistance (Rathinam et al., 2012; Stienstra et al., 2012). Thus, those uncontrolled

* Corresponding author.

E-mail address: ramaro@ufba.br (R.A.A. Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110734>

Received 25 February 2019; Received in revised form 30 July 2019; Accepted 9 September 2019

Available online 10 September 2019

0531-5565/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Fator de impacto:6.252; Qualis:A1

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 191 (2019) 107–115



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Efficacy of photoactivated *Myrciaria cauliflora* extract against *Staphylococcus aureus* infection – A pilot study



Denisar Palmto dos Santos, Diego Patrick Soares Lopes, Stefano Pedro de Melo Calado, Caroline Vieira Gonçalves, Igor Peretra Ribeiro Muniz, Israel Souza Ribeiro, Maria Poliana Leite Galantini, Robson Amaro Augusto da Silva*

Federal University of Bahia, Antônio Torres Campus - Multidisciplinary Institute in Health, 58 Rio de Conas Sertes - 17 Block - 58 Lote | Condeixa, 45.029-094 Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Staphylococcus aureus
Photodynamic therapy
Photosensitizers
Myrciaria cauliflora

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the major microorganisms that cause human diseases, leading from mild skin infections to serious diseases. With the use of semi-synthetic penicillins, methicillin-resistant strains called Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have emerged, whose resistance pattern extends to other beta-lactam antibiotics. It has already been shown that photodynamic therapy is capable of inactivating MRSA as the laser excites the photosensitizer responsible for transferring its electrons to the molecular oxygen, generating extremely reactive molecules, such as singlet oxygen, being these reactive components the chemicals that promote the bacterial clearance. Thus, the research aiming at the development of new photosensitizers becomes important, especially to increase the amount of therapeutic resources available for the treatment of persistent infections related to this bacterium. In this context, *Myrciaria cauliflora* is a plant that has antimicrobial action and there are no reports of the use of its crude extract as a photosensitizer in antimicrobial photodynamic therapy. In that way, this work conveys an innovative way of the use of *M. cauliflora* extract as a photosensitizer, comprising its use as an antimicrobial agent when activated by light, against *S. aureus*. *In vitro* tests were performed where it was observed that after the photoactivation with blue LED light, the extract presented an augment in its antimicrobial activity, together with production of singlet oxygen. In the model of intradermal infection in Balb/c mice, a reduction in bacterial load was also detected, with raised expression of TNF- α , IL-17A, and MPO. Here, we demonstrate that the extract of *M. cauliflora* has photosensitizing action, promoting the production of singlet oxygen, besides IL-17A, TNF- α , and MPO.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is one of the major microorganisms that cause human diseases, leading from mild skin to serious infections such as endocarditis, septic arthritis, osteomyelitis, and sepsis [1,2]. Its pathogenic capacity is attributed to the large repertoire of toxins produced by this microorganism. *Staphylococci* are gram-positive, spherical bacteria with a diameter varying from 0.5 to 1.5 μm , are immobile, maintain grouped in irregular masses like cells adhered to each other, chained together in pairs, and forming bunches of grapes [3].

The pathogen can be found in the normal skin microbiota, mucous membranes of humans, and is related to several infections, mainly occurring in nurseries and intensive care units. With the use of semi-synthetic penicillins, methicillin-resistant strains called Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have emerged, due to the

acquisition of the *mecA* gene, whose resistance pattern extends to other beta-lactam antibiotics [4,5].

Infections caused by this microorganism are extending worldwide, with > 90% of them initiating through the skin. For these illnesses, the physical barriers and, especially, the host immune system will be directly related to infection control [6,7]. However, *S. aureus* is able to evade immunoprotective defenses due to the expression of virulence factors such as adhesins and proteins in order to neutralize both components of innate and acquired immunity. Then, outbreaks of community-based infections generated by resistant strains present a wide distribution in the terrestrial world, and the intensification on these facts stresses the necessity for developing new strategies to prevent and treat infections by this pathogen [8,9].

It has already been shown that photodynamic therapy (PDT) is capable of inactivating MRSA strains through two distinct

* Corresponding author.

E-mail address: robson.amaro@gmail.com (R.A.A. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.011>

Received 5 July 2018; Received in revised form 12 December 2018; Accepted 16 December 2018

Available online 17 December 2018

1011-1344/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Fator de impacto:3.161; Qualis:A2

Lasers in Medical Science
<https://doi.org/10.1007/s10103-019-02942-x>

ORIGINAL ARTICLE



Photoactivated resveratrol controls intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in mice: a pilot study

Denisar Palmito dos Santos¹ · Maria Poliana Leite Galantini¹ · Israel Souza Ribeiro¹ · Igor Pereira Ribeiro Muniz¹ · Italo Sousa Pereira¹ · Robson Amaro Augusto da Silva¹

Received: 2 May 2019 / Accepted: 22 December 2019
 © Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2020

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the main causative agent of infections acquired in both community and hospital environment. In this context, photodynamic therapy (PDT) consists in using a photosensitizer that, activated by light, evokes the formation of reactive oxygen species (ROS), which lead to the death of microorganisms due to oxidative damage; it is useful tool since this action, harmful to pathogens, does not significantly injure human cells. In view of this, this work proposes a more in-depth study on the use of resveratrol (RSV) as a possible photosensitizer. It was observed, in the intradermal infection model in animals' ear dermis, that photoactivated resveratrol promotes an increase in myeloperoxidase expression with reduced bacterial load in the draining lymph node. Besides that, the draining lymph node of the animals treated with photoactivated RSV controls inflammation through IL-10 production. These are pioneers data and this work being a pilot study; then, other works must be conducted with the objective of elucidate the photoactivated resveratrol mechanism of action.

Keywords *Staphylococcus aureus* · Photodynamic therapy · Photosensitizers · Resveratrol

Introduction

Staphylococcus aureus is one of the main causative agent of infections acquired in both community and hospital environment [1]. The vast majority of disorders caused by *S. aureus* result from asymptomatic carriers, in which the individual can be colonized for short or long periods that can lead to a disease in case of the immune system has some impairment [2–4].

Therefore, serious disorders provoked by this microorganism can often tackle hospitalized patients and trigger worrying consequences, especially concerned to antibiotic therapy [5]. Since MRSA (multiresistant *Staphylococcus aureus*) was first described as one of the leading hospital pathogens in 1960s, the incidence of this microorganism's infections continues to broaden in health-care institutions and, recently, in worldwide community [2].

In this context, photodynamic therapy (PDT) consists in using a photosensitizer that, activated by light, evokes the formation of reactive oxygen species (ROS), leading to the death of microorganisms due to oxidative damage [6, 7]. In view of this, several in vitro studies have demonstrated that some coloring substances can be light-activated and produce antimicrobial effect against several types of pathogens [7–10]. However, the number of dyes available today is limited, and many of them need further study on their antimicrobial mechanism of action.

In view of this, this work proposes a more in-depth study on the use of resveratrol (RSV) as a possible photosensitizer. This polyphenol, especially present in grape, promotes health benefits through anti-angiogenic, anti-inflammatory, and antimicrobial activity [11]. When an animal is selected for research on a human disease, previous procedures are often necessary to adapt the disease to the animal. An adapted infection protocol for such animals was applied in this research. Most infections caused by *S. aureus* occur through the skin [3, 4]. Therefore, an intradermal infection model in mice was performed.

Regarding the great need for new therapeutic options for the treatment of infections caused by MRSA strains combined with the lack of in vivo studies on the application of

✉ Robson Amaro Augusto da Silva
 robson.amaro@gmail.com

¹ Antônio Teixeira Campus, Multidisciplinary Institute in Health, Federal University of Bahia, 58 Rio de Contas Street, 17 Block, 58 Lot, Candeias, Vitória da Conquista, Bahia 45029-094, Brazil

Qualis: B4



AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA DE PRÉ-PÚBERES DE REDES DE ENSINO PÚBLICO E PRIVADA EM VITÓRIA DA CONQUISTA-BA, BRASIL

Evaluation of the pre-pubertal body mass index of public and private education networks in Victoria de Conquista-BA, Brazil

MEIRA, Taylan Cunha¹; SOUSA, Everton Almeida¹
 LEITE, Diego de Moraes²; BORGES, Carlos Alberto de Oliveira³
 CORREIA, Thiago Macedo Lopes⁴; SANTOS FILHO Luciano Evangelista dos⁵
 BITTENCOURT, Grazielle Prates Lourenço dos Santos⁶;
 OLIVEIRA, Ivan Conrado⁶; CARDOSO, Yago Gusmão⁷
 MUNIZ, Igor Pereira Ribeiro⁸

RESUMO

Introdução: A utilização demasiada da tecnologia tem acarretado impactos negativos à saúde dos jovens, por exemplo, a ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis, geradas pelo sedentarismo. **Objetivo:** Analisar o IMC de pré-púberes das redes ensino pública e privada de Vitória da Conquista-BA. **Métodos:** Foi realizado estudo transversal descritivo, que adotou uma amostragem não probabilística intencional, com a escolha de uma (01) escola da rede pública (municipal) e uma (01) da escola da rede privada da região urbana do respectivo município. **Resultados:** A amostra foi composta por 193 alunos das redes de ensino pública e privada. Esses números corresponderam a 52,3% do sexo masculino e 47,7% do sexo feminino de ambas as redes de ensino, com a faixa etária de 8 a 10 anos. Em relação ao sobrepeso e a obesidade, teve o total de 18,6% em ambas redes de ensino. Observando os sexos, os meninos apresentaram 21,8% de sobrepeso e obesidade e as meninas 15,2%. Quanto o baixo IMC obteve 32,1%, já o IMC adequado teve 49,2%, enquanto o sobrepeso e obesidade apresentou 9,3% cada um em ambas redes de ensino. **Discussão:** Comparando as redes de ensino observou maior baixo IMC entre pré-púberes da rede de ensino pública, enquanto maior sobrepeso e obesidade na rede de ensino privada. **Conclusão:** Entretanto os fatores socioeconômicos e culturais estão interligados na maior ocorrência de baixo peso corporal, sobrepeso e obesidade em pré-púberes das redes ensino público e privado na cidade de Vitória da Conquista-BA, Brasil.

Palavras-chave: IMC. Pré-Púberes. Rede Ensino.

ABSTRACT

Introduction: Too much use of technology has had negative impacts on the health of young people, for example the occurrence of chronic non-communicable diseases, generated by the sedentary lifestyle. **Objective:** To analyze the BMI of prepubescent of the public and private teaching networks of Vitória da Conquista-BA. **Methods:** A descriptive cross-sectional study was carried out, using an intentional non-probabilistic sampling, with a choice of one (01) public school (municipal) and one (01) private school in the urban region of the respective municipality. **Results:** The sample consisted of 193 students from public and private education networks. These numbers corresponded to 52.3% of males and 47.7% of females of both education networks, with ages ranging from 8 to 10 years. In relation to overweight and obesity, it had a total of 18.6% in both education networks. Observing the sexes, the boys presented 21.8% of overweight and obesity and the girls 15.2%. When the BMI was low 32.1%, the appropriate BMI had 49.2%, while overweight and obesity presented 9.3% each in both teaching networks. **Discourse:** Comparing to teaching networks observed higher low BMI among prepubescent of the public school network, while higher overweight and obesity in the private education network. **Conclusion:** Meanwhile, socioeconomic and cultural factors are interlinked in the highest occurrence of low body weight, overweight and obesity in prepubescent children of public and private schools in the city of Vitória da Conquista-BA, Brazil.

Keywords: BMI. Pre-pubescent. Network Teaching.

¹ Graduado em Educação Física pela Faculdade de Tecnologia e Ciências campus Vitória da Conquista (2018). Mestrando em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação, da Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia (Ba), Brasil.

² Graduado em nutrição pela faculdade de Tecnologia e Ciências - UNIFTC. Mestrando em Fisiologia- FMRP/USP.

³ Mestre em Educação Física pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (2012) e Graduado em Educação Física pela Universidade Católica do Salvador, Bahia (Ba), Brasil.

⁴ Bacharel em Enfermagem pela Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde (2016). Mestrando bolsista (FAPESB) do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas.

⁵ Doutorando em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação, Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia (Ba), Brasil.

⁶ Discente do curso de Educação Física, Faculdade de Tecnologia e Ciências FTC/VIC, Bahia (Ba), Brasil. E-mail: conrado-fiit@gmail.com.

⁷ Profissional de Educação Física, Faculdade de Tecnologia e Ciências FTC/VIC, Bahia (Ba), Brasil.

⁸ Biotecnologista formado pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), campus Anísio Teixeira. Mestre em Biociências pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia (Ba), Brasil, Campus Anísio Teixeira.

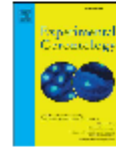
Fator de impacto:4.032; Qualis: A3

Experimental Gerontology 155 (2021) 111558



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Regular physical activity reduces the effects of inflammaging in diabetic and hypertensive men

Israel S. Ribeiro^{a,b}, Ítalo S. Pereira^a, Maria P.L. Galantini^a, Denisar P. Santos^{a,c},
Mauro F. Teles^a, Igor P.R. Muniz^a, Gilvanéia S. Santos^a, Robson A.A. Silva^{a,*}

^a Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus – Federal University of Bahia, 58 Hornindo Barros Street – 17 Block – 58 Lot, Candeias, 45.029-094 Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

^b Paulo Freire Campus – Federal University of Southern Bahia, 250 Joana Angélica Square, São João, 45.908-058 Teixeira de Freitas, Bahia, Brazil

^c FG University Center – UnaPG, 459 Barão do Rio Branco Avenue, Zip code: 45430-000 Guanambi, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Section Editor: Daniela Prasca

Keywords:

Physical activity
Aging
Systemic arterial hypertension
Type 2 diabetes mellitus
Men

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the influence of physical activity in inflammatory, biochemical and endocrine parameters of middle-aged and elderly men with Systemic Arterial Hypertension (SAH) and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). The assessment was comprised by 77 male volunteers aged between 45 and 59 years old (middle-aged men) or 60 to 86 years old (elderly men), diagnosed with SAH and T2DM, assisted by Family Health Units in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. According to age and lifestyle (sedentary or practicing physical activity), these men were classified as middle-aged sedentary men, middle-aged physically active men, elderly sedentary men, or elderly physically active men. It was noticed that active elderly people with SAH and T2DM had a better inflammatory balance than sedentary middle-aged men, through the evaluation of the relationship between the cytokines IL-10/TNF- α , IL-10/IL-17A and IL-10/IFN- γ . Moreover, in the extended correlation analysis, a greater global balance was observed among anthropometric, blood pressure, biochemical and cytokine parameters. Physical activity beneficially modulates aging-related disease risk factors even in elderly individuals.

1. Introduction

The elderly population is rapidly growing worldwide (Pew Research Center, 2014). This growth is related to the improvement of sanitary conditions for the individuals, which reduced deaths that were caused by infectious diseases and increased people's life expectancy. Nevertheless, this increase in life expectancy is linked to an increase in the number of chronic non-communicable diseases (NCDs) related to the population aging (Murray et al., 2015). Systemic arterial hypertension (SAH) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are two NCDs that are highly prevalent in the elderly population and are related to an elevated cardiometabolic risk (Freitas and Garcia, 2012). Studies indicate that the prevalence of these diseases in men is directly proportional to age, with higher rates among middle-aged and elderly individuals (Mills et al., 2016; Khalil et al., 2018). The prevalence of T2DM in elderly men varies from 24% to 30%, however, studies show a high prevalence of prediabetes in middle-aged men, revealing a possible evolution of the

disease associated with aging (Panagiotakos et al., 2007; Jain and Pananjape, 2013; Goswami et al., 2016; Khalil et al., 2018). SAH, in turn, is generally higher in elderly men, ranging from 31% in middle-aged men to 68% in elderly men (Ghaffari et al., 2016; Goswami et al., 2016; Mills et al., 2016).

Changes in immunological, metabolic, and endocrine parameters accompany aging are connected to the development of chronic pathological conditions (Mikael et al., 2017). With advancing age pathophysiological adaptations such as increased visceral adiposity, progressive decline in sex hormones, and increased vascular oxidative damage usually occur factors that contribute to the development of a process known as "inflammaging" (Wyczalkowska-Tomasik et al., 2016; Franceschi et al., 2018). This process is characterized by the positive regulation of chronic low-grade inflammation, which results in increased serum concentrations of pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1- β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Baylis et al., 2013; Zembron-Lacny et al., 2019). Such increase in pro-inflammatory

* Corresponding author at: Multidisciplinary Institute of Health, Anísio Teixeira Campus - Federal University of Bahia, 58 Hornindo Barros Street – 17 Block – 58 Lot, Candeias, Zip code: 45.029-094 Vitória da Conquista, Bahia, Brazil.
E-mail address: ramaro@ufba.br (R.A.A. Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111558>

Received 20 June 2021; Received in revised form 13 September 2021; Accepted 15 September 2021

Available online 20 September 2021

0531-5565/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Fator de impacto: 1.714 ;Qualis: A2



An Acad Bras Cienc (2021) 93(Suppl. 4): e20201905 DOI 10.1590/0001-3765202120201905
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

BIOMEDICAL SCIENCES

Gender-related differences in the modulation of anthropometric, biochemical, and immune markers by physical activity in hypertensive and diabetic individuals

DÉBORAH C. DOS SANTOS, ISRAEL S. RIBEIRO, DIEGO PATRICK S. LOPES, ÍTALO S. PEREIRA, DENISAR P. SANTOS, IGOR P.R. MUNIZ, FERNANDA M. DA SILVA LIMA, ANDRESSA ANTÔNIA S. COSTA, DANIELA DA SILVA P. SOUZA, STÉFANO PEDRO DE MELO CALADO, CAROLINE V. GONÇALVES, MARIA POLIANA L. GALANTINI, DANILO N. LOPES, ROBSON A.A. DA SILVA & GILVANÉIA S. SANTOS

Abstract: Systemic arterial hypertension (SAH) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) compose the two major noncommunicable chronic inflammatory diseases. Physical activity has been shown as a promising complementary approach to control the systemic inflammation. However, it is still unclear whether this modulation is gender-dependent. The objective of this study was to evaluate the gender-related influence of physical activity on the inflammatory response and biochemical profile of individuals with SAH and T2DM. An international physical activity questionnaire was applied to 376 individuals diagnosed with SAH and T2DM in order to assess their exercise routine and was evaluated the influence of physical activity in biochemical, anthropometric, and immunological markers involved in these disorders in men and women. Even though active individuals have exhibited lower serum levels of IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , and IL-17A, the ratios between IL-10 and all inflammatory cytokines were higher in men than in women. Physically active individuals also demonstrated increased HDL/LDL and HDL/VLDL ratios. Moreover, multiple correlations revealed that in active women both IL-10 and TNF- α serum levels positively correlate with fasting glucose levels, and were negatively associated with HDL levels. Our findings suggest that gender-related differences dictate a distinct crosstalk between inflammatory and biochemical markers in physically active individuals.

Key words: Systemic arterial hypertension, gender, inflammation, physical activity, type 2 diabetes mellitus.

INTRODUCTION

Over the years, chronic noncommunicable diseases have been assuming an important role in health-related concerns, and nowadays, they represent the major affecting disorders for the world population (Prince et al. 2015). It is known that, in elderly, cardiovascular diseases, systemic arterial hypertension, cancer,

and diabetes mellitus are the most common pathologies, causing a lower quality of life to these individuals, besides higher assistance costs, and lower life expectancy (Marengoni et al. 2008, Prince et al. 2015). Studies have also been demonstrating an augment in prevalence of chronic noncommunicable diseases in young adults, raising the need to include them in population studies (Chen et al. 2011, Kissela

Fator de impacto: 1.714 ;Qualis: A2



An Acad Bras Cienc (2022) 94(2): e20200561 DOI 10.1590/0001-3765202220200561
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

MICROBIOLOGY

Physical activity reduces intradermal bacterial load in a murine model submitted to forced swim training – a pilot study

MARIA P.L. GALANTINI, LORENA S. LEAL, KARINE B. RODRIGUES, ISRAEL S. RIBEIRO, ITALO S. PEREIRA, CAROLINE V. GONÇALVES, STÉFANO P.M. CALADO, DENISAR P. DOS SANTOS, IGOR P.R. MUNIZ & ROBSON A.A. DA SILVA

Abstract: Regular exercise is beneficial to health. This study evaluated the effects of moderate and intense physical exercise modalities on intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in a murine model. Mice that practiced moderate exercise had lower bacterial load on lymph nodes and less inflammatory infiltrate in dermis. They presented greater weight, however, less amount of epididymal fat: the weight was increased while they had fat diminished. A positive correlation was observed between lipid content and bacterial load in mice trained at moderate intensity. Animals that were under high intensity exercises presented superior bacterial load on the lymph nodes, increased neutrophil count and circulating lymphocytes, and had leukocyte recruitment to the dermis augmented, when compared to the ones in moderate exercise. These findings suggest that moderate physical activity modulates the immune response in dermal infection caused by *S. aureus* in a murine model.

Key words: Infection, mice, physical exercise, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCTION

Moderate physical exercise represents a resistance factor for the onset of infections by stimulating the immune system protective response (Viana et al. 2014). However, high intensity exercises may lead to increased susceptibility to infectious conditions (Nieman 2007, Priebe et al. 2009). The duration, intensity, and frequency of exercise can directly influence the formulation of a protective response by modulating the number of circulating or recruited leukocytes to the infectious site (Nieman & Nehlsen-Cannarella 1994, Matthews et al. 2002, Escribano et al. 2005, Nieman et al. 2011, Araneda et al. 2016, Lu et al. 2017).

The fluctuation in leukocyte concentration in different body regions is determined by

pathophysiological reactions (Natale et al. 2003). Chronic moderate physical exercise has been associated with an increment in the proliferative response of T lymphocytes and in the number of neutrophils, thus, intensifying antimicrobial and phagocytosis functions (Malm 2004, Yeh et al. 2014, Gomes et al. 2016).

Neutrophils and lymphocytes are key cells in control of infections caused by *Staphylococcus aureus* (Harrington et al. 2005, Sladek & Rysanek 2006, Hill & Imai 2016). Neutrophil recruitment and abscess formation are characteristic of *S. aureus* infections and are required for the pathogen elimination (Kobayashi et al. 2015).

S. aureus is a gram-positive bacteria and catalase-positive cocci. This pathogen generally is an unencapsulated bacteria, has approximately 0.5 to 1.5 μm in diameter, is immobile, and

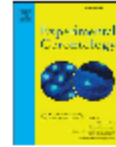
Fator de impacto:4.032; Qualis: A3

Experimental Gerontology 170 (2022) 112005



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Inflammaging and body composition: New insights in diabetic and hypertensive elderly men

Caroline Vicira Gonçalves^a, Israel Souza Ribeiro^b, Maria Poliana Leite Galantini^a, Igor Pereira Ribeiro Muniz^a, Paulo Henrique Bispo Lima^a, Gilvanécia Silva Santos^a, Robson Amaro Augusto da Silva^{a,*}

^a Multidisciplinary Institute of Health, Antônio Teixeira Campus, Federal University of Bahia, 58 Rio de Contas Street, 17 Block, 58 Lot, Cordéus, 45.029-094 Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

^b Training Center in Health Sciences, Federal University of Southern Bahia, 58 Joana Angélica Square, São José, 45.968-058 Teixeira de Freitas, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Section Editor: Daniela Praça

Keywords:

Elderly men
Type 2 diabetes mellitus
Systemic arterial hypertension
Body composition
Inflammation

ABSTRACT

Age-related changes in the body's physiological responses play a critical role in systemic arterial hypertension (SAH) and type 2 Diabetes mellitus (T2DM). SAH and T2DM have clinically silent low-grade inflammation as a common risk factor. This inflammation has a relevant element, the excess of fatty tissue. In this scenario, little is known about how inflammatory markers interact with each other. Therefore, this work evaluated the interplay among anthropometric, biochemical, and inflammatory markers in the elderly with SAH and T2DM. Men aged 60–80 years old with SAH and T2DM were classified by body mass index (BMI) as eutrophic elderly (EE, 24 individuals) or overweight elderly (OE, 25 individuals). Body composition analysis was performed using bioimpedance. Blood samples were collected to perform inflammatory and biochemical evaluations. The cytokines IL-17A, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , and IL-10, were evaluated by ELISA. Triglycerides, total and fractions of cholesterol, and glucose were measured by spectrophotometry. Overweight elderly men had a higher glycaemic index and an increase in most anthropometric markers, as well as higher means for all pro-inflammatory cytokines analyzed (IL-17A, IL-1 β , IFN- γ , and TNF- α) in comparison to their eutrophic elderly counterparts. However, there was a decrease in IL-10 anti-inflammatory cytokine and IL-10/IL-17A ratio compared to their eutrophic elderly counterparts. Although overweight elderly men have worsening inflammatory parameters, the magnitude of their correlations with anthropometric and biochemical parameters becomes less evident. The Bayesian networks highlight that in the eutrophic elderly, IL-17A and TNF- α are the cytokines most associated with interactions, and most of these interactions occur with biochemical parameters. It is worth highlighting the role of IFN- γ in overweight elderly men. This cytokine influences IL-10 and TNF- α production, contributing to the inflammatory profile exacerbated in this group.

1. Introduction

Aging is a complex phenomenon that leads to numerous changes in the body's physiological systems. At the immunological level, it may be associated with a state of low-grade chronic sterile inflammation called inflammaging (Franceschi et al., 2017). Age-related changes in immunological and metabolic responses and the ability to respond to stress play a critical role in systemic arterial hypertension (SAH) and type 2 Diabetes mellitus (T2DM) (Franceschi et al., 2018; Pülöp et al., 2016; Pansarasa et al., 2019; Santoro et al., 2020).

The pathophysiology of SAH and T2DM is multifactorial. However,

these diseases have inflammaging as a common risk factor (Gomes et al., 2019). In this case, although older individuals present a less effective immune response, there is an increase in the expression of circulating inflammatory molecules (Karen et al., 2011). Still, there is no precise understanding of the causes of "inflammatory aging". A common finding involves a dysregulation of the cytokine network and its homeostasis. Several common molecular pathways have been identified and appear to be associated with aging and low-grade inflammation (Lopes et al., 2021; Rea et al., 2018; Ribeiro et al., 2021).

Low-grade inflammation is a significant element of excess fatty tissue (Lechi, 2017). Immune system activation is highly related to the

* Corresponding author.

E-mail addresses: robson.amaro@gmail.com, ramaro@ufba.br (R.A.A. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.112005>

Received 9 August 2022; Received in revised form 24 October 2022; Accepted 25 October 2022

Available online 28 October 2022

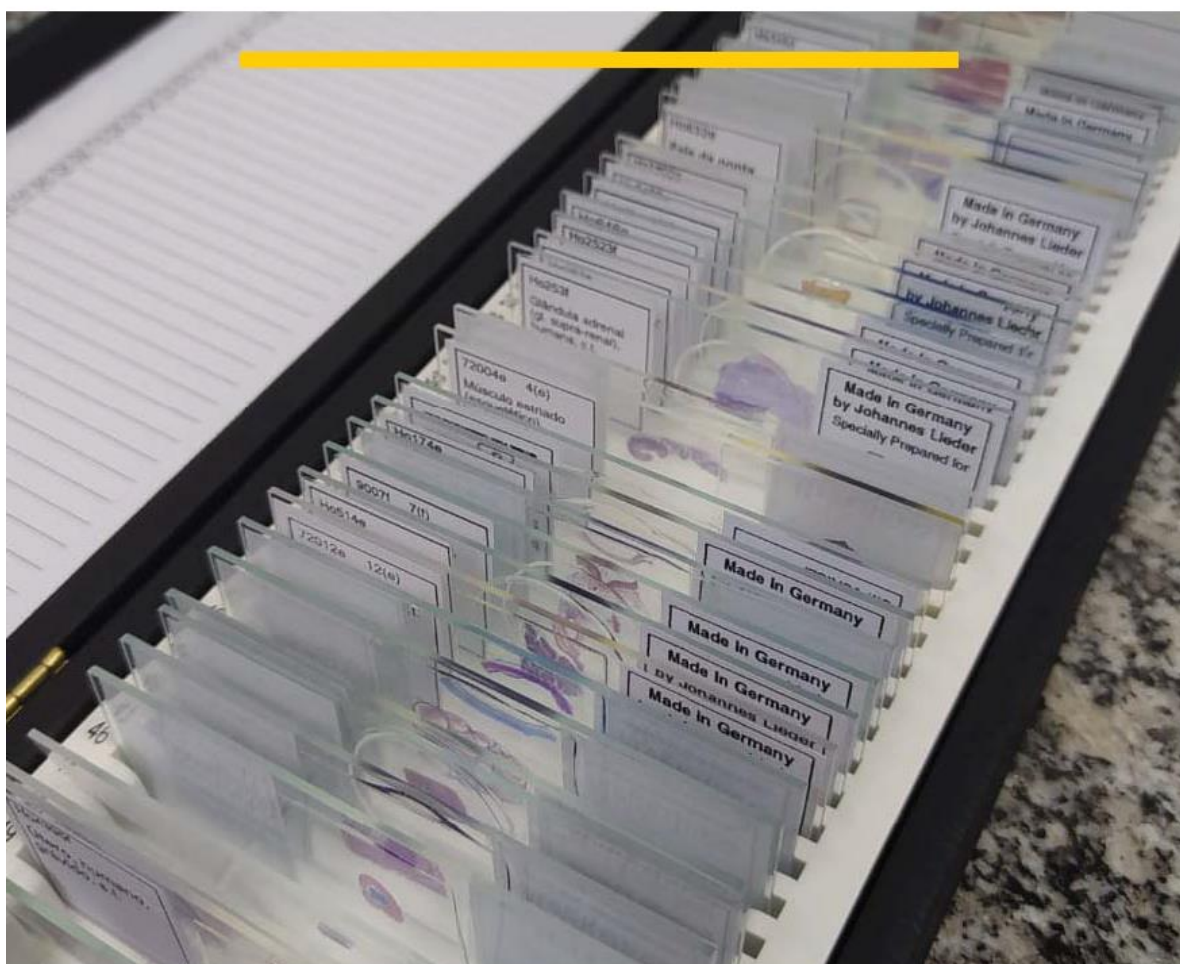
0531-5565/© 2022 Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Livro publicado: Descomplicando a Histotecnologia

E-BOOK PATOLOGIA E SAÚDE
1ª EDIÇÃO

DESCOMPLICANDO A HISTOTECNOLOGIA

UM GUIA PRÁTICO PARA O PREPARO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS



Organização: Robson Amaro Augusto da Silva