




ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

1 Aos 24 dias do mês de fevereiro de 2021, no horário das 14:00 horas, nas dependências do Programa de Pós-graduação
2 em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia - pela Plataforma
3 Conferência Web, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da tese intitulada “Influência do Diabetes
4 Mellitus nas Manifestações Clínicas, Resposta Imune e Resposta ao Tratamento de Pacientes com
5 Leishmaniose Cutânea” apresentada pelo pós-graduando **Alexsandro Souza do Lago**. A Comissão Examinadora
6 aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, conforme o que estabelecem o
7 Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Universidade Federal da Bahia e o Regimento do Programa de
8 Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por: Prof. Dr. Edgar
9 Marcelino de Carvalho, Doutor em Medicina e Saúde/UFBA, Professor Titular aposentado da Faculdade de
10 Medicina/UFBA (Presidente/Orientador); Profa. Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacelar, Doutora em
11 Imunologia/UFBA, Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/UFBA; Profa. Dra. Viviane
12 Sampaio Boaventura de Oliveira, Doutora em Patologia Humana/UFBA, Professora Adjunta da Faculdade de
13 Medicina/UFBA; Profa. Dra. Fernanda Ventin de Oliveira Prates, Doutora em Ciências da Saúde/UFBA, Professora
14 Auxiliar UNEB; Profa. Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, Doutora em Imunologia/UFBA, Professora Titular da
15 Faculdade de Medicina/UFS; Profa. Dra. Natália Barbosa Carvalho, Doutora em Bioquímica e Imunologia/UFMG,
16 Professora UFBA (Suplente) e Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho, Doutorado em Patologia Humana/UFBA, UFBA
17 (Suplente). Após a apresentação da tese, a Comissão Examinadora realizou a arguição que foi respondida
18 satisfatoriamente pelo doutorando. A tese apresentada foi considerada aprovada. E, para constar do processo de
19 conclusão de curso e de colação de grau¹, a Comissão Examinadora lavrou a presente Ata que é assinada por todos
20 os seus membros. A Comissão Examinadora aprova a tese:
21 (X) Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da tese.
22 () Sem recomendações de modificações da versão final.
23 Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser concluído o processo de
24 outorga do título de doutor.
25 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

26  Edgar Marcelino de Carvalho (Presidente/orientador)

27  Maria Olívia Amado Ramos Bacelar

28  Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira

29  Fernanda Ventin de Oliveira Prates

30  Amélia Ribeiro de Jesus

31 _____ Natália Barbosa Carvalho (Suplente)

32 _____ Lucas Pedreira de Carvalho (Suplente)

33
34 Ata Aprovada na Sessão do dia 24/02/2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico
40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.

Tel.: 55 71 3283.5582 | Fax: 55 71 3283.5567
www.possaude.ufba.br | pos.saude@ufba.br



-
- 1 ¹ A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do Programa de Pós-graduação em
 - 2 Ciências da Saúde, de quatro exemplares impressos da dissertação, acompanhados de 2 versões completas em meio eletrônico e
 - 3 metadados (formato pdf) no prazo máximo de 60 dias.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE



ALEXSANDRO SOUZA DO LAGO

**A Influência do Diabetes Mellitus nas Manifestações Clínicas, na
Resposta Imune e na Resposta ao Tratamento de Pacientes com
Leishmaniose Cutânea Causada pela *Leishmania braziliensis*.**

TESE DE DOUTORADO

Salvador (Bahia), 2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lago, Alexsandro Souza do

A influência do Diabetes Mellitus nas manifestações clínicas, na resposta imune e na resposta ao tratamento de pacientes com Leishmaniose Cutânea causada pela *Leishmania braziliensis*/ Alexsandro Souza do Lago. -- Salvador, 2021.98 f.

Orientador: Edgar Marcelino de Carvalho Filho.
Tese (Doutorado- Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, 2021.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Diabetes Mellitus.
3. *Leishmania (V) braziliensis*. 4. Resposta Imune 5. Resposta ao Tratamento. I. Carvalho Filho, Edgar Marcelino de. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE



A Influência do Diabetes Mellitus nas Manifestações Clínicas, na Resposta Imune e na Resposta ao Tratamento de Pacientes com Leishmaniose Cutânea Causada pela *Leishmania braziliensis*.

ALEXSANDRO SOUZA DO LAGO

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção de grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Edgar Marcelino De Carvalho Filho

TESE DE DOUTORADO

Salvador (Bahia), 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares

- Prof.^a Fernanda Ventin de Oliveira Prates - Professora de Dermatologia do curso de Medicina da UNEB;
- Prof.^a Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira - Pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Goncalo Moniz, professora adjunta e coordenadora da disciplina de Imunopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia;
- Prof.^a Amélia Ribeiro de Jesus - Professora Titular de Medicina Interna da Universidade Federal de Sergipe e pesquisadora 1D do CNPq e coordena um DINTER entre este Programa e a UNCISAL (Alagoas);

Membro Suplente

- Prof.^a Olivia Bacellar - Pesquisadora do Serviço de Imunologia (SIM) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e do Tropical Medicine Research Center do NIH, EUA. Professora permanente dos Programas de Pós-Graduação em Imunologia (PPGI_m) e de Ciências da Saúde (PPGCS), UFBA.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

- Universidade Federal da Bahia;
- Faculdade de Medicina da Bahia;
- Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES);
- Posto de Saúde de Corte de Pedra-Ba;
- Instituto Gonçalo Muniz (FioCruz-Bahia).

EQUIPE

- Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Mestre e Doutor, Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA;
- Augusto Marcelino de Carvalho, Mestre e Doutor, Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA;
- Ednaldo Lima do Lago, Agente de Saúde, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra;
- Lucas Pereira Carvalho, Mestre e Doutor, Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA;
- Luís Henrique Guimarães, Mestre e Doutor Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA;
- Maria Neuza dos Santos Souza do Lago, Enfermeira, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra;
- Maria Odônio Ferreira, auxiliar técnico, Centro de Referência em Leishmaniose, Corte de Pedra;
- Jamile Souza do Lago, Estudante de doutorado da Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA;
- Camila Sampaio, Estudante de doutorado da Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA;
- Paulo Roberto Lima Machado, Mestre e Doutor, Serviço de Imunologia, COMHUPES.

FONTE DE FINANCIAMENTO

- National Institutes of Health (NIH);
- Comitê Nacional Pesquisa (CNPq) Ministério de Ciência, Tecnologia (MCT);
- Bolsa de estudo pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho**, por todos os ensinamentos, orientações, críticas e sugestões concedidas durante este período.

A **Ednaldo Lima do Lago**, meu pai, por todas as horas de dedicação, ensinamentos e questionamentos.

À **Maria Neuza dos Santos Souza do Lago**, minha mãe e amiga, por todo incentivo, amor e dedicação.

As minhas irmãs **Jamile, Tainã e Edney**, por todo incentivo e apoio.

A minha esposa **Maria Graziella Reis**.

À **Dra. Olivia Bacelar**, ao **Dr. Luiz Henrique Guimarães** e **Dr. Paulo Machado**.

A **Cristiano Sampaio Franco** do Serviço de Imunologia.

A todos os amigos e colegas do **PPgCS** e do **Serviço de Imunologia**.

Aos funcionários do **Posto de Saúde de Corte de Pedra**.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. STATUS DA DOENÇA NO SÉCULO XXI: UMA EPIDEMIA GLOBAL.....	17
2.2. RESPOSTA IMUNE NO DIABETES MELLITUS.....	18
2.3. DIABETES TIPO 2: ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.....	20
2.4. ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE.....	21
2.5. FORMAS CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES.....	24
2.6. DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	26
2.7. RESPOSTA IMUNE NAS LEISHMANIOSES.....	27
2.8. TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	29
2.9. A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM DIABÉTICO.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. OBJETIVO GERAL.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. CASUÍSTICA.....	33
4.2. CÁLCULO AMOSTRAL.....	33
4.3. LOCAL DO ESTUDO.....	34
4.4. DEFINIÇÃO DE CASOS E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	35

4.5. EXTRACÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> POR PCR EM TEMPO REAL	35
4.6. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	36
4.7. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	36
4.8. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA.....	37
4.9. TRATAMENTO.....	37
4.9.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	53
7. SUMÁRIO.....	59
8. CONCLUSÕES.....	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
10. ANEXOS.....	76
11. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	83
12. ARTIGO PUBLICADO COM AO RESULTADO DA TESE.....	86
13. TÍTULOS E REFERÊNCIAS DE OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Estado da Bahia - em vermelho área Endêmica de Corte de Pedra.

Figure 2. Correlação entre a Glicemina no dia 0 e Tempo de Cura.

Figura 3. Análise Fenótipica do Infiltrado Celular e da Expressão de Granzima B em Biópsias de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com e sem Diabetes.

Figura 4. A produção de citocinas em sobrenadante de células mononucleares estimuladas com antígeno solúvel de leishmania em pacientes com DM com lesões atípicas e em pacientes com lesões clássicas.

Figura 5. Úlceras Atípicas em seis Pacientes e três Úlceras Clássicas em Pacientes com Diabetes.

Figura 6. Evolução da Lesão de um Paciente com Lesão Atípica e Falha Terapêutica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de Leishmania, Formas Clínicas e Principais Vetores.

Tabela 2. Tabela Cronológica de Procedimentos.

Tabela 3. Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com ou sem Diabetes Mellitus.

Tabela 4. Análise Histopatológica das Lesões de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com ou sem Diabetes.

Tabela 5. Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Diabetes mellitus com Lesões Atípicas, Típica e Controle de Pacientes com Leishmaniose Cutânea.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IDRM: Intradermoreação de Montenegro

LC: Leishmaniose Cutânea

LD: Leishmaniose Cutânea Disseminada

LM: Leishmaniose Mucosa

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LCR: Leishmaniose Cutânea Recente

LV: Leishmaniose Visceral

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

MS: Ministério da Saúde

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

DM: Diabetes Mellitus

SBV: Antimonial Pentavalente

IFN- γ : Interferon Gama

TNF: Fator de Necrose Tumoral

IL: Interleucina

CXCL: Quimiocina (motivo C-X-C)

TCD8+: Linfócitos T Citotóxicos

SUS Sistema Único de Saúde

MLP: Proteico Quimiretático Monócitos

CMSP: Células Mononucleares Sangue Periférico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

TGF: Fator de Transformação do Crescimento

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos

HIV: Vírus da Imunodeficiência humana

IDF: Instituto Federal de Diabetes

RESUMO

Introdução: O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico, heterogêneo caracterizada por hiperglicemia. Atualmente, em parte, por consequência de maus hábitos alimentares e estilo de vida sedentário, cerca de 90-95% dos casos de diabetes são do tipo 2, o qual se desenvolve a partir de um quadro inicial de resistência periférica à insulina. O DM aumenta o risco de infecções bacterianas extracelulares e das infecções por fungos e modifica a apresentação clínica e a resposta ao tratamento dessas infecções. A Leishmaniose Cutânea (LC) se caracteriza por úlceras bem delimitadas com bordas infiltradas elevadas e com fundo granuloso. A LC é uma doença que compromete predominantemente adultos, jovens do sexo masculino, mas o número de crianças e idosos com a doença tem aumentado nos últimos anos. Todavia, existe uma escassez de trabalhos sobre a LC em diabéticos. **Objetivo:** Avaliar a influência do DM nas manifestações clínicas, na resposta imune e na resposta ao tratamento de pacientes com LC causada pela *Leishmania braziliensis*. **Material e Métodos:** Participaram do estudo 36 pacientes DM com LC e 36 pacientes com LC sem DM, com idade entre 18 a 60 anos com diagnóstico de LC que procuraram o centro de referência de Corte de Pedra no período de janeiro de 2017 a junho de 2020. As células mononucleares do sangue periférico foram estimuladas com antígeno solúvel de leishmania para dosagem de citocinas através da técnica imunoenzimática (ELISA). Foi realizada também biópsia da lesão para o estudo histopatológico e imuno-histoquímico. O diagnóstico da LC foi feito pela identificação do DNA de *L. braziliensis* e do DM por hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$. Todos os pacientes foram tratados com Glucantime® (Sanofi-Aventis) na dose 20mg/kg/dia. A cura foi definida pela completa cicatrização da lesão na ausência de bordas elevadas. **Resultados:** Não houve diferença entre os dois grupos com relação à duração da doença, localização e o tamanho da lesão, e a cura foi observada em 47% dos pacientes diabéticos com LC e em 56% dos pacientes com LC sem diabetes ($P > 0,05$). Não houve diferença no número de amastigotas, nem na frequência de células expressando CD20⁺(linfócito B) e CD68⁺(macrófagos). Entretanto, houve uma diminuição na frequência de células de CD8⁺ em pacientes com LC e DM. Do ponto de vista clínico, uma diferença marcante entre os grupos foi a presença de lesões atípicas, planas e sem bordas bem delimitadas em 13 pacientes (36%). Enquanto a cura foi documentada em 87% dos diabéticos com lesões típicas, essa foi observada em 31% ($P < 0,01$) dos com lesões atípicas. A produção de citocinas IFN- γ , TNF, IL-1 β foi mais elevada nos pacientes com lesões atípicas do que nos pacientes com lesões típicas ($P < 0,05$). **Conclusões:** Não houve evidência que a glicemia tenha influenciado a apresentação e a resposta ao tratamento da LC. Todavia, um subgrupo dos pacientes com DM e LC apresentou lesões atípicas associadas com produção mais elevada de IFN- γ , TNF e IL-1 β e falha terapêutica, indicando que a resposta inflamatória exagerada e um subgrupo de pacientes com DM modificaram as manifestações clínicas e a resposta ao tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea; Diabetes Mellitus; *Leishmania (V) braziliensis*;

Resposta Imune; Resposta ao Tratamento.

ABSTRACT

Introduction: The diabetes mellitus (DM) is a chronic disease characterized by high blood sugar levels. Currently, due to genetic characteristics, a poor eating habits and a sedentary lifestyle, about 90-95% of diabetes cases are type 2, characterized by peripheral insulin resistance. DM increases the risk of extracellular bacterial infections and fungal infections, and changes the clinical presentation and response to treatment of these infections. CL is a disease that predominantly affects adults, young males, but the number of children and the elderly with the disease has increased in recent years. However, there is a scarcity of studies on CL in diabetics. **Objective:** To evaluate the influence of diabetes mellitus on clinical manifestations, immune response and response to treatment of patients with CL caused by *Leishmania braziliensis*. **Material and methods:** The study included 36 DM patients with CL and 36 patients with CL without DM aged 18 to 60 years who sought the reference center of Corte de Pedra from January 2017 to June 2020. The diagnosis of CL was performed by detection of *L. braziliensis* DNA in tissue biopsies. DM was diagnosed when glycated hemoglobin was $\geq 6,5$. Mononuclear cells of the peripheral blood were stimulated with soluble leishmania antigen and cytokines were measured in supernatants by ELISA. A lesion biopsy was also performed for histopathological and immunohistochemical studies. All patients were treated with Glucantime® (Sanofi-Aventis) at a dose of 20mg/kg/day.. The cure was defined by complete healing of the ulcers on day 90 in the absence of elevated borders. **Results:** There was no difference among the 2 groups in relation to duration of the disease, location and size of the lesion. There was no difference in the frequency of cells expressing CD20 + (lymphocyte B) and CD68 + (macrophages), however there was a decrease in the frequency of CD8 + cells in patients with CL with DM. The most important clinical difference among the 2 groups was the presence of atypical lesions characterized by superficial ulcers without well-defined borders in 13 (36%) of the diabetic patients. Moreover while there was no difference in the cure rate in DM + CL (67%) and in CL without DM (56%), $P > 0.05$, the cure rate in the diabetes with atypical lesions was 31% and in those with typical lesions was 87%, $P < 0.01$. The production of IFN- γ , TNF, IL-1 β was higher in patients with atypical lesions than in patients with typical lesions. **Conclusions:** There was no evidence that sugar blood levels influenced the presentation and response to therapy of CL. However diabetic patients who had an exaggerated inflammatory response had atypical lesions and more failure to therapy.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; Diabetes Mellitus; *Leishmania (V) braziliensis*; Immune Response; Response to Treatment.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. A doença é classificada em tipo 1 e tipo 2 (Skyler, J. S. *et al.*, 2004). O diabetes tipo 1 é predominantemente observado em adolescentes ou adultos jovens, e ocorre devido à destruição das células β do pâncreas que são responsáveis pela biossíntese e secreção de insulina, levando a uma incapacidade parcial ou total de produzir o hormônio (Skyler, J. S. *et al.*, 2004; Ferreira, V. A. *et al.*, 2014). O diabetes tipo 1 é uma doença que ocorre por uma reação autoimune mediada por linfócitos T citotóxicos (Fernandes A P *et al.*, 2005).

O diabetes tipo 2, por sua vez, é desenvolvido a partir do estabelecimento de um quadro de resistência periférica à insulina, caracterizado por uma menor captação de glicose pelos músculos e tecido adiposo e aumento da liberação de glicose pelo fígado. (Wilding, J. P *et al.*, 2014). Cerca de 90-95% dos casos de diabetes são do tipo 2 (Guo, C *et al.*, 2014), em parte decorrente do aumento exponencial na prevalência da obesidade e envelhecimento populacional, desde que há uma maior pré-disposição em indivíduos acima dos 40 anos (Skyler, J. S. *et al.*, 2004).

Já a leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa um conjunto de doenças com características clínicas, imunológicas e patológicas distintas cuja expressão clínica depende de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro. A doença tem uma ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo casos em todas as regiões geográficas (Costa SM *et al.*, 2007). A variedade de vetores e a existência de diferentes ambientes geográficos, com suas respectivas características, tornaram a leishmaniose no Brasil uma doença de múltiplas facetas, com diferenças no tocante à apresentação clínica e resposta ao tratamento, que dificultam a

padronização de métodos diagnósticos e terapêuticos (**Dantas-Torres F et al, 2007; Costa SM et al, 2007**). Os principais parasitos implicados na LTA no Brasil são

Leishmania (Viannia) braziliensis, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. (**Desjeux et al., 1992; Lainson et al., 1983**).

No Brasil são reconhecidas quatro formas clínicas distintas da LTA. A leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). Enquanto a infecção por *L. amazonensis* e a *L. guyanensis* na região amazônica geralmente estão associados com lesão única e melhor resposta terapêutica (**Silveira FT et al., 1991**), a *L. braziliensis* é responsável por formas mais graves da doença, incluindo a forma mucosa e a disseminada (**Lainson et al., 1983; Walton BC et al., 1980**). A LCD é uma forma anérgica da doença e tem como agente causal em nosso país a *L. amazonensis*, parasito que também pode causar a LM e a LD (**Barral A et al., 1991**).

A LC é a forma mais comum de apresentação da LTA, ocorre em mais de 90% dos casos em áreas de transmissão de *L. braziliensis* e caracteriza-se por uma ou múltiplas úlceras bem delimitadas, indolores com fundo granuloso e bordas elevadas. Geralmente, a lesão cutânea é acompanhada de linfadenopatia satélite (**Barral A et al., 1995**).

O tratamento recomendado para a LC no Brasil é o antimoniato de meglumina (Sbv⁵) na dose de 15-20mg/Kg/dia durante 20 dias, (MS) (SVS/MS, 2017). No entanto, a falha ao tratamento tem sido descrita em até 50% dos pacientes e o longo período necessário para a cicatrização da lesão ulcerada, 60 a 90 dias, indicam a necessidade da utilização de drogas alternativas para o tratamento da doença (**Romero GA et al., 2001; Santos JB et al., 2004**). Outros medicamentos eficazes no tratamento da doença são a pentamidina e anfotericina B (**Bailey MS & Lockwood et al, 2007; Reveiz et al., 2013**). Contudo, o uso da anfotericina B é limitado por sua toxicidade

e pela administração ser realizada em ambiente hospitalar. A miltefosina é uma droga de uso oral que se mostrou eficaz no tratamento da LC causada por

L. braziliensis e por *L. guyanensis*, mas tem como limitação o custo elevado, pelo fato de ser uma droga teratogênica e seu uso está associado frequentemente a náuseas e vômitos **(Machado *et al*, 2010; Chrusciak-Talhari A *et al.*, 2011)**.

O DM aumenta a susceptibilidade e a gravidade de doenças causadas por bactérias extracelulares e fungos **(Geerlings SE *et al.*, 1999; Gil-Santana L *et al.*, 2016)**. É também conhecido que o diabetes aumenta o risco para o desenvolvimento da tuberculose e modifica a apresentação clínica da doença. Com relação à leishmaniose, há relatos de três pacientes com DM e LC no Marrocos, onde um dos pacientes apresentou lesão vegetante **(Chiheb S. *et al.*, 2012)**. Recentemente, nós mostramos que *in vitro* uma elevação na concentração de glicose se associa com uma menor capacidade de monócitos em destruir a *L. braziliensis*. É sabido que o DM pode se associar ao sobrepeso e recentemente foi observado na nossa área endêmica que o sobrepeso e a obesidade podem modificar a apresentação clínica da LC e aumentar falha terapêutica. Contudo, existe uma carência de dados sobre a influência do DM na apresentação clínica, na resposta imune e na resposta terapêutica de pacientes com LC infectados por *L. braziliensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro relato do diabetes foi atribuído ao papiro de Ebers, elaborado em torno de 1550 a.C. no antigo Egito, o qual menciona abordagens para o tratamento de uma doença caracterizada por micção excessiva (poliúria) (Sanders L J *et al.*, 2002). Galeno e Areteu da Capadócia, notórios médicos e estudiosos da antiguidade, que foram discípulos de Hipócrates, foram os pioneiros na caracterização da doença, aproximadamente no século II d.C. Ainda no século II d.C., o médico grego Galeno descreveu o diabetes como uma doença dos rins (Rabello R A *et al.*, 2006). Cerca de 500 a.C., os antigos médicos hindus Charaka, Sushruta e Vaghbata foram os primeiros a descrever uma provável doçura na urina dos diabéticos, pois a mesma causava a atração de insetos como formigas e moscas. Somente após um século os europeus detectarem o sabor doce na urina dos pacientes acometidos pela doença (Sanders L J *et al.*, 2002; Dwivedi G *et al.*, 2007). Além disso, Willis atribuiu a doença ao sangue e não aos rins, alegando que a doçura detectada na urina derivava da presença de açúcar na circulação sanguínea. No século XVIII, o médico inglês Matthew Dobson, após aquecimento da urina, obteve um resíduo açucarado sendo essa a primeira evidência que diabéticos eliminavam açúcar na urina (glicosúria). Posteriormente, o químico inglês William Cullen foi quem cunhou, no século XVIII, a expressão “diabetes mellitus” (mellitus = mel, em latim) para descrever esta enfermidade (Sanders L J *et al.*, 2002). A partir do século XIX, acumularam-se evidências experimentais e em autópsias de pacientes diabéticos que a doença era associada a danos no pâncreas (Sanders L J *et al.*, 2002).

2.1. STATUS DA DOENÇA NO SÉCULO XXI: UMA EPIDEMIA GLOBAL

A explosão mundial na prevalência da obesidade tem resultado em um crescimento contínuo na incidência do DM tipo 2 (Kahn S E *et al.*, 2014). Estimativas apontam que no Brasil já são mais de 12 milhões de doentes, com maior prevalência em obesos acima dos 40 anos. Nos

Estados Unidos, estima-se que entre 7% e 10% da população adulta seja portadora de DM do tipo 2 (**Ferreira V A et al., 2014**). Dados divulgados pela Internacional Diabetes Federation (**IDF**) apontam que aproximadamente 387 milhões de pessoas são afetadas por esta doença, o que representa uma prevalência de 9,3% na população mundial, caracterizando uma grave epidemia global. Ainda segundo a IDF, o DM causa uma morte a cada sete segundos, resultando em 4,9 milhões de óbitos só no ano de 2019. No entanto, o dado mais alarmante aponta que um em cada dois indivíduos acometidos pelo DM não sabem que estão doentes. Além disso, as expectativas para o futuro são preocupantes, com uma estimativa de 548 milhões de diabéticos até 2055 (**IDF Diabetes Atlas 2019**).

2.2. RESPOSTA IMUNE NO DIABETES MELLITUS

A patogênese do DM tipo 1 é iniciada por um fenômeno autoimune associado à destruição das células beta do pâncreas produtoras de insulina (**Bouvy M et al., 1997; Ozougwu JC et al., 2013**). Autoanticorpos contra antígenos das células beta β do pâncreas são também documentados e com relação às subpopulações de células CD4, tanto as células Th1 como as Th2 estão ativadas (**Eisenbarth GS et al., 2005; Narendran P et al., 2005**). As células Th1 ativadas, produzem IL-2 que ativam as células T citotóxicas, que destroem as células das ilhotas através da secreção de perforina e granzima e de outros produtos químicos tóxicos. O IFN- γ ativa macrófagos e estimula a liberação de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF que destroem mais as células β (**Narendran P et al., 2005; Yagi H et al., 1992**). As células TCD4⁺ também ativam células B específicas para produzir anticorpos contra antígenos das ilhotas (**Narendran P et al., 2005; Yagi H et al., 1992; Wällberg A M et al., 2013**). O perfil da IL-6 também está relacionado com o desenvolvimento do diabetes. Essa citocina atua nas células beta, interferindo na síntese de insulina e atua nas células alfa, impedindo a produção de

glucagon. Por essa razão, a IL-6 encontra-se elevada nas situações de hiperglicemia (**Espósito K et al., 2002**). A IL-10 é uma citocina inibidora de macrófagos, de células dendríticas e de células T e está, portanto, envolvida no controle das reações autoimunes e das doenças inflamatórias crônicas.

O DM tipo 2 resulta da secreção diminuída de insulina e do aumento da resistência à insulina, afetada por fatores genéticos e ambientais, incluindo a obesidade (**Frostegård J et al., 2013**). A obesidade induz hipertrofia do tecido adiposo, aumento da produção de leptina e ativação celular (**Esser N et al., 2014**). Na obesidade e no diabetes tipo 2, o tecido adiposo induz uma resposta inflamatória com participação de macrófagos e linfócitos T (**Esser N et al., 2014; Cruz NG et al., 2013**). As células TCD8⁺, TCD4⁺, Th1 e Th17 estimulam a polarização de macrófagos para macrófagos tipo 1 que se caracterizam pelo perfil inflamatório. O desequilíbrio entre células ativadoras e moduladoras do sistema imune resulta na produção elevada de quimiocinas e de citocinas pró-inflamatórias que aumentam a fosforilação da serina e inibição da fosforilação da tirosina resultando em resistência periférica à insulina (**Cruz NG et al., 2013; Navarro-González JF et al., 2008**). Apesar do DM está associado ao aumento da resposta inflamatória, a hiperglicemia reduz a função fagocítica diminuindo a migração e a capacidade microbicida dos neutrófilos (**Insuela D et al., 2019**). Essas alterações são importantes nas complicações da doença. Pacientes diabéticos têm maior frequência de infecções causadas pelo *Streptococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e por fungos como a *Candida albicans* (**Joshi N et al., 1999; Casqueiro J et al., 2012**). Com relação à infecção causada por agentes intracelulares, o DM aumenta a susceptibilidade e modifica a apresentação da infecção causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (**Hodgson K et al., 2015**).

2.3. DIABETES TIPO 2: ALTERNATIVA TERAPÊUTICAS

Enquanto o uso da insulina é mandatório para o controle do DM tipo 1, uma série de drogas pode ser utilizada no tratamento do DM tipo 2. O controle inicial da doença exige uma mudança no estilo de vida, combinando uma dieta regrada e atividades físicas regulares. Quando essas providências não resultam em redução efetiva da hiperglicemia, é necessário o uso contínuo de medicamentos (**Ferreira V A et al., 2014**). O fármaco de primeira escolha por via oral em pacientes com diabetes tipo 2 é a metformina, um hipoglicemiante capaz de reduzir a liberação hepática de glicose e aumentar sua captação nos tecidos periféricos, diminuindo, assim, a glicemia (**Hasan F M et al., 2014**). Entretanto, o exato mecanismo molecular da ação hipoglicemiante ainda é desconhecido (**Fain J A et al., 2006; Chai T F et al., 2012**). Além da metformina, existem vários antidiabéticos, sendo os mais utilizados a glibenclamida e a glicazida. É importante destacar que a glibenclamida, uma droga antidiabética, diminui os níveis de IL-1 β e TNF (**Carvalho A et al., 2020**). Recentemente foi mostrado que as células T CD8⁺ induzem patologia pela ativação do inflamassoma (NLRP3) e produção de IL-1 β em camundongos infectados com *L. braziliensis*, e os inibidores de NLRP3 reduzem a patologia (**Novais FO et al., 2017**).

2.4. ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo a infecção humana considerada ocasional. Porém, em muitos casos os reservatórios selvagens ou domiciliares não são bem documentados. Mais de uma dezena de espécies de leishmania podem causar doença no homem sendo a transmissão feita pela picada de flebótomos fêmeas. Mais de 30 espécies de flebótomos podem transmitir as diferentes espécies de leishmania (**Vexenat et al., 1986, Miranda JC et al., 2002**). O gênero *Leishmania* compreende parasitos

com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão do agente infeccioso de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. A medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitos que são fagocitados por outros macrófagos. Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Luzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo se diferenciam em formas flageladas que são morfológicas e bioquimicamente distintas das amastigotas (**Killick-Kendrick R. et al., 1991**). Com a multiplicação destas formas, existe perda da fonte de energia, ocasião em que os flebotomos fazem o repasto sanguíneo. Nesta fase, as formas promastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas e são inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada.

O homem é considerado um hospedeiro acidental das leishmanias e parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitos na natureza. Constitui-se exceção a *Leishmania donovani*, na qual o homem é uma fonte importante de armazenamento do parasito e tem papel na cadeia transmissora. As leishmanioses que se caracterizam por manifestações na pele ou nas mucosas são classificadas como leishmaniose tegumentar (LC) e quando o parasito acomete diversos órgãos, como o baço, medula óssea e gânglios linfáticos, é denominada leishmaniose visceral (LV) (**MS 2017**).

As leishmanioses foram inicialmente descritas na Ásia, África e Europa. A *Leishmania tropica* e a *Leishmania major* são as principais espécies causadoras de leishmaniose cutânea no Velho Mundo e a *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum* as principais espécies causadoras da

LV. A LTA é causada, predominantemente, pelas *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania guyanensis*. No entanto, mais de uma dezena de espécies de leishmania podem causar doença no homem nas Américas, tais como a *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. infantum*, *L. shaw* e *L. lainsoni*. **(Desjeux et al, 1992; Lainson et al., 1983).**

Na Tabela 1 estão apresentadas as espécies de *Leishmania* com as doenças causadas por estes parasitos no homem e os principais flebótomos transmissores destes agentes infecciosos.

Tabela 1. Espécies de *Leishmania*, Formas Clínicas e Principais Vetores.

Espécies de <i>Leishmania</i>	Forma clínica	Espécies de flebótomos
<i>Leishmania infantum</i>	LV	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia evansi</i>
<i>Leishmania infantum</i>	LV, LC	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>Phlebotomus tobbi</i> , <i>Phlebotomus neglectus</i>
<i>Leishmania donovani</i>	LV	<i>Phlebotomus argentipes</i> , <i>Phlebotomus orientalis</i> , <i>Phlebotomus martini</i>
<i>Leishmania tropica</i>	LC	<i>Phlebotomus sergenti</i>
<i>Leishmania major</i>	LC	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus duboscqi</i> , <i>Phlebotomus salehi</i> , <i>Phlebotomus bergeroti</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	LC, LM, LD	<i>Nyssomyia intermedia</i> , <i>Nyssomyia whitmani</i> , <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia ovallesi</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	LC, LCD	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania guyanensis</i>	LC, LM	<i>Lutzomyia umbratilis</i> , <i>Lutzomyia anduzei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i>
<i>Leishmania mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i> , <i>Lutzomyia shannoni</i> , <i>Lutzomyia diabolica</i>

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose como uma das seis mais importantes doenças tropicais por sua alta prevalência, morbidade e mortalidade. Estima-se a ocorrência de 500 mil casos de LV e de cerca de 1 a 1,5 milhões de casos da LT por ano nos quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) distribuídos em 88 países (Alvar J *et al.*, 2012). No Brasil, a LTA tem distribuição em todas as regiões, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste. Segundo dados do DATASUS, de 2008 a 2018 houve 416.385 casos de LTA no Brasil, notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN NET), sendo 343.254 (73.5%) destes concentrados no Norte e Nordeste. Nessas regiões, destacam-se os estados da Bahia e Pará com os maiores números de casos, 34.894 e 38.204, respectivamente.

A LC ocorre predominantemente nas áreas rurais de florestas e matas e em jovens do sexo masculino. Entretanto, nas últimas décadas com as mudanças na ecologia e predominantemente nas condições climáticas, a doença deixou de ocorrer somente nestas áreas, mas também no peri e no intra-domicílio, e passou a ser observado um aumento no número de casos em crianças, mulheres e em idosos (Jirmanus L *et al.*, 2012).

2.5. FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A LC é a forma mais comum de apresentação de LTA, ocorre em mais de 90% dos casos em áreas de transmissão de *L. braziliensis* e caracteriza-se por uma lesão papular que evolui para a úlcera leishmaniotica. A linfadenopatia regional é uma manifestação frequente na doença causada pela *L. braziliensis* e pode ser a primeira manifestação da LC (Barral A *et al.* 1995). A úlcera clássica é caracterizada pela infiltração nas bordas da lesão e fundo granuloso.

A LM caracteriza-se por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores sendo a mucosa nasal afetada em mais de 90% dos casos (**Lessa MM et al., 2008**). A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea ocorrendo habitualmente após ou durante o tratamento da LC. Estima-se que 3% a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa, diagnosticado geralmente anos após a doença cutânea, ou menos frequentemente, concomitante ou após algumas semanas da lesão cutânea. Porém, a lesão primária da mucosa nasal pode ser documentada (**Jones TC et al. 1987**). A LM é considerada uma forma grave, agressiva e hiperérgica da LTA. O quadro clínico da doença mucosa se caracteriza por coriza, obstrução nasal, crosta e, em alguns casos, pode haver presença de odor fétido. Em cerca de 1% dos casos de LM, pode haver acometimento apenas da laringe, faringe e da boca (**Lessa MM et al., 2008**).

A LCD é uma doença rara e no Brasil está associada à infecção por *L. amazonensis*. É caracterizada por lesões nodulares não ulceradas e a histopatologia mostra uma predominância de macrófagos com grandes números de formas amastigotas do parasito no seu citoplasma. Esta apresentação clínica está relacionada com diminuição da resposta imune celular (**Barral A et al., 1995**).

A LD é uma forma emergente da LTA que se caracteriza pela presença de 10 ou mais lesões acneiformes, papulares e ulceradas em pelo menos duas partes distintas do corpo não contíguas. O paciente habitualmente apresenta uma lesão ulcerada clássica e subitamente após dias ou semanas da lesão primária, tem um episódio de febre e calafrios seguido do aparecimento das múltiplas lesões. O acometimento da mucosa nasal é descrito em até 44% dos casos (**Turetz et al, 2002; Machado PR et al, 2011**). É considerada uma forma grave e de difícil manejo terapêutico (**Machado PR et al., 2015**).

Existem também formas atípicas da doença como as lesões vegetantes observadas em gestantes e lesões grandes como as observadas em pacientes coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (**Guimarães LH et al., 2009; 2016**).

Cerca de 10% dos indivíduos residentes em áreas endêmicas de *L. braziliensis* têm evidência de infecção, mas não apresentam doença, o que caracteriza a forma subclínica ou inaparente da infecção (**Follador et al., 2002; Bittar RC et al., 2007**). O diagnóstico é baseado em um teste de hipersensibilidade tardia com antígeno de leishmania positivo ou pela documentação da produção de IFN- γ em culturas de células sanguíneas estimuladas com antígeno de leishmania em indivíduos sem histórico pregresso de LTA (**Schnorr D et al., 2012**).

2.6. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A LC é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor. A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões (**Marzochi MC. A et al., 1992**). A confirmação do diagnóstico é feita pela documentação de amastigotas em análise histopatológica ou mesmo em raspados da lesão após coloração pelo método de Giemsa, como no caso de *L. guyanensis* (**Furtado T et al., 1980**). No caso da doença causada pela *L. braziliensis*, o diagnóstico pode ser comprovado por análise histopatológica ou pela documentação de DNA da *L. braziliensis* por reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.7. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O controle das infecções causadas por agentes intracelulares é predominantemente dependente da resposta imune celular e está relacionado com a produção de IFN- γ , que é o principal fator ativador de macrófagos e, conseqüentemente, estimula a destruição do parasita por estas células (Scott P *et al.*, 1988). Contudo, em indivíduos naturalmente resistentes à infecção por *L. braziliensis*, residentes em área endêmicas e com infecção subclínica o controle do processo infeccioso está associado à resposta imune inata, e se caracteriza por diminuição da penetração da *Leishmania* em monócitos e maior atividade leishmanicida de macrófagos (Giudice A *et al.*, 2012; Muniz AC *et al.*, 2016).

Na LCD, os linfócitos produzem pouco ou não produzem IFN- γ quando estimulados com antígenos do parasito (Barral-Netto M *et al.*, 1986; Bonfim G *et al.*, 1996). A ausência de resposta imune celular a antígenos de leishmania se associa com lesões múltiplas e nodulares e com muitos parasitos nos macrófagos (Barral A *et al.*, 1995). Entretanto, pacientes com LC causada por *L. braziliensis* produzem concentrações elevadas de quimiocinas e citocinas próinflamatórias incluindo IFN- γ , mas esta exuberante resposta Th1 não impede o desenvolvimento da doença. Adicionalmente, esta resposta inflamatória exagerada contra o parasita resulta em dano tecidual e desenvolvimento da úlcera (Unger A *et al.*, 2009; Bacellar O *et al.*, 2002).

Com isso, as evidências indicam que enquanto a produção de IFN- γ se relaciona com proteção, a citotoxicidade mediada por células TCD8⁺ está associada com a patologia. A citotoxicidade mediada pelas células TCD8⁺ está relacionada com a intensidade do processo inflamatório e a lesão tecidual (Santos C *et al.*, 2014; Cardoso TM *et al.*, 2015). Monócitos/macrófagos de pacientes com LC apresentam uma maior explosão respiratória, secretam citocinas pró-inflamatórias em concentrações elevadas, mas têm uma diminuição da capacidade

leishmanicida em comparação com células de indivíduos com infecção subclínica e indivíduos saudáveis (**Cardoso T M et al., 2015; Carneiro PP et al., 2016**).

Além disso, a associação do antimonial pentavalente, principal droga recomendada no Brasil para tratamento das leishmanioses, com drogas que diminuem a resposta inflamatória como a pentoxifilina ou o fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é mais eficaz que o antimonial isoladamente e cura pacientes refratários ao antimonial (**Almeida RP et al., 2005; Lessa HA et al., 2001**).

Estes dados mostram que a resposta imune à infecção por *L. braziliensis* se relaciona com controle da doença, mas também com a lesão tecidual. Embora a ênfase seja dada ao papel da resposta imune na patogênese das leishmanioses, não há dúvida que o parasito tem um papel de grande relevância na determinação da gravidade da doença e na resposta ao tratamento. A *L. braziliensis* é polimórfica na área endêmica de Corte de Pedra e diferenças genotípicas entre isolados da mesma espécie se associam com diferentes formas clínicas da LTA (**Schriefer et al., 2004; Queiroz A et al., 2012**). O antígeno solúvel de leishmania produzido com isolados de pacientes com a forma disseminada da doença induz maior produção de TNF e de IFN- γ que antígenos preparados com isolados de pacientes com LC (**Leopoldo PT et al., 2006**). A regulação da resposta imune tem um papel fundamental na homeostasia do sistema imunológico e participam desta regulação macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas e citocinas reguladores da resposta imune.

Nos pacientes com LTA tem sido documentado um defeito na modulação da resposta imune. Comparado com indivíduos saudáveis, a modulação da resposta imune exercida pela IL-10 e TGF- β é menor em pacientes com LC e com LM (**Bacelar O et al., 2002**). Esse defeito na modulação da resposta imune é mais evidente na LM do que na LC e a menor frequência e

intensidade da expressão do receptor para IL-10 em pacientes com LM pode explicar a resposta imune mais exacerbada na LM do que na LC (**Farias DR et al., 2005**).

2.8 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

O antimônio trivalente foi a primeira droga a ser usada no tratamento das leishmanioses e durante mais de 50 anos os antimônios pentavalentes foram as únicas drogas usadas no tratamento dessa doença. A dose recomendada de antimônio pentavalente para tratamento da LC é de 20mg/Sb^v/Kg/dia por 20 dias. As principais drogas no mercado são o Glucantime[®] (Sanofi Aventis), que é o antimônio de meglumina e o Pentostan[®] (**Gontijo B et al., 2003**). A droga recomendada de primeira escolha pelo Ministério da Saúde do Brasil é o Glucantime[®]. A administração é predominantemente por via endovenosa, mas em crianças a via intramuscular pode ser usada. Se não houver cura após 90 dias de início do tratamento, o Glucantime deve ser usado na mesma dose, mas por 30 dias. Em caso de nova falha ao tratamento, a droga de segunda escolha é a anfotericina B. A anfotericina B é mais eficaz que o antimônio pentavalente, mas seu uso é limitado pelo custo elevado, necessidade de internação hospitalar e a toxicidade principalmente por causar insuficiência renal (**Neves LO et al., 2011**). Várias outras drogas como a pentamidina e a aminosidina têm se mostrado eficazes no tratamento das leishmanioses (**González U et al., 2009**), mas também pelas reações adversas estas drogas têm uso limitado. Várias drogas de uso oral têm sido testadas no tratamento da LTA com resultados contraditórios.

Recentemente, em um estudo aberto e não controlado e com a utilização de diferentes doses, o Fluconazol foi eficaz no tratamento da LC causada por *L. braziliensis* (**Sousa AQ et al.,**

2011). Entretanto, em um estudo randomizado com a utilização do Fluconazol na dose (6,58,0 mg / kg /durante 28 dias), a falha terapêutica foi observada em (78%) de pacientes com LC (Prates FV *et al.*, 2017). A miltefosina é a única droga oral recomendada para o tratamento das leishmanioses. A miltefosina é uma droga antitumoral e foi utilizada com sucesso no tratamento da LV na Índia (Sundar S *et al.*, 2013), e na LC causada por *L. braziliensis* e por *L. guianensis* (Machado PM *et al.*, 2010; Chrusciak-Talhari A *et al.*, 2011, Peixoto F *et al.* 2020).

Pacientes com LV causadas pela *L. donovani*, *L. infantum* e a *L. aethiopica* têm sido tratados com a Anfotericina B na sua forma lipossomal, com menor toxicidade associada à terapia, redução no tempo de hospitalização e no tempo de cura da doença, além de taxa de cura mais elevada, em comparação com antimonial pentavalente (Minodier & Parola *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2007; Wortmann G *et al.*, 2010). A anfotericina B lipossomal tem sido pouco utilizada na LC mais sua eficácia em pacientes com LC, LM e LD refratários a antimonial pentavalente tem sido bem documentada (Minodier & Parola, 2007; Solomon *et al.*, 2007; Wortmann G *et al.*, 2010). O alto custo desta medicação é o principal fator limitante deste tratamento em países pobres, onde a leishmaniose é mais endêmica (Minodier & Parola, 2007; Solomon *et al.*, 2007; Wortmann G *et al.*, 2010).

2.9 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM DIABÉTICOS

Existe uma carência de estudos sobre a influência do DM nas leishmanioses. Recentemente foi publicado um relato de caso com três pacientes residentes no Marrocos que apresentavam concomitantemente LC e DM (Chiheb S *et al.*, 2012). O Marrocos é uma área de transmissão de *L. major*, mas não foi documentado neste relato a espécie da leishmania causadora de doença. Um destes três pacientes apresentava lesão vegetante, ou seja, uma forma atípica da

LC (**Chiheb S et al., 2012**). Não houve também informação sobre a droga utilizada para tratamento e a resposta terapêutica. Recentemente foi mostrado que o DM induz um perfil pró-inflamatório e eleva a produção de LTB4 em pacientes com leishmaniose cutânea, o que pode prejudicar o processo de cicatrização da lesão e a capacidade de eliminar o parasita (**Silva I B et al., 2020**). Tanto as alterações na resposta imune inata quanto a resposta adaptativa observada no DM podem facilitar ou tornar mais grave a infecção causada pela leishmania. Alternativamente, a redução da resposta inflamatória induzida pelos hipoglicemiantes orais como a glibenclamida poderia atenuar o dano tecidual e tornar a leishmaniose mais branda e com melhor resposta ao tratamento em diabéticos do que em não diabéticos. Desta forma, como na LTA a resposta imune pode contribuir tanto para o controle da infecção como resultar em dano tecidual, a doença em diabéticos poderia ser tanto mais grave como mais atenuada, na dependência da resposta imunológica desenvolvida contra o parasito e da resposta imune patológica. Neste trabalho, avaliamos a influência do diabetes mellitus nas manifestações clínicas, resposta imune e na resposta ao tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea causada pela *L.braziliensis*. Os resultados deste estudo podem ajudar a preencher uma importante lacuna no conhecimento acerca da influência do diabetes e seu tratamento na leishmaniose tegumentar.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se o DM modifica as manifestações clínicas, a resposta imune e a resposta ao tratamento da LC causada pela *L. braziliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar o tipo, número, tamanho e localização da lesão em pacientes com LC com ou sem DM.
2. Comparar a os aspectos histopatológicos das lesões de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* e portadores ou não de Diabetes Mellitus
3. Avaliar se o DM modifica a resposta terapêutica ao antimonial pentavalente em pacientes com LC.

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

No período de janeiro de 2017 a junho de 2020, foram atendidos na Unidade de Saúde de Corte de Pedra, centro de referência para diagnóstico e tratamento de LTA, 2.619 pacientes com LC, e desses, 152 eram diabéticos. Os critérios de inclusão foram diagnósticos confirmado de LC, sexo e idade entre 18 e 60 anos e duração da doença entre 20 e 60 dias. Com base nesses critérios participaram do estudo 36 pacientes com DM e LC e 36 com LC sem DM, atendidos no Posto de Saúde no mesmo dia que os diabéticos pareados por idade (± 5 anos).

Todos os participantes deste estudo tiveram conhecimento, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1) e o projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, aprovado em 20-12-2012- Cadastro 25/12.

4.2. CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi inicialmente baseado nos dados da nossa área endêmica, a falha terapêutica em pacientes com leishmaniose cutânea do dia 90 ocorre em cerca de 50% dos casos e estimando-se que nos diabéticos a falha seria observada em 85% dos pacientes, com um poder de 80% e significância de $P < 0.05$, 60 pacientes (30 por grupo) foram necessários para realização do estudo.

4.3. LOCAL DO ESTUDO

O povoado de Corte de Pedra está localizado a 280 km a sudeste de Salvador, capital do estado da Bahia (Figura 1). A importância desta região como uma área endêmica de LTA e de transmissão de *L. braziliensis* é conhecida há mais de 40 anos. O Centro de referência para LTA, foi criado há cerca de 33 anos em Corte de Pedra, município de Presidente Tancredo Neves e atende a pacientes de 20 municípios, compreendendo 9.935 km² com uma população de 454.000 habitantes.

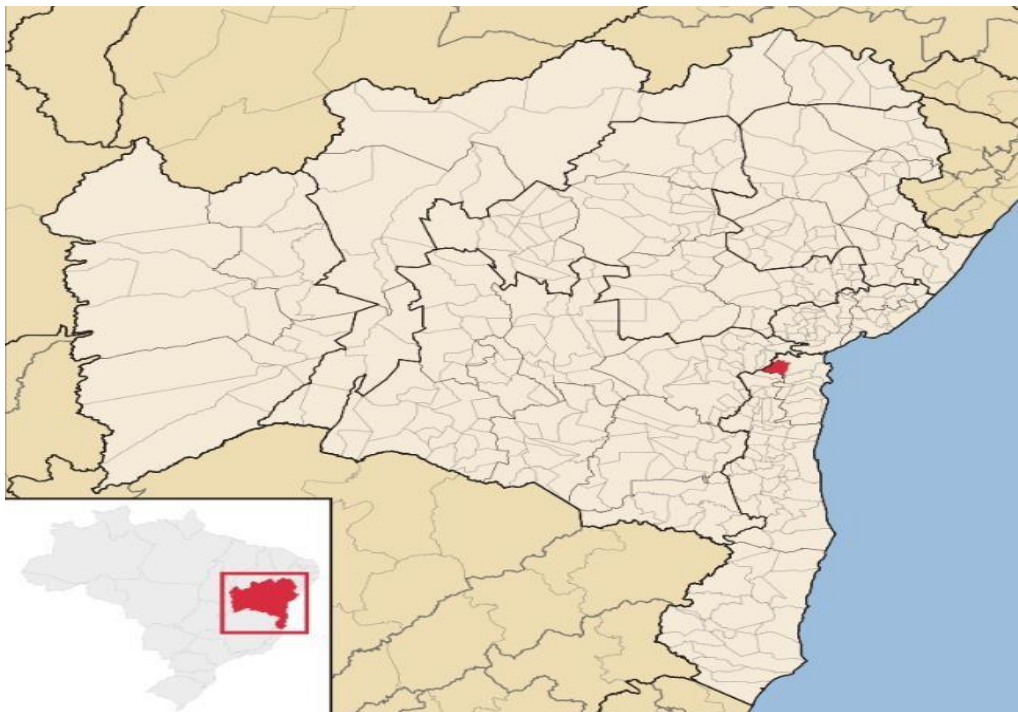


Figura 1: Mapa do estado da Bahia. Em vermelho, a área endêmica de Corte de Pedra.

4.4. DEFINIÇÃO DE CASOS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Todos os pacientes que procuram o Centro de Referência foram submetidos a uma anamnese e exame físico. A história prévia de leishmaniose, duração da doença, número e tamanho das lesões, localização das úlceras, bem como a presença e o tamanho dos linfonodos satélites foram computados. A definição de casos para o presente estudo foi presença de uma a três lesões cutâneas ulceradas com duração da doença entre 15 e 60 dias, e diagnóstico confirmado pela documentação do DNA do parasito pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou documentação de formas amastigotas em estudos histopatológicos de tecidos biopsiado de lesão. Os pacientes com LC e DM tiveram hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ e glicemia de jejum $\geq 126\text{mg/dL}$ ou pós-prandial de $\geq 200\text{mg/dL}$. Foram utilizados como critérios de exclusão pacientes que apresentaram LM ou LD e pacientes com insuficiência renal, insuficiência hepática, cardiopatas e indivíduos infectados pelo HIV.

4.5. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *L. BRAZILIENSIS* E PCR EM TEMPO REAL

As biópsias utilizadas para confirmação da doença foram coletadas a partir da borda da lesão do paciente e armazenadas em tubos eppendorfs de 1,5mL, contendo RNA later (Thermo Fisher, Inc.). A partir desta etapa, o DNA genômico foi extraído, utilizando o kit de extração DNA Purification Kit - Promega® e, em seguida, armazenado a -20°C . Após a obtenção do DNA genômico, ensaios RT-PCR foram realizados. A determinação de espécies de *Leishmania* foi realizada por ensaios utilizando Custom TaqMan Gene

Expression Assay® (Applied Biosystems Inc., EUA), utilizando a sequência do iniciador baseada em KDNA3, específica para *L. (V.) braziliensis* (Weirather JL *et al.*, 2011).

4.6. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

A biópsia da borda da lesão foi realizada com “punch” de 4mm após anestesia local, e o fragmento obtido foi acondicionado em tubos eppendorfs com solução de formol a 10% e encaminhado ao laboratório de histotecnologia do Instituto Gonçalo Moniz-FiocruzBahia para análise histopatológica.

4.7. ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

O estudo imuno-histoquímico das biópsias de pele foi realizado no LAPEC do Instituto Gonçalo Moniz-Fiocruz-Bahia. Foram utilizados anticorpos para macrófagos (antiCD68), para linfócitos B (anti-CD20), células TCD8⁺, (linfócitos TCD8⁺) e Granzima B. Resumidamente, após o bloqueio da atividade da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos e bloqueio das proteínas com Protein Block SerumFree (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo monoclonal anti-CD20, anti-CD68, anti-CD56, anti-CD4, anti-CD8 e anti-granzima B (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Mouse and Rabbit Peroxidase Kit / Horseradish Peroxidase KP500 (Diagnostic Bio-Systems, Pleasanton, CA, EUA) foram usados para realizar as reações de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

Foram coletados 30ml de sangue de pacientes com LC com e sem diabetes em tubos heparinizados no dia 0. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas através do gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Healthcare BioSciences AB, Sweden) por centrifugação (400 G). As CMSP foram lavadas duas vezes em solução salina (NaCl 0,9%) e ressuspensas na concentração de 3×10^6 ml em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina (0,5mg/mL) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA). As CMSP foram cultivadas em placas de 24 poços na presença e/ou ausência do antígeno de solúvel de leishmania 5µg/ml durante 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -70°C. A produção de IFN-γ, TNF, CXCL10 e IL-1β foi determinada pela técnica de ELISA “sandwich” com reagentes da R&D Systems, (Minneapolis, MN).

4.9. TRATAMENTO

Todos os pacientes foram tratados com Glucantime®, Sanofi Aventis, Brasil na dose 20 mg/Kg/dia por 20 dias. A falha terapêutica foi definida pela ausência de cicatrização da lesão após 90 dias do início do tratamento ou presença de bordas elevadas e infiltradas em úlcera cicatrizada.

4.9.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados nas fichas clínicas foram registrados em um banco de dados. Os dados da idade são apresentados como média \pm DP e as demais variáveis contínuas são apresentadas como medianas e intervalo de confiança. Como a amostra não apresentava distribuição normal, a análise estatística foi realizada com testes não paramétricos, exceto no caso de idade que foi utilizado o teste T de Student. Os dados categóricos foram comparados utilizando o teste exato de Fisher, e para variáveis contínuas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Esse teste também foi usado para avaliar as diferenças entre concentrações de citocinas entre os dois grupos. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 2: TABELA CRONÓLOGICA DE PROCEDIMENTOS

	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Exames clínicos	X	X	X	X
Foto da lesão	X	X	X	X
Resposta imune	X			
Biópsia	X			
Teste glicêmico	X	X	X	X
Resposta terapêutica		X	X	X

5. RESULTADOS

As características clínicas e demográficas dos 36 pacientes com LC + DM e dos 36 controles de LC sem DM são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com ou sem Diabetes Mellitus

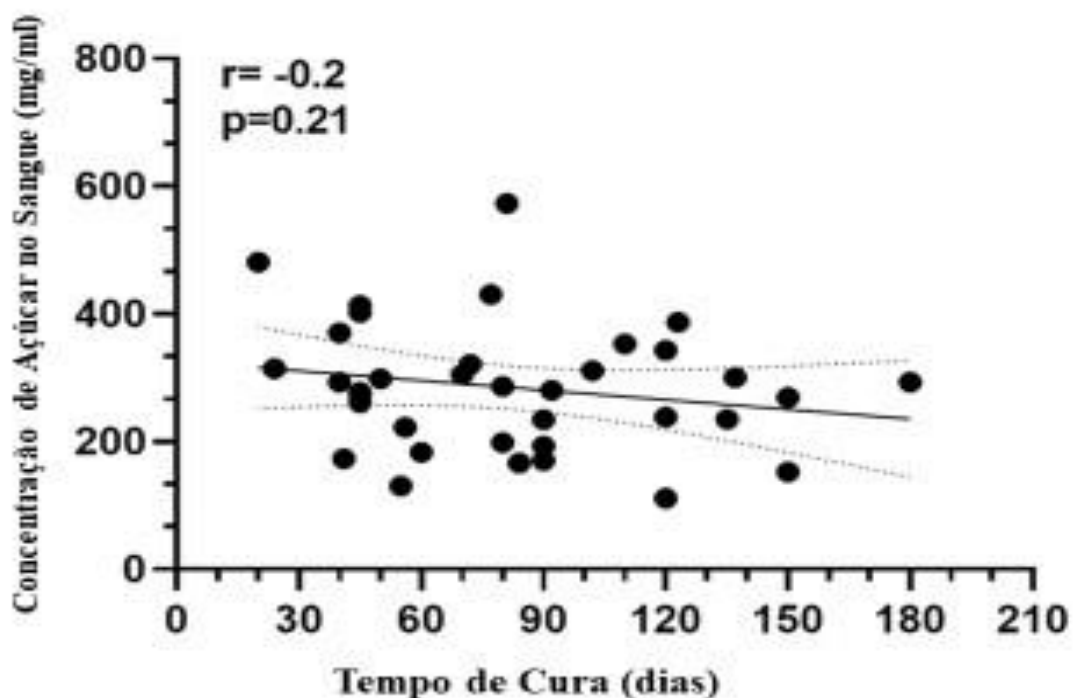
Características Demográficas e Clínicas	Diabetes N=36	Não Diabetes N=36	Valor P
Idade (média ± SD)	49 ± 12	39 ± 13	0.01
Gênero # feminino (%)	23 (64%)	20 (56%)	ns
Duração da doença (dias) (mediana,CI)	35 (34-51)	40 (36-47)	ns
Frequência de lesões acima da cintura	13 (36%)	8 (22%)	ns
Número de lesões (média /DP)	(1,5± 0.7)	(1,3± 0.7)	ns
Mais de uma lesão	15 (42%)	6 (17%)	ns
Presença de lesões atípicas (%)	13 (36%)	0 (0%)	P<0.0001
T Tamanho da lesão principal (mm) (mediana,CI)	20 (17-31)	19 (18-24)	ns
Diâmetro da lesão principal (mediana,CI)mm	185 (215-712)	246 (247-465)	ns
Frequência de linfadenopatia (%)	17 (47%)	20 (56%)	ns
Cura em 60 dias (%)	14-(39%)	17-(47%)	ns
Cura em 90 dias (%)	24-(67%)	20-(56%)	ns
Falha terapêutica ao antimonial (%)	12- (33%)	16-(44%)	ns
Tempo de cura (dias) (mediana,CI)	80- (69-96)	83-(74-116)	ns

Dados registrados por ocasião da entrada dos pacientes no estudo **ns** não significante, **CI** intervalo de confiança.

Consideramos o pareamento de sexo, não houve diferença nos dois grupos com relação a essa variável. Também não houve diferença com relação às outras variáveis clínicas como duração da doença, tamanho de lesão e localização das lesões, número de lesões. A cura foi definida por cicatrização completa da lesão e reepitelização da pele na ausência de bordas elevadas nos dias 60 e 90 após início do tratamento. Falha terapêutica foi definida pela documentação de lesão ativa ou úlcera cicatrizada, mas com bordas elevadas. Não houve diferença na resposta terapêutica nos dois grupos de pacientes. Houve diferença estatística com relação à idade e à presença de lesões atípicas nos pacientes com LC + DM quando comparados com o grupo controle.

Em todos os casos foram obtidas informações a respeito das drogas utilizadas para controle do diabetes por ocasião do aparecimento da úlcera, possíveis fatores envolvidos no desencadeamento da doença e a glicose sanguínea expressa mg/dL foi medida nos dias 0, 30, 60 e 90. Com a finalidade de avaliar se a glicemia interferia na cura da doença foi avaliada a existência de correlação entre a glicemia no sangue no dia 0 e o tempo de cura a doença (Figura 2).

Figura 2. Correlação entre a Glicêmica no dia 0 e Tempo de Cura.



Como mostra a Figura 2, não houve correlação entre a concentração de glicose sanguínea e o tempo de cura, sugerindo que a taxa de açúcar não interferiu na falha terapêutica.

Com relação ao tipo de droga utilizada para tratamento do DM, dos 36 pacientes diabéticos, sete usavam insulina, 15 usavam glicazida, 13 usavam glibenclamida e um usava glimeperida. Cerca de 22 pacientes usavam metformina isoladamente ou em associação com um desses hipoglicemiantes orais acima citados. Não encontramos associação entre a glicemia e resposta ou falha terapêutica. Por exemplo, em 14 pacientes com glicemia acima de 300 no dia zero, 5 (36%) falharam ao tratamento. Dos 22 pacientes com glicemia abaixo de 299, seis (27%) não tiveram resposta ao antimonial. Também não encontramos relação entre o desfecho do tratamento com o tipo de droga utilizada para o controle do diabetes.

A análise histopatológica foi realizada em oito pacientes com LC e DM e em 10 pacientes LC sem DM e o estudo imunohistoquímico em sete pacientes de cada grupo. Os principais achados histopatológicos dos pacientes com LC com e sem DM são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Análise Histopatológica das Lesões de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com ou sem Diabetes.

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

a. *Fischer's exact test,*

b. Análise com 5 pacientes

c. Análise com 6 pacientes

Não houve diferença na maioria dos achados que são habitualmente observados em pacientes com LC, como acantose, hiperqueratose e hiperplasia da epiderme, formação de granuloma e número de amastigotas. Porém, enquanto focos de necrose foram observados em todos os pacientes com LC sem DM, esse achado foi documentado em somente 50% dos pacientes com LC e DM (P<0.05).

A frequência de células CD8⁺, CD20⁺ e CD68⁺ e a frequência de células expressando granzima B são mostrados da Figura 3.

Análise Fenótipica do Infiltrado Celular e da Expressão de Granzima B em

Biópsias de Pacientes com Leishmaniose Cutânea com e sem Diabetes

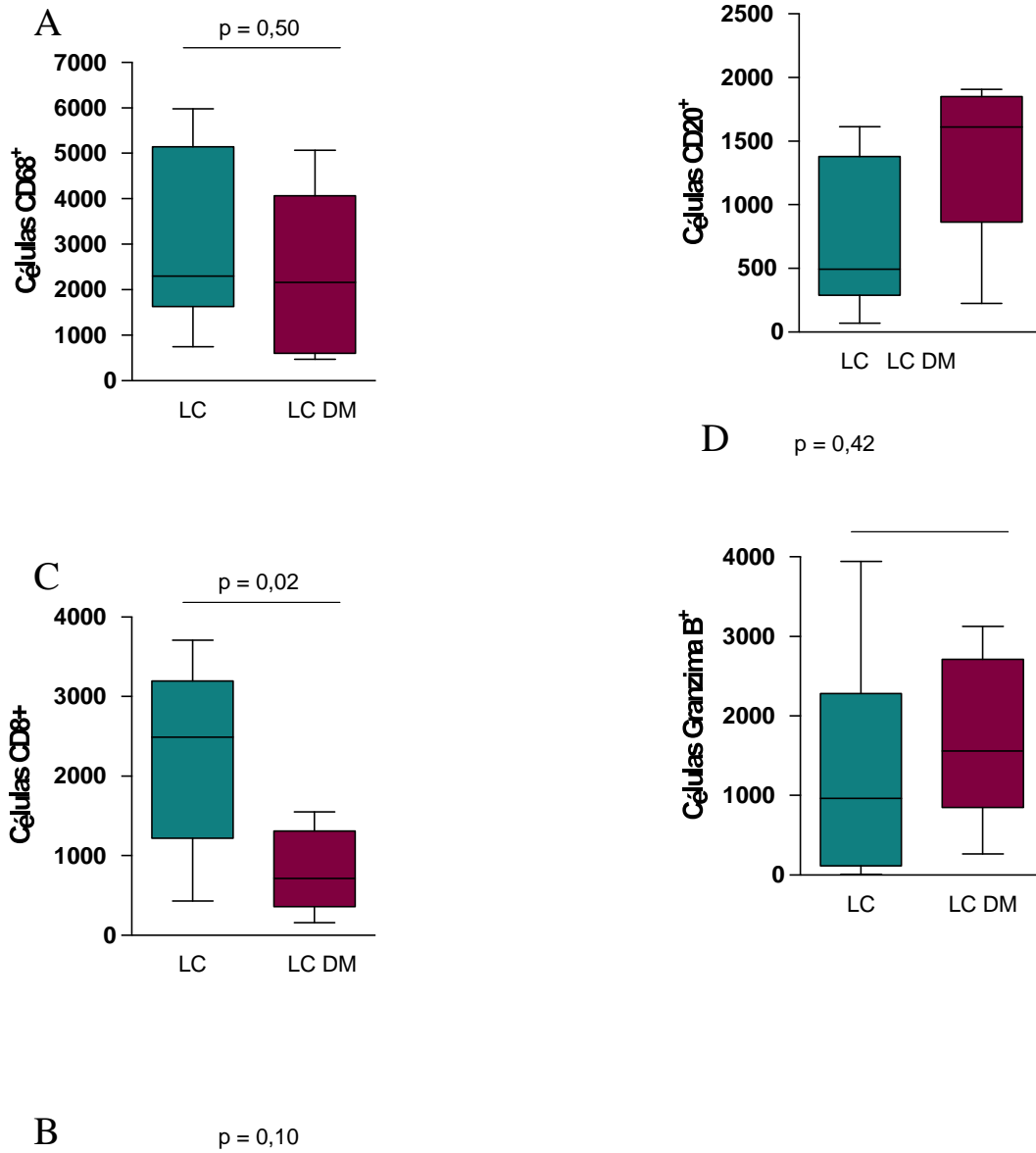


Figura 3. Avaliação imunofenotípica do infiltrado *in situ*. Quantitativo de células imunomarcadas por IHQ para CD68+ (A), CD20+ (B), CD8+(C) e Granzima B+ (D). ns: não significante; teste Mann Whitney ($p > 0.05$). * Mann-whitney $p = 0.02$.

Enquanto não houve diferença na frequência de células expressando CD20⁺ (linfócito B) e CD68⁺ (macrófagos), Figuras 3A, 3B, houve uma diminuição na frequência de células de CD8⁺ em pacientes com LC e DM (Figura 3C), ($p < 0.05$).

A principal diferença, do ponto de vista clínico dos pacientes com e sem DM, foi a presença de úlceras atípicas que foram observadas em 36% dos pacientes com DM. Diferente da lesão clássica da LC, habitualmente representada por uma úlcera oval ou circular com bordas elevadas e bem delimitadas, nos pacientes diabéticos com lesões atípicas, as úlceras eram superficiais ou rasas e com bordas mal definidas. As características clínicas dos 13 pacientes com DM e lesões atípicas e de 23 casos de DM com úlceras clássicas são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5: Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Diabetes mellitus com Lesões Atípicas, Típicas e Controles com Leishmaniose Cutânea sem Diabetes.

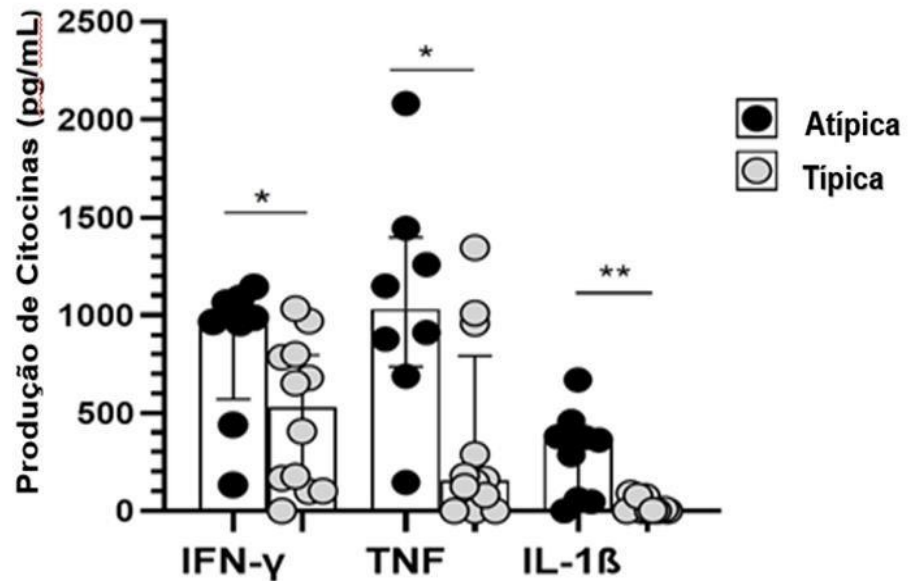
Características Clínica Demográfica	Atípica Nº= 13	Típica Nº= 23	Controle Nº= 36	Valor P
Idade (média ± SD)	48±14	50±11	39±14	0.0003**
Índice de Massa Corporal (mediana, (IC)	27 (26-29)	26 (24-28)	26 (26-30)	Ns
Duração da doença (dias) (mediana, (IC)	35 (27-55)	40 (33-51)	40(36-46)	Ns
Número total de lesões (média ± DP)	1 (1.06-1.8)	1 (1.25-2.13)	1(1.07-1.53)	Ns
Area total da lesão (mediana, (IC)	300 (121-1480)	154 (165-380)	246 (247-464)	0.02
Frequência de lesões acima da cintura	6 (46%)	7 (26%)	8 (22%)	ns
Frequência de pacientes com linfadenopatia	5 (38%)	12 (52%)	20 (53%)	Ns
Concentração de açúcar no sangue (mediana, (IC)	238 (201-301)	293 (258-349)	98 (101- 118)	0.0001
Taxa de falha Terapêutica	9 (69%)	3 (13%)	16 (44%)	0.0017***
Tempo de cura (dias) (mediana, (IC)	115-(74-127)	68-(55-90)	83-(74-116)	Ns

Dados registrados por ocasião da entrada dos pacientes no estudo **ns** não significante, **CI** intervalo de confiança.

Não houve diferença entre os grupos atípicos e típicos com relação à idade, ao sexo, à duração da doença, ao número, e nem com relação à presença de linfadenopatia e à concentração da glicemia. Enquanto nos pacientes com lesões atípicas, o tamanho das lesões era maior, a glicemia foi de 235 (201-301), nos pacientes com lesões típicas a mediana da glicemia foi de 293 (258-349), no grupo controle de LC foi de 98 (101-118). Em adição a concentração sérica da glicose, não houve também influência com relação ao tipo de diabetes nos pacientes com lesões atípicas e clássicas.

O DM tipo 1 foi observado em 3 (25%) dos 13 pacientes com a forma atípica e em 4 (20%) dos 23 pacientes com lesões clássicas. Também não observamos qualquer relação entre a ocorrência de lesões atípicas e clássicas com o tratamento utilizado para o DM. Contudo, as lesões atípicas foram associadas com falha ao tratamento, desde que falha ao tratamento com antimoníato de meglumina foi documentada em 69% dos pacientes com lesões atípicas, em 13% dos pacientes com lesões típicas e em 44% dos pacientes controles com LC e sem DM. Em virtude da maior falha terapêutica, o tempo de cicatrização nas lesões foi maior nos pacientes úlceras atípicas, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

A produção de citocinas em sobrenadantes de células mononucleares estimuladas com antígeno solúvel de leishmania em pacientes com DM com lesões atípicas e em pacientes com lesões clássicas é mostrada na Figura 4.



CMSP de pacientes com DM com lesões atípicas, típica e clássicas foram estimuladas com antígeno solúvel de leishmania (5 μ g/ml) por 72 horas. A produção de citocinas e quimiocina foi determinada através da técnica imunoenzimática (ELISA) e os valores expressos em pg/ml. Os dados são representados como mediana e intervalo interquartil.

A produção de IFN- γ , TNF e IL-1 β em pacientes com DM com úlceras atípicas foram 978- (571–1083) pg/mL, 103-(737–1399) pg/mL e 364-(54–418) pg/mL, respectivamente foi maior ($P < 0,05$) do que nos diabéticos com úlceras típicas 530 (118-796) pg/mL, 156 (20-792) pg/mL e 4 (0-61) pg/mL, respectivamente. Foi também avaliada a produção de citocinas em sobrenadantes culturas de células mononucleares estimulados com antígeno solúvel de leishmania nos pacientes com LC sem DM (controles). Tanto a produção de INF- γ como a de IL-1 β maior nos pacientes com LC sem diabetes 1486 (787-2152) pg/ml e 45 (3–193) pg/ml respectivamente foi maior nos não diabéticos do que em pacientes LC + DM com úlceras típicas, $P < 0,01$. Não houve diferença na produção de TNF e CXCL-10 entre os 2 grupos.

A Figura 5 mostra as lesões de 6 pacientes com diabetes e leishmaniose cutânea, sendo três pacientes com úlceras atípicas e três com úlceras clássicas.

Figura 5: Úlceras Atípicas em 6 Pacientes e Úlceras Clássicas em 3 Pacientes com Diabetes.

1

2

3



4

5

6





7

8

9

As lesões 1 a 6 são lesões atípicas caracterizadas por úlceras superficiais com bordas largas e mal delimitadas em membros superiores em três pacientes do sexo feminino com DM e LC antes do tratamento. As lesões clássicas (Figuras 7, 8 e 9) são caracterizadas por úlceras bem delimitadas com bordas elevadas nos membros inferiores de pacientes com DM e LC antes do tratamento, sendo um paciente do sexo feminino e dois do sexo masculino,

A Figura 6 mostra a evolução de uma lesão atípica de um paciente com LC com DM que apresentou falha terapêutica.

Figura 6. Evolução da Lesão de um Paciente com Lesão Atípica e Falha Terapêutica.

DIA 0

DIA 30

DIA 60

DIA 90

DIA 120



Paciente de 42 anos de idade com DM e LC. A lesão tinha 45 dias de evolução, com tamanho de 55x22mm no dia 0 do tratamento. A lesão teve uma leve melhora no dia 30, mas no dia 60 essa lesão evoluiu com piora, e a cura só foi documentada no dia 120 após o tratamento.

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que o DM aumenta a susceptibilidade e a gravidade das infecções causadas por bactérias extracelulares e por fungos (Geerlings SE *et al.*, 1999), mas o DM é considerado uma doença inflamatória e as complicações da doença, como a retinopatia diabética, estão associadas a um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias (Gomes BF *et al.*, 2019). Entretanto, existe uma carência de informações sobre a influência do DM na apresentação clínica e na resposta terapêutica de pacientes infectados pelo protozoário leishmania. No presente estudo, avaliamos se o DM modifica a apresentação clínica da LC causada por *L. braziliensis*, o agente causal mais importante da leishmaniose tegumentar na América do Sul e Central. Embora tenhamos constatado que a glicemia, o tipo de diabetes, assim como a terapia utilizada para o diabetes não influenciou na gravidade da LC ou na resposta ao tratamento, observamos que 36% dos pacientes com DM e LC apresentavam lesões atípicas, com bordas planas e mal delimitadas. Esses pacientes tiveram um aumento na resposta imunológica inflamatória e tiveram uma alta taxa de falha terapêutica.

Quando comparamos a apresentação clínica e a resposta ao tratamento de 36 pacientes com LC e DM com LC versus 36 casos de LC sem DM, não detectamos diferença entre os grupos na duração da doença, número de lesões, tamanho da maior lesão, frequência de linfadenopatia satélite, taxa de cura e tempo de cura, sugerindo não haver influência importante do DM na LC. Porém, algumas diferenças foram observadas entre os dois grupos. Apesar da tentativa de parear os pacientes quanto à idade e ao sexo, os pacientes diabéticos eram mais velhos do que aqueles sem DM. Além disso, enquanto em uma análise retrospectiva dos casos de LC ocorridos num período de 20 anos no mesmo posto de saúde onde foi realizado o presente estudo, mostrou que entre 781 pacientes com LC (68%) eram do sexo masculino (Jirmanus

L et al., 2012), nos pacientes diabéticos apenas 36% eram do sexo masculino. Ou seja, nos diabéticos a LC estava relacionada com a idade e o gênero.

A predominância do sexo masculino entre os pacientes com LC é principalmente atribuída ao fato do homem ser mais exposto devido a exercer com maior frequência atividades na agricultura. Dá apoio a associação entre exposição e o gênero a observação que em crianças a frequência de LC é semelhante nos gêneros masculino e feminino (**Suprien C et al., 2020**). É possível que as limitações causadas pela doença, façam com que os diabéticos exerçam menos atividades na lavoura, e por isso a ocorrência da LC no sexo masculino seja menor nos diabéticos do que na população geral com LC. Alternativamente a maior frequência de mulheres entre os diabéticos pode ter sido devida ao fato do DM ocorrer mais no sexo feminino.

A elevação da glicemia tem sido associada à mortalidade causada por diversas doenças. Em um estudo prospectivo em pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva, a morte em pacientes com glicemia capilar superior a 180mg/dL foi de 17,7%, em comparação com 2,8% em pacientes com glicemia normal. (**Leite SA et al., 2010**). Em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, a taxa de óbito durante as fases de exacerbação da doença foi associada com elevação da glicemia (**Baker E H et al., 2006**). Em nosso estudo, não observamos associação entre a elevação do açúcar no sangue com a gravidade da LC e não detectamos correlação entre a glicemia e o tempo de cicatrização da úlcera. Além disso, em pacientes com diabetes tipo 1 que, além de apresentar concentrações elevadas de açúcar no sangue, tem habitualmente comprometimento do estado nutricional (**Gross J L et al., 2002**), não observamos alterações na apresentação clínica ou na resposta ao tratamento da LC. Esses dados mostram que a concentração sérica da glicose não interferiu na apresentação nem na resposta ao tratamento da LC.

Tem sido documentado que o DM diminui a quimiotaxia, a fagocitose e a morte de bactérias por neutrófilos e está associado ao aumento da suscetibilidade a infecções bacterianas (Geerlings SE *et al.*, 1999). Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o local de penetração da leishmania (Peters NC *et al.*, 2008) e os neutrófilos são capazes de matar a *Leishmania donovani* (Chang KP *et al.*, 1981; Pearson R (Rafah Oualha *et al.*, 2019; Muller K *et al.*, 2001), no entanto, na LC causada por *L. braziliensis*, apesar dos neutrófilos terem um perfil inflamatório, a capacidade de matar a *Leishmania* é limitada (Conceição J *et al.*, 2016). Embora estudos também mostrem que a interação de neutrófilos com macrófagos podem alterar a sobrevivência intracelular da *Leishmania*. e que os neutrófilos tem impacto no desfecho da infecção por *L. major* em camundongos (Charmoy M *et al.*, 2007), a documentação que o DM e a concentração de açúcar no sangue não modificam a apresentação da LC não dão apoio a um importante papel da glicemia e da função neutrófilos no desfecho de pacientes de com LC e DM.

Embora os neutrófilos participem da resposta inflamatória nos períodos iniciais da infecção causada pela *Leishmania*, os macrófagos e não os neutrófilos, são as principais células que abrigam a *Leishmania* e também são as principais células associadas com a morte desse parasito e o controle da infecção. Em relação às infecções causadas por agentes intracelulares, a associação mais estudada com o DM é a tuberculose. O DM aumenta o risco de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e o desenvolvimento de tuberculose mais grave (Hodgson K *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que o DM diminui a expressão de IL-37 e o controle da infecção por *M. tuberculosis* (MontoyaRosales A *et al.*, 2016).

Nos diabéticos houve também uma produção diminuída de IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, RANTES e CXCL9 por monócitos infectados com o *M. tuberculosis* e uma capacidade diminuída de monócitos para matar o *M. tuberculosis* (Nallely Lopez- Lopez *et al.*, 2018). Na

verdade, na análise histopatológica do tecido de úlceras de pacientes com LC e DM, não houve alteração na frequência de macrófagos e aumento da carga parasitária. Recentemente foi observado que *in vitro* o aumento na concentração de glicose leva uma menor capacidade de destruição da leishmania (Silva *et al.*, 2020). Contudo, no presente estudo não tivemos evidência que a glicemia interfirrisse com a persistência do parasito e consequentemente falha terapêutica. Também não observamos uma maior carga parasitaria nas biopsias de pacientes diabéticos com os sem diabetes.

Os principais achados na análise das úlceras nos dois grupos de pacientes foram uma diminuição na frequência de necrose e na frequência de células T CD8⁺ em pacientes com LC e DM. Recentemente, tem sido dada ênfase ao papel das células T CD8⁺ na patologia da LC causada por *L. braziliensis*. As células CD8⁺ podem ser inflamatórias, citotóxicas e regulatórias e na LC as células CD8⁺ são predominantemente citotóxicas (Cardoso *et al.*, 2015). Essas células, quando cultivadas com macrófagos infectados por *L. braziliensis*, não têm ação leishmanicida, mas destroem os macrófagos infectados (Cardoso *et al.*, 2015). Camundongos depletados de células CD8⁺ infectados com *L. braziliensis* têm uma lesão mais branda e não desenvolvem lesões metastáticas (Novais FO *et al.*, 2017). Estudos têm mostrado que as células CD8⁺, ao destruir células infectadas ou células apresentando antígenos de leishmania, ativam o inflamossoma e aumentam a produção de IL-1 β e essa resposta inflamatória tem papel importante na patogênese da LC. Dessa forma, é possível que a redução do número de células CD8⁺ nas dos pacientes diabéticos com lesões típicas, tenha contribuído para a doença ser mais branda nos diabéticos.

Um achado relevante no nosso trabalho foi a documentação que o DM pode modificar a apresentação clínica da LC com o aparecimento de lesões atípicas associadas com uma diminuição da taxa de cura à terapia com antimoniato de meglumina. A capacidade do DM de

modificar a apresentação clínica da LC está de acordo com um relato recente de um paciente que teve LC devido a *L. major* e apresentou lesões vegetantes (**Chiheb S et al., 2012**). Entretanto, no nosso estudo, a lesão atípica era predominantemente plana, geralmente grande, com bordas mal definidas e em metade dos casos, localizada acima da cintura pélvica. Lesões atípicas são bem descritas em pacientes com LC (**Guimarães L H et al., 2009; Meireles et al., 2017**). Em pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD), que no Brasil é causada pela *L. amazonenses*, os pacientes apresentam lesões nodulares, em vez de lesões ulceradas, com grande número de formas amastigotas em macrófagos. Esse quadro pode ser justificado pela incapacidade de gerar uma resposta Th1 ou uma diminuição dessa resposta que é observada nesses pacientes e conseqüentemente redução da resposta inflamatória. (**Barral A et al., 1995**).

Lesões vegetantes grandes ou úlceras de grande tamanho são também documentadas em gestantes e, nesses casos, há um aumento da resposta Th2 com elevada frequência de células CD4⁺ expressando IL-4 (**Dutra W et al., 2019**). Recentemente, lesões atípicas de LC foram associadas com diferenças genótípicas entre os isolados de *L. braziliensis* (**Guimarães L H et al., 2016**). Nesses casos, lesões ulceradas grandes ou lesões nodulares localizadas em um segmento do corpo foram as apresentações mais comuns.

Do ponto de vista histopatológico, ao invés de uma redução da resposta Th1, esses pacientes apresentaram uma resposta inflamatória exagerada com aumento da produção de IL-17 (**Guimarães L H et al., 2016**). Porém, em nenhuma das condições clínicas acima citadas, as lesões se assemelhavam com o que observamos nos pacientes com DM e lesões atípicas. Esses dados indicam que as úlceras superficiais, sem elevação das bordas e não bem delimitadas são uma característica da LC em DM.

Uma das limitações do presente estudo foi não definir a via inflamatória que está associada com as lesões atípicas. Documentamos que pacientes com LC e DM com úlceras atípicas apresentam elevação das citocinas pró-inflamatórias, o que pode justificar o aparecimento de úlceras atípicas. No futuro, pretendemos estudar em mais detalhes a análise da imunohistoquímica das lesões desses pacientes, assim como a expressão gênica no tecido de úlceras atípicas e clássicas de pacientes com LC e DM.

É conhecido que a concentração de açúcar no sangue pode aumentar a produção de IFN γ , IL-1 β , IL-6 e TNF (Cavalcanti Y V *et al.*, 2012). O papel de uma resposta inflamatória exagerada na patogênese da infecção causada pela *L. braziliensis* é bem documentado, e a participação da IL-1 beta na patologia da leishmaniose tegumentar tem sido mostrada por diferentes autores (Novais F *et al.*, 2013; Silva S C *et al.*, 2014; Cardoso TM *et al.*, 2015; Novais F *et al.*, 2017; Santos D *et al.*, 2018). Nossos dados indicam que pacientes com lesões atípicas apresentam uma resposta inflamatória mais exagerada. A resposta inflamatória exagerada já é uma característica da LC causada por *L. braziliensis*. Como o DM pode também exacerbar essa resposta inflamatória, acreditamos que essas anormalidades sejam a base do aparecimento das lesões atípicas em pacientes com LC e DM.

7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Não houve diferença nos dois grupos (LC com DM e LC sem DM) com relação ao tamanho da maior lesão, localização das lesões e a resposta ao tratamento. Todavia, cerca de 36% dos pacientes com LC com DM apresentavam lesões atípicas caracterizadas por úlceras superficiais e com bordas não definidas. Não observamos associação entre a glicemia e a apresentação clínica da doença com relação à resposta ao tratamento. Também não

encontramos relação entre o desfecho do tratamento com o tipo de droga utilizada para o controle do diabetes.

As lesões atípicas foram associadas com maior produção de citocinas pró-inflamatórias e maior taxa de falha ao tratamento com o antimoniato de meglumina.

8. CONCLUSÕES

Embora nos pacientes com LC com DM, o diabetes e a concentração sanguínea da glicose não tenham influenciado a apresentação clínica e a resposta terapêutica, em um subgrupo de pacientes com essa comorbidade foi observado que o DM resultou no aparecimento de lesões atípicas, diferente das registradas, anteriormente, na LC. Essas úlceras atípicas foram associadas a uma resposta inflamatória exagerada e alta taxa de falha ao tratamento com o antimoniato de meglumina.

9. REFERÊNCIAS

1- Almeida RP, Brito J, Machado PL, DE Jesus AR, Schriefer A, Guimarães LH, Carvalho EM. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. *Am J Trop M9d Hyg.* 73(1):79-81, **2005**.

- 2- Alvar J**, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Jornal pone.* 7(5):e35671, **2012**.
- 3- Bacellar O**, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 70(12):6734-40, **2002**.
- 4- Bailey MS**, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 25(2):203-11, **2007**.
- 5- Baker EH**, Wood DM, Brennan AL, Clark N, Baines DL, Philips BJ. Hyperglycaemia and pulmonary infection. *Proc Nutr Soc.* 5(3):227-35. **2006**
- 6- Barral A**, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* Produces a wide Spectrum of Clinical Disease. *Am J Trop Med Hyg.* 44(5):536-46, **1991**.
- 7- Barral A**, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and Subpolar Diffuse Cutaneous leishmaniasis in Brazil: Clinical and Immunopathologic Aspects. *Int J Dermatol.* 34(7):474-9, **1995**.
- 8- Barral A**, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the First Sign of Human Cutaneous Infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 53(3):256-9, **1995**.
- 9- Barral-Netto M**, Badaró R, Barral A, Carvalho EM. Immunology of cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 19(3):173-91, **1986**.
- 10- Bittar RC**, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to

Leishmania infection in individuals from endemic areas for Leishmania (Viannia) braziliensis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102(5):625-30, **2007**.

11- Bouvy M, “Applied therapeutics: the clinical use of drugs,” Pharmacy World and Science, vol. 19, no. 2, p. 116, **1997**.

12- Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokin Glyburide, a NLRP3 Inhibitor, Decreases Inflammatory Response and Is a Candidate to Reduce Pathology in Leishmania braziliensis Infection patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol. 84(2):188-94, **1996**.

13- Carvalho A, Novais FO, Paixão CS, de Oliveira CI, Machado PRL, Carvalho LP, Scott P, Carvalho EM. J Invest Dermatol. 140(1):246-249.e2, **2020**.

14- Cardoso T M, Machado Á, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, Scott P, Carvalho EM, Bacellar O. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in Leishmania braziliensis infection. Infect Immun. 83(3):898-906, **2015**.

15- Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of Leishmania braziliensis by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. Journal. Pone ,11(2):e0148084, 2016.

16- Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C, “Infections in patients with diabetes mellitus: a review of pathogenesis,” *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, vol. 16, Supplement 1, no. 7, pp. 27–36, **2012**.

17- Conceição J, Davis R, Carneiro PP, Giudice A, Muniz AC, Wilson ME, Carvalho

EM, Bacellar O. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 11;10(5): 2016.

18- Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): Geographical Distribution and the Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil-mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(2):149-53, **2007**.

19- Cruz N G, Sousa L P, Sousa M O, Pietrani N T, A. P. Fernandes A P , K, Gomes K B, “The linkage between inflammation and type 2 diabetes mellitus,” *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 99, no. 2, pp. 85–92, **2013**.

20- Chai, T F, Hong S Y, He H, Zheng L, Hagen T, Luo Y, Yu F X. A potential mechanism of metformin-mediated regulation of glucose homeostasis: Inhibition of thioredoxin-interacting protein (Txnip) gene expression. *Cellular Signalling*. 24, 1700, **2012**.

21- Chang K P. *Leishmania donovani*-macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens: characterization in vitro by a radioisotopic assay. *Mol Biochem Parasitol*. 4(1-2):67-76,**1981**.

22- Charmoy M, Megnekou R, Allenbach C, Zweifel C, Perez C, Monnat K, Breton M, Ronet C, Launois P, Tacchini-Cottier F. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol*. 82(2):288-99. **2007**.

23- Chiheb S, Oudrhiri L, Zouhair K, et al. [Unusual clinical presentation of cutaneous leishmaniasis in three diabetic patients]. *Ann Dermatol Venereol*. 139: 542-5, **2012**.

- 24- Chrusciak-Talhari A**, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 84(2):255-60, **2011**.
- 25- Dantas-Torres F**. The role of Dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with Emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 149(3-4):139-46, **2007**.
- 26-Desjeux P**. Human Leishmaniasis: Epidemiology and Public Health Aspects. *World Health Stat Q.* 45(2-3):267-75, 1992.
- 27- Dutra W O**, Barbosa DF, de Souza PEA, Morgan D, Poetker S, Guimarães LH, Bacelar O, Gollob KJ, Carvalho EM. A Th2-Type Response Is Associated With Exuberant Lesions in Pregnant Women Infected With *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis.* 9; 219 (3):480-488. **2019**.
- 28- Dwivedi G**, Dwivedi S, Sushruta – the Clinician – Teacher par excellence. *Indian Journal of Ches t Disease and Allied Science.* 49, 243, 2007.
- 29- Eisenbarth G S**, “Type 1 diabetes mellitus,” *Joslin’s Diabetes Mellitus*, vol. 14, pp. 399–424, **2005**.
- 30- Esser N**, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen A J, Paquot N, “Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes,” *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 105, no. 2, pp. 141–150, **2014**.

- 31-** Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress.. *Circulation*.106(16):2067-72, **2002**.
- 32-Fain J A**, Miller D K. Pharmacologic interventions for type 1 and type 2 diabetes. *Nursing Clinics of North America*. 41, 589, **2006**.
- 33- Faria D R**, Gollob K J, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado , Lessa H, Carvalho L P, Romano-Silva M A, de Jesus A R, Carvalho E M, Dutra W O. A diminuição da expressão in situ do receptor de interleucina-10 está correlacionada com as respostas inflamatórias e citotóxicas exacerbadas observadas na leishmaniose mucosa. *Infect Immun*. 73(12): 7853-9, **2005**.
- 34- Ferreira V A**, Campos S M B. Avanços farmacológicos no tratamento do diabetes tipo 2. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*. **8, 72, 2014**
- 35- Fernandes A P**, Pace A E, Zanetti M L, Foss M C, Donadi E A. Immunogenetic factors associated with type 1 diabetes mellitus. *Rev Lat Am Enfermagem*.13(5):7439.**2005**.4-
- 36- Follador I**, Araújo C, Bacellar O, Araújo C B, Carvalho L P, Almeida R P, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection.*Clin Infect Dis*. 1;34(11):E54-8. **2002**.
- 37- Furtado, T**. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. *An. Bras. Dermatol.*, [S.l.], v. 55, p. 81-86, **1980**.
- 39- Furtado T**. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J(ed), *Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas*. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p.319-328,**1994**.

- 40- **Frostegård J**, “Immune mechanisms in atherosclerosis, especially in diabetes type 2,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 4, p. 162, **2013**.
- 42-**Geerlings SE**, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*;26(3-4):259-65. **1999**.
- 43- **Gil-Santana L**, Almeida-Junior J L, Oliveira C A, Hickson L S, Daltro C, Castro S, Kornfeld H, Netto E M, Andrade B B. Diabetes Is Associated with Worse Clinical Presentation in Tuberculosis Patients from Brazil: A Retrospective Cohort Study. *PLoS One*.11;11(1):e0146876, **2016**.
- 44- **Giudice A**, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho L P, Delavechia T, Carvalho E M, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection.*BMC Infect Dis*. 29; **12:75**, **2012**.
- 45-**Gomes B F**, Accardo CM. Immunoinflammatory mediators in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Einstein (Sao Paulo)*. 25;17(1):eRB4596, **2019**.
- 46- **Gontijo B**, de Carvalho M de L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36(1):71-80, 2003.
- 47- **González U**, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. - *Cochrane Database Syst Rev*. 15;(2):CD004834, **2009**.
- 48-**Guimarães L H**, Machado P R, Lago E L, Morgan D J, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho E M. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil.*Trans R Soc Trop Med Hyg*. 103(7):712-5, **2009**.

- 49-Guimarães L H**, Queiroz A, Silva J A, Silva S C, Magalhães V, Lago E L, Machado P R, Bacellar O, Wilson M E, Beverley S M, Carvalho E M, Schriefer A. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis.* 1;10(12):e00 05100, **2016**.
- 50-Guo C**, Hu M, DeOrazio R J, Usyatinsky A, Fitzpatrick K, Zhang Z, Maeng J H, Kitchen D B, Tom S, Luche M, Khmelnsky Y, Mhyre A J, Guzzo P R, Liu S. The design and synthesis of novel SGLT2 inhibitors: C-glycosides with benzyltriazolopyridinone and phenylhydantoin as the aglycone moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1;22(13):3414-22.**2014**.
- 51-Gross JL**, Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação, e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 46(1):16-26, **2002**.
- 51- Hasan F M**, Alsahli M, Gerich J E, SGLT2 Inhibitors in the Treatment of Type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 104, 297, 2014.
- 53-Hodgson K**, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N. Mecanismos imunológicos que contribuem para a dupla carga de diabetes e infecções bacterianas intracelulares. *Imunologia.* 144 (2): 171-185, **2015**.
- 54-IDF Diabetes Atlas, 9 eds.** International Diabetes Federation, 209, disponível em: <www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 07 janeiro **2020**.
- 55- Insuela D**, Coutinho D, Martins M, et al. Neutrophil Function Impairment Is a Host Susceptibility Factor to Bacterial Infection in Diabetes. *Cells of the Immune System [Working Title]*. 1ªed: Intech Open, v. p. 1-22, **2019**.

- 55- Jirmanus L**, Glesby M J, Guimarães L H, Lago E, Rosa M E, Machado P R, Carvalho E M. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 86(3):426-33, **2012**.
- 56- Jones T C**, Johnson W D Jr, Barretto A C, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed S G, Netto E M, Tada M S, Franca T F, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* 156(1):73-83, **1987**.
- 58- Joshi N G M**, Caputo M R, Weitekamp, Karchmer A W, “Infections in patients with diabetes mellitus,” *New England Journal of Medicine*, vol. 341, no. 25, pp. 1906– 1912, **1999**.
- 59-Kahn S E**, Cooper M E, Del Prato S. Pathophysiology and Treatment of type 2 Diabetes: perspectives on the past, present and future. *The Lancet*, 383, 1068, **2014**.
- 60-Yagi H**, M. Matsumoto, K. Kunimoto, J. Kawaguchi, S. Makino, and M. Harada, “Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice,” *European Journal of Immunology*, vol. 22, no. 9, pp. 2387–2393, **1992**
- 61- Killick Kendrick R**, Rioux JA. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann Parasitol Hum Comp.* 66 Suppl 1:71-4, **1991**.
- 62-Lainson R**. The American Leishmaniasis: some Observations on Their Ecology and Epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77(5):569-96, **1983**.
- 63- Leite S A**, Locatelli S B, Niece S P, Oliveira A R F, Tockus D, Tosin T. Impact of hyperglycemia on morbidity and mortality, length of hospitalization and rates of rehospitalization in a general hospital setting in Brazil. *Diabetol Metab Syndr.* 10.1186/1758-5996-2-49, **2010**.

- 64- Lessa M M**, Lessa H A, Castro T W, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho E M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* 73(6):843-7, **2008**.
- 66- Lessa H A**, Machado P, Lima F, Cruz A A, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho E M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *M J Trop Med Hyg.* 65(2):87-9, **2001**.
- 68- Leopoldo P T**, Machado P R, Almeida R P, Schriefer A, Giudice A, de Jesus A R, Ho J L, Guimarães L H, Bacellar O, Carvalho E M. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* 25;6:75, **2006**.
- 69- Machado P R**, Ampuero J, Guimarães L H, Villasboas L, Rocha A T, Schriefer A, Sousa R S, Talhari A, Penna G, Carvalho E M. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 21;4(12):e912, **2010**.
- 70- Machado P R**, Rosa M E, Costa D, Mignac M, Silva J S, Schriefer A, Teixeira M M, Bacellar O, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(8):438-44, **2011** .
- 71- Machado P R**, Rosa M E, Guimarães L H, Prates F V, Queiroz A, Schriefer A, Carvalho E M. Reatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis.* 15;61(6):945-9, **2015**.

- 72- Meireles CB**, Maia LC, Soares GC, Teodoro IPP, Gadelha MDSV, da Silva CGL, de Lima MAP. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Acta Trop.* 172:240-254. **2017**.
- 73- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2nd ed. Editora do Ministério de Saúde, Brasília, Brazil: **2017**.
- 74- Minodier P**, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.* 5(3):150-8, **2007**.
- 75- Miranda J C**, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis M G, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(2):185-8, **2002**.
- 76- Montoya-Rosales A**, Castro-Garcia P, Torres-Juarez F, Enciso-Moreno JA, RivasSantiago B. Glucose levels affect LL-37 expression in monocyte-derived macrophages altering the *Mycobacterium tuberculosis* intracellular growth control. *Microb Pathog.*97:148-53, **2016**.
- 78-Muller K**, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* 190: 73–76. **2001**.
- 79- Muniz A C**, Bacellar O, Lago E L, Carvalho A M, Carneiro P P, Guimarães L H, Rocha P N, Carvalho L P, Glesby M, Carvalho E M. Immunologic Markers of Protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year Cohort Study. *J Infect Dis.* 15;214(4):570-6, **2016**.

80-Nallely Lopez-Lopez, Ana Gabriela Ramos Martinez, Mariana Haydee GarciaHernandez, Rogelio Hernandez-Pando and Carmen Judith Serrano. Type-2 diabetes alters the basal phenotype of human macrophages and diminishes their capacity to respond, internalise, and control Mycobacterium tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.113(4): e170326, **2018**.

81-Narendran P, Estella E, Furlanos S, “Immunology of type 1 diabetes,” *QJM: An International Journal of Medicine*, vol. 98, no. 8, pp. 547–556, **2005**.

82- Nvarro-González J F, Mora-Fernández C, “The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy,” *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 19, no. 3, pp. 433–442, **2008**.

83- Neves L O, Talhari A C, Gadelha E P, Silva Júnior R M, Guerra J A, Ferreira L C, Talhari S.A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*. 86(6):1092-101, **2011**.

83- Novais F O, Carvalho L P, Graff J W, Beiting D P, Ruthel G, Roos D S, Betts M R, Goldschmidt M H, Wilson M E, Oliveira C I and Scott P. Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 9(7): e1003504, **2013**.

84-Novais F O, Carvalho A M, Clark M L, Carvalho L P, Beiting D P, Brodsky I E, Carvalho E M, Scott P, 2017. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLoS Pathog* 13: e1006196. **2017**.

85- Ozougwu J C, Obimba K C, Belonwu C D, Unakalamba C B, “The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus,” *Journal of Physiology and Pathophysiology*, vol. 4, no. 4, pp. 46–57, **2013**.

90- Pearson R D, Steigbige R T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 127(4):1438-43. **1981**.

89- Peters N C, Egen J G, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay M P, Germain R N, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 15;321(5891):970-4. **2008**.

87- Peixoto F, Maurício T. Nascimento, Rúbia Costa, Juliana Silva, Gaby Renard, Luiz Henrique Guimarães, Gerson Penna, Manoel Barral-Netto, Lucas P. Carvalho, Paulo R. L. Machado, Edgar M. Carvalho. Evaluation of the Ability of Miltefosine Associated with Topical GM-CSF in Modulating the Immune Response of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *J Immunol Res*. 2789859, **2020**.

88- Prates F V, Dourado M E, Silva S C, Schriefer A, Guimarães L H, Brito M D, Almeida J, Carvalho E M, Machado P R, Fluconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*: A Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 1;64(1):67-71, **2017**

89- Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães L H, Machado PR, Carvalho E M, Riley L W, Wilson M E, Schriefer A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *J Clin Microbiol*. 50(12):4028-34, 2012.

90- Rafeh Oualh, Mourad Barhoumi, Soumaya Marzouki, Emna Harigua-Souiai,

Melika Ben Ahmed, Ikram Guizani. Infecção de neutrófilos humanos com cepas de *Leishmania infantum* ou *Leishmania major* desencadeia ativação e liberação diferencial de citocinas. *As células da frente infectam* Microbiol. 2019; 9: 153. **2019**

91- Rebollo R A. The hippocratic legacy and its fortune in the greco-roman period: from Cós to Galen. *Scientiae Studia.* 4, 45, **2006.**

92- Reveiz L, Maia-Elkhoury A N, Nicholls R S, Romero G A, Yadon Z E. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *29;8(4):e61843,* **2013.**

93- Romero G A, Guerra M V, Paes M G, Macêdo V O. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic Response to Meglumine Antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 65(5):456-65, **2001.**

94- Sanders L J. From Thebes to Toronto and the 21st Century: An Incredible Journey. *Diabetes Spectrum,* 15, 56, **2002.**

95- Santos D, Campos T M, Saldanha M, Oliveira S C, Nascimento M, Zamboni D S, Machado P R, Arruda S, Scott P, Carvalho E M, Carvalho L P. IL-1 β Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 138(5):1107-1115, **2018.**

96- Santos J B, de Jesus A R, Machado P R, Magalhães A, Salgado K, Carvalho E M, Almeida RP. Antimony plus Recombinant human Granulocyte-macrophage Colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis.* 15;190(10):1793-6, **2004.**

- 97-Silva C S**, Brodskyn C I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front Public Health*. 29;2:165, **2014**.
- 98-Silva C B**, Nunes S, Santos R L, Lima F R, Lago A, Silva J, Carvalho L P, Arruda S M, Serezani H C, Carvalho E M, Brodskyn C, Tavares NM. Unbalanced production of LTB₄/PGE₂ driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Emerg Microbes Infect*. 9(1):1275-1286, **2020**.
- 99-Silveira F T**, Lainson R, Shaw J J, De Souza A A, Ishikawa E A, Braga R R. Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 85(6):735-8, **1991**.
- 100- Sistema de Informação de Agravos de Notificação. SINAN**. 2019.
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>
- 101- Sousa A Q**, Frutuoso M S, Moraes E A, Pearson R D, Pompeu M M. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. *Clin Infect Dis*. 53(7):693-5, **2011**.
- 102- Solomon M**, Baum S, Barzilai A, Scope A, Trau H, Schwartz E. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. *J Am Acad Dermatol*. 56(4):612-6, **2007**.
- 103- Sundar S**, Sinha P, Jha T K, Chakravarty J, Rai M, Kumar N, Pandey K, Narain MK, Verma N, Das V N, Das P, Berman J, Arana B. Oral miltefosine for Indian postkala-azar dermal leishmaniasis: a randomised trial. *Trop Med Int Health*. 18(1):96-100, 2013.
- 104- Suprien C**, Paulo N. Rocha¹, Marina Teixeira, Lucas P. Carvalho, Luiz H. Guimarães, Toby Bonvoisin, Paulo R. L. Machado, Edgar M. Carvalho. *Clinical*

Presentation and Response to Therapy in Children with Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 102(4):777-781, **2020**.

105- Schriefer A, Schriefer A L, Góes-Neto A, Guimarães L H, Carvalho L P, Almeida R P, Machado P R, Lessa H A, de Jesus A R, Riley L W, Carvalho E M. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun.* 72(1):508-14, **2004**.

106-Schnorr D, Muniz A C, Passos S, Guimarães L H, Lago E L, Bacellar O, Glesby M J, Carvalho E M . IFN- γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(12):e1947. **2012**.

107- Scott P, Natovitz P, Coffman R L, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1;168(5):1675-84, **1988**.

108- Skyler, J. S. Diabetes mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 12;47(17):4113-7. **2004**.

109-Turetz M L, Machado P R, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida R P, Mobashery N, Johnson W D Jr, Carvalho E M. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 15;186(12):1829-34, **2002**.

110- Unger A, O'Neal S, Machado P R, Guimarães L H, Morgan D J, Schriefer A, Bacellar O, Glesby M J, Carvalho E M. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 80(4):574-9, 2009.

- 111-Walton B C**, Evaluation of chemotherapy of American leishmaniasis by the Indirect Fluorescent Antibody test. *Am Trop Med Hyg.* 29(5):747-52.**1980.**
- 112- Wällberg M** ,A. Cooke, “Immune mechanisms in type 1 diabetes,” *Trends in Immunology*, vol. 34, no. 12, pp. 583–591, **2013.**
- 113- Weirather J L**, Jeronimo S M, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz M A, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho E M, Donelson J E, Wilson M E. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol.* 49(11):3892-904, **2011.**
- 114- Wilding, J. P. H.** The Role of the Kidneys in Glucose homeostasis in type 2 diabetes: Clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose cotransporter 2 inhibitors. *Metabolism*, 63(10):1228-37 ,**2014.**
- 115- Wortmann G**, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, Weintrob A, Magill A. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 83(5):1028-33, **2010.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



Posto de Saúde de Corte de Pedra

Coleta de dados: Avaliar a Influência do Diabetes Mellitus nas Manifestações Clínicas, Resposta Imune e na Resposta ao Tratamento de Pacientes com Leishmaniose Cutânea Causada pela *Leishmania braziliensis*.

Nº do LTCP: _____

Datas das Visitas

01: _____

02: _____

03: _____

04: _____

05: _____

Lifadenopatia

17. Lifadenopatiapresente() Sim () Não
18. Cadeia(s) Envovida(s):
() Cervical () Occipital () Axilar () Inguinal () Crural () Outra
19. Tamanho do maior linfonodo (mm): (_____ x _____)

Tratamento

20. Medicações em uso atual
a) Antibióticos () Sim () Não
b) Anti-inflamatórios () Sim () Não
c) Corticóides () Sim () Não
d) Anti-hipertensivos () Sim () Não
e) Contraceptivos hormonais () Sim () Não
f) Anti-helmínticos () Sim () Não
21. Tratamento prescrito:
a) Glucantime IV () 20mg/kg
b) Duração..... () 4 semanas
22. Drogas para diabetes: () Insulina
() Glicazida / Diamicron
() Metformina
() Glimeperida
() Glibenclamida / Daonil
() Acarbose / Glucobay

VISITA 02 (D-15)

Data: _____

Nº do LTCP (_____)

Glicemia jejum: _____ Glicemia pós-prandial: _____

Avaliação do Tratamento

1. Efeitos colaterais desde a última visita() Sim () Não
Cefaléia () Sim () Não
Náuseas/vômitos () Sim () Não
Flebite () Sim () Não
Artralgia () Sim () Não
Mialgia () Sim () Não
Outro(s) _____
2. Houve modificação da dose do Glucantime até agora?() Sim () Não
a. Se sim, especificar nova dose: _____
3. Vinha em uso regular do Glucantime?() Sim () Não
4. Cicatrização da maior lesão da visita 01.....() Nenhuma () Parcial () Total
5. Cicatrização das outras lesões da visita 01.....() Nenhuma () Parcial () Total

Exame da Pele

6. Local da maior lesão (marque apenas UM):
()Cabeça ()Face ()Pescoço ()Tronco ()Braço D ()Braço E ()Antebraço D
()Antebraço E ()Coxa D ()Coxa E ()Perna D ()Perna E
()Outro: _____
7. Tamanho da maior lesão (mm): (_____ x _____)
8. Tipo da Lesão:() Pápula () Nódulo () Exulceração () Pápula com Exulceração
() Nódulo com Exulceração () Ulcerada () NA
9. Infecção Secundária:() Sim () Não
10. Novas lesões:() Sim () Não
Se sim, especificar quantidade, local e tipo da nova lesão:

Lifadenopatia

11. Lifadenopatiapresente() Sim () Não
12. Cadeia(s) Envovida(s):
() Cervical () Occipital () Axilar () Inguinal () Crural () Outra
- 13.Tamanho do maior linfonodo (mm): (_____ x _____)

VISITA O3 (D-30)

Data: _____

Nº do LTCP (_____)

Glicemia jejum: _____ Glicemia pós-prandial: _____

Avaliação do Tratamento

1. Efeitos colaterais desde a última visita() Sim () Não

Cefaléia () Sim () Não
Náuseas/vômitos () Sim () Não
Flebite () Sim () Não
Artralgia () Sim () Não
Mialgia () Sim () Não
Outro (s) _____

2. Cicatrização da maior lesão da visita 01.....() Nenhuma () Parcial () Total
3. Cicatrização das outras lesões da visita 01.....() Nenhuma () Parcial () Total

Exame da Pele

4. Local da maior lesão (marque apenas UM):
()Cabeça ()Face ()Pescoço ()Tronco ()Braço D ()Braço E ()Antebraço D
()Antebraço E ()Coxa D ()Coxa E ()Perna D ()Perna E
()Outro: _____
5. Tamanho da maior lesão (mm): (_____ x _____)
6. Tipo da Lesão: ()Pápula ()Nódulo ()Exulceração ()Pápula com Exulceração
()Nódulo com Exulceração ()Ulcerada ()NA
7. Infecção Secundária:() Sim () Não
8. Novas lesões:() Sim () Não
9. Se sim, especificar quantidade, local e tipo da nova lesão:
() Cabeça _____ () Face _____
() Pescoço _____ () Tronco _____
() Braço D _____ () Braço E _____
() Antebraço D _____ () Antebraço E _____
() Coxa D _____ () Coxa E _____
() Perna D _____ () Perna E _____
() Outro: _____/_____

Desfecho inicial do Tratamento

10. Conclusão Atual do Tratamento: () Cura () Falha () Abandono
11. Tempo (dias) entre início do tratamento e data da cura _____

VISITA O4 (D-60)

Data: _____

Nº do LTCP (_____)

Glicemia jejum: _____ Glicemia pós-prandial: _____

Avaliação do Tratamento

10. Efeitos colaterais desde a última visita() Sim () Não
Cefaléia () Sim () Não
Náuseas/vômitos () Sim () Não
Flebite () Sim () Não

Artralgia () Sim () Não
Mialgia () Sim () Não
Outro (s) _____

11. Cicatrização da maior lesão da visita 01.....() Nenhuma () Parcial () Total

12. Cicatrização das outras lesões da visita 01.....() Nenhuma () Parcial () Total

Exame da Pele

13. Local da maior lesão (marque apenas UM):

()Cabeça ()Face ()Pescoço ()Tronco ()Braço D ()Braço E ()Antebraço D
()Antebraço E ()Coxa D ()Coxa E ()Perna D ()Perna E
()Outro: _____

14. Tamanho da maior lesão (mm): (_____ x _____)

15. Tipo da Lesão:

()Pápula ()Nódulo ()Exulceração ()Pápula com Exulceração
()Nódulo com Exulceração ()Ulcerada ()NA

7. Infecção Secundária:() Sim () Não

8. Novas lesões:() Sim () Não

16. Se sim, especificar quantidade, local e tipo da nova lesão:

() Cabeça _____ () Face _____
() Pescoço _____ () Tronco _____
() Braço D _____ () Braço E _____
() Antebraço D _____ () Antebraço E _____
() Coxa D _____ () Coxa E _____
() Perna D _____ () Perna E _____
() Outro: _____/_____

Desfecho inicial do Tratamento

13. Conclusão Atual do Tratamento: () Cura () Falha () Abandono

14. Indicado novo tratamento para Leishmaniose: () Sim () Não

15. Se "sim", especifique medicação: _____

16. Tempo (dias) entre início do tratamento e data da cura _____

VISITA 05 (90 DIAS)

Data: _____

Nº do LTCP (_____)

Glicemia jejum: _____ icemia pós-prandial:

Avaliação do Tratamento

1. Houve modificação da dose do Glucantime até agora? () Sim () Não
b. Se sim, especificar nova dose: _____
2. Vinha em uso regular do Glucantime? () Sim () Não
3. Vem em uso de outra droga (nome e dosagem): _____
4. Cicatrização da maior lesão: () Nenhuma () Parcial () Total
5. Cicatrização das outras lesões: () Nenhuma () Parcial () Total

Exame da Pele

6. Local da maior lesão ativa (marque apenas UM):
() Cabeça () Face () Pescoço () Tronco () Braço D () Braço E () Antebraço D
() Antebraço E () Coxa D () Coxa E () Perna D () Perna E () Outro: _____
7. Tamanho da maior lesão (mm): (x)
8. Tipo da Lesão:
() Pápula () Nódulo () Exulceração () Pápula com Exulceração
() Nódulo com Exulceração () Ulcerada () NA
9. Infecção Secundária: () Sim () Não
10. Novas lesões: () Sim () Não
11. Se sim, especificar quantidade, local e tipo da nova lesão:
() Cabeça _____ () Face _____
() Pescoço _____ () Tronco _____
() Braço D _____ () Braço E _____
() Antebraço D _____ () Antebraço E _____
() Coxa D _____ () Coxa E _____
() Perna D _____ () Perna E _____
() Outro: _____/_____

Desfecho final do Tratamento

13. Conclusão Atual do Tratamento: () Cura () Falha () Abandono
14. Indicado novo tratamento para Leishmaniose: () Sim () Não
15. Se "sim", especifique medicação: _____

11. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome do Projeto: Avaliar a Influência do Diabetes Mellitus nas Manifestações Clínicas, Resposta Imune e na Resposta ao Tratamento de Pacientes com Leishmaniose Cutânea Causada pela *Leishmania braziliensis*.

NOME DO PACIENTE: _____

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador – Bahia - Brasil.

No do Projeto:

Convite e Objetivo: Você é convidado (a) a participar como voluntário(a) de uma pesquisa que pretende comparar pacientes com diabetes e sem com leishmaniose cutânea (LC) quanto à(s): manifestações clínicas, resposta imune à antígenos de leishmania e à resposta ao tratamento com glucantine. O trabalho é importante, pois existe uma falta de estudos sobre a LC em diabéticos nesta população. Dessa forma, desejamos contribuir para o maior conhecimento desse assunto e sua participação é muito importante para esse processo.

Participação voluntária: Caso você aceite participar voluntariamente, a duração do estudo será de 90 dias, sendo uma visita inicial e mais três de seguimento. Se não houver cura dentro desse período, você será acompanhado seguindo a rotina do Posto de Saúde de Corte de Pedra. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose.

Finalidade do estudo: Este estudo vai comparar como se apresenta a LC em diabéticos com e sem diferentes respondem ao tratamento com o glucantine. Vamos também estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela leishmania. Para isto estudaremos o seu sangue e material da ferida obtida pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado pelo médico, será necessário fotografar suas lesões e realizar coleta de sangue (2 colheres de sopa de sangue), biópsia da lesão e teste intradérmico com antígeno de leishmania. Esses procedimentos visam o diagnóstico da leishmaniose e avaliação de possíveis doenças que você possa apresentar. É possível que aconteçam desconfortos secundários a realização dos exames, como dor e vermelhidão no local, mas a ocorrência desses efeitos é rara por termos profissionais capacitados trabalhando na equipe de coleta. Salientamos que todo o material utilizado é descartável e/ou devidamente esterilizado. Na ocorrência de algum efeito adverso ou qualquer outro problema relacionado com a pesquisa você terá direito à assistência gratuita no posto de saúde. Caso o

diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e confirmação do diagnóstico sua participação no estudo acabará em 90 dias. Você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização da continuação do tratamento, que também lhe será fornecido gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

Confidencialidade: Embora o questionário a ser utilizado tem como finalidade a coleta de informações demográficas e dados sobre a doença, você tem o direito de não responder a qualquer questão que considere invasão de privacidade. Ao aceitar participar do nosso estudo você nos permite divulgar os resultados do mesmo em trabalhos científicos, que podem ser publicados em revistas ou apresentados em congressos para a comunidade científica. No entanto, garantimos sigilo da sua identidade, assim como de todos os participantes do estudo. Qualquer informação pessoal obtida durante o estudo só será do conhecimento da equipe e, caso requerido, por alguma instituição de controle. A confidencialidade estará de acordo com a Constituição Brasileira e a Resolução 196/96. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica responsável pelo estudo.

Análises de riscos e benefícios: O tratamento que você receberá é semelhante ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. O procedimento adicional para os participantes do estudo é a retirada de sangue para o acompanhamento do seu tratamento e para a avaliação imunológica. Como a equipe tem vasta experiência na coleta deste material, acreditamos que não haverá risco importante.

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: Muito pouco é conhecido sobre a leishmania em pacientes diabéticos. Embora você vá receber o mesmo tratamento que outros pacientes atendidos no Posto de Saúde, o fato de você realizar exames e ser acompanhado, pode contribuir em detectarmos e tratarmos efeitos adversos ao tratamento. Para a sociedade o trabalho será de grande importância, pois com o mesmo conheceremos mais a respeito da leishmaniose em diabéticos, o que permitirá uma melhor orientação sobre o tratamento desta doença nesta população.

Custos: Você não terá custos com o tratamento com o Glucantime ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353 o Dr. Edgar M. Carvalho ou Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Bahia, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (71) 3283-5564.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Eu, _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável para esclarecer todas as minhas dúvidas acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da

pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresse minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Assinatura de uma testemunha

12. ARTIGO PUBLICADO COM AO RESULTADO DA TESE

Open Forum Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



Diabetes Modifies the Clinic Presentation of Cutaneous Leishmaniasis

Alexsandro S. Lago,^{1,2} Filipe R. Lima,³ Augusto M. Carvalho,³ Camilla Sampaio,^{1,2} Neuza Lago,¹ Luiz H. Guimarães,⁴ Jamile Lago,^{1,2} Paulo R. L. Machado,^{1,2} Lucas P. Carvalho,^{1,2,3} Sergio Arruda,³ and Edgar M. Carvalho^{1,2,3}

¹Immunology Service, Professor Edgard Santos University Hospital Complex, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, ²Post-Graduate Course in Health Sciences, Federal University of Bahia Medical School, Salvador, Bahia, Brazil, ³Gonçalo Moniz Institute (IGM), FioCruz, Salvador, Bahia, Brazil, and ⁴Federal University of Southern Bahia, Teixeira de Freitas, Bahia, Brazil

Background. Cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *L. braziliensis* is characterized by 1 or multiple well-limited ulcerated lesions. Diabetes mellitus (DM) impairs neutrophil and monocyte function, and there is a report of vegetative lesions in a patient with both diseases in Morocco. Here we evaluate the influence of DM on clinical manifestations, immune response, and in the treatment of CL.

Methods. The participants were 36 DM patients with CL and 36 patients with CL without DM, matched by age and gender. The diagnosis of CL was performed by documentation of DNA of *L. braziliensis* by polymerase chain reaction in the lesion biopsy and histopathologic findings. All patients were treated with Glucantime (Sanofi-Aventis) 20 mg/kg of weight per day for 20 days.

Results. There was no difference in the majority of the clinical variables between the groups, and the cure rate in patients with CL and DM (67%) was similar to that observed in CL patients (56%; $P > .05$). The most important finding was the documentation that 36% of the patients with DM and CL had atypical cutaneous lesions characterized by large superficial ulcers without defined borders. High levels of interferon- γ , tumor necrosis factor, and interleukin- 1β were detected in the supernatants of mononuclear cells stimulated with *Leishmania* antigen in patients with DM and atypical CL. Moreover, while cure was observed in only 33% of the patients with DM and atypical CL lesions, it was observed in 85% of patients with typical lesions ($P < .05$).

Conclusions. DM modifies the clinical presentation of CL, enhances pro-inflammatory cytokine production, and impairs response to antimony therapy.

Keywords. cutaneous leishmaniasis; diabetes; diabetes mellitus; immune response; leishmaniasis; tegumentary leishmaniasis.

Cutaneous leishmaniasis (CL) arising from *Leishmania braziliensis* is characterized by a well-delimited ulcer with raised borders. It is known that around 3% of CL patients develop mucosal leishmaniasis (ML) [1]. Moreover, CL patients may also develop disseminated leishmaniasis (DL), an emergent form of *L. braziliensis* infection defined by the presence of more than 10 and possibly up to 1000 acneiform, popular, and ulcerated skin lesions distributed among at least 2 regions of the body [2, 3]. Atypical lesions are also observed in the spectrum of this disease's clinical presentation as isolated vegetative lesions that are larger in size and lacking clear delimitation or as multiple nodules restricted to a specific area of the body [4, 5]. Parasite and host factors may influence the clinical presentation of CL. *L. braziliensis* is polymorphic, and differences in the alleles on chromosomes 24 and 28 have been associated with distinct

clinical forms, disease severity, and therapeutic failure [6–8]. There is also strong evidence of the role played by host immune response in the pathogenesis of CL. Leishmania are killed by interferon (IFN)- γ -activated macrophages but do not become completely eradicated; thus, parasite persistence and the release of parasite antigens induce an exacerbated stimulation of the immune system. Neutrophils are the first cell type to migrate to the site of *Leishmania* infection [9–11]. However, both neutrophils and macrophages from CL patients present a decreased ability to kill *Leishmania* despite producing high levels of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines [12, 13]. Elevated levels of pro-inflammatory cytokines, including interleukin (IL)- 1β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF), C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)-9, and CXCL-10, among others, are produced by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from CL patients under stimulation by leishmanial antigens [14, 15]. Cytokine production becomes enhanced during the course of infection, from the early or pre-ulcerative phase of disease to ulcer development [16, 17]. The enhancement in the immune response is also due to the impairment of regulatory mechanisms, such as the decreased ability of IL-10 and transforming growth factor (TGF)- β to downmodulate the immune response of CL cells [18]. This makes American tegumentary leishmaniasis a chronic inflammatory disease characterized by an exaggerated inflammatory response that causes tissue damage.

Received 19 June 2020; editorial decision 9 October 2020; accepted 5 November 2020.

Correspondence: Edgar M. Carvalho, MD, PhD, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil (edgar@ufba.br; imuno@ufba.br).

Open Forum Infectious Diseases® 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com DOI: 10.1093/ofid/ofaa491

XXXX • OFID • 1

Downloaded from <https://academic.oup.com/ofid/article/7/12/ofaa491/5930496> by guest on 11 December 2020

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic syndrome, and it is estimated that around 480 million people worldwide live with diabetes [19]. DM increases the susceptibility to infections caused by extracellular bacteria and fungi and has been shown to modify the clinical presentation of tuberculosis [20–22]. However, DM also induces an inflammatory response associated with disease complications, such as diabetic retinopathy [23]. Diabetes decreases chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst, and the bacterial killing ability of neutrophils [24–26]. Neutrophils and monocytes are the first line of defense against protozoan *Leishmania* spp. However, there is a lack of studies investigating the influence of blood sugar levels in *Leishmania* infection, and it remains unclear whether diabetes modifies the clinical presentation of leishmaniasis. A recent clinical report detailed 3 patients living in Morocco with CL and DM, 1 of whom presented a vegetative lesion [27]. The present study endeavored to compare clinical presentations and immunological responses in CL patients with or without diabetes and to evaluate the influence of DM on the therapeutic response to meglumine antimoniate.

METHODS

Type of Study

The present prospective study compared clinical manifestations, histopathological findings, cytokine production, and therapeutic response in 36 CL patients with DM (CL+DM) with 36 CL patients without DM, matched by age (± 5 years) and sex. In addition, a nested cross-sectional study was performed to compare immune response between 8 CL+DM patients with atypical lesions and 9 CL+DM patients with typical lesions.

Study Population and Case Definition

This study was conducted between January 2017 and June 2019 at the municipal health clinic of Corte de Pedra, located in the municipality of Presidente Tancredo Neves, Bahia-Brazil.

The study included 64 adult patients aged 18 to 60 years, of both sexes, with a diagnosis of CL with or without DM. All patients presented at least 1 CL ulcer and had an illness duration between 20 and 90 days. All resided in the same geographic region and faced similar exposure risks, as most were farm workers. Only 1 patient refused participation, as he was unable to attend all follow-up visits at the clinic. Diagnosis was confirmed via documentation of *L. braziliensis* DNA by polymerase chain reaction (PCR) [28] or through the identification of amastigotes in the histopathological analysis of biopsied tissue. DM was diagnosed when glycated hemoglobin was $\geq 6.5\%$. Patients with kidney injury, congestive heart failure, liver failure, or HIV infection were excluded from the study.

Study Design

Upon agreeing to participate in the study and signing a term of informed consent, patients were submitted to a clinical

examination and classified as CL+DM or CL without DM. Blood was collected for laboratorial immunological analysis before beginning therapy. All participants were evaluated at the clinic to determine lesion size, clinical improvement, evolution to cure, and treatment side effects every 30 days. Patients were treated intravenously with Glucantime (Sanofi Aventis, Brazil) at a dose of 20 mg/kg of body weight per day for 20 days. Cure was defined by the absence of active ulceration and complete skin reepithelization, without raised borders, on day 90 after the onset of treatment. Therapeutic failure was defined by the presence of active ulcers or scar formation with raised borders 90 days after the initiation of therapy. Patients who did not respond to treatment by day 90 were treated with the same dose of Glucantime for 30 additional days. Of the 36 patients with DM who participated in the study, 29 (81%) had previously been diagnosed with DM before the presentation of CL; in these cases, we followed the therapeutic regimen prescribed by the attending physician, that is, the only intervention undertaken was to increase antidiabetic drug usage when blood sugar levels remained above normal limits. In 7 (24%) patients, DM was diagnosed at the same time as CL. Of 36 patients with DM, 7 received insulin, 15 received Glyburide, 13 received Glicazide, and 1 patient was treated with Glimepiride. Of the 28 patients who used Glyburide or Glicazide, 22 were prescribed metformin.

Biopsies and Immunohistochemistry

Biopsies were obtained from all 72 patients for the detection of *L. braziliensis* DNA by PCR. However, as the decision to perform histopathological analysis was made during the course of the study, this evaluation was performed in only the last 19 patients enrolled. Biopsies were obtained from the borders of lesions using a 4-mm-diameter punch, following the application of local anesthetic. Skin tissues were fixed in buffered formaldehyde and embedded in paraffin blocks. Deparaffinization and rehydration of 5- μ m-thick sections were performed using xylene and absolute alcohol, and antigen retrieval was performed using citrate buffer pH 9.0 at 96°C for 20 minutes. Immunohistochemistry reactions were performed as previously described [29]. Briefly, after blockage of peroxidase activity with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes and blockage of proteins with Protein Block Serum-Free (DAKO, Carpinteria, CA, USA) for 15 minutes, slides were incubated overnight at 4°C with monoclonal mouse anti-CD20, anti-CD68, anti-CD56, anti-CD4, anti-CD8, and anti-granzyme B (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Mouse and Rabbit Peroxidase Kit/Horseradish Peroxidase KP500 (Diagnostic Bio-Systems, Pleasanton, CA, USA) were used to perform reactions according to manufacturer recommendations.

Morphometry of Inflammation and Necrotic Areas

All histological sections stained with hematoxylin and eosin were scanned under an optical microscope (Olympus BX51).

The total extension of these sections, as well as areas of inflammatory infiltrate and necrosis, was measured using Image J, version 1.48 (National Institutes of Health). The total length of the biopsy fragment and the sum of the areas of inflammation and necrosis are expressed in mm². Percentages of inflammation and necrosis in the biopsied samples were calculated by dividing the total extension of inflammation and necrosis by the total extension of the biopsy fragment multiplied by 100.

Quantitative Analysis

Quantification of the cells was performed by optical microscopy (Olympus BX51), selecting 5 random fields in each section with the respective antibodies at a magnifying power of 40×. The number of positive cells in each field was quantified through the identification of brown-colored cells, as the result of reactions with chromogenic substrate.

Evaluation of Immune Response

Immunological studies were performed on day 0 of the study. Mononuclear cells were isolated from heparinized peripheral blood (20 mL) by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Cells were harvested, washed with saline, and resuspended in RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum and antibiotics. For cytokine determination, 3×10⁶ cells/mL were stimulated with soluble *Leishmania* antigen (10 µg/mL) and cultured for 48 hours at 37°C under 5% CO₂. Cytokine (IFN-γ, TNF-α, IL-1β, and CXCL-10) quantification was performed in mononuclear cell culture supernatants by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

Patient Consent Statement

Participation in the present study was voluntary. Patients who declined to participate received similar follow-up and treatment as study participants. The present study protocol was approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Institute (FIOCRUZ), and all participants provided written informed consent.

RESULTS

The demographic and clinical features of 36 CL+DM patients and 36 CL without DM are shown in Table 1. No significant differences were seen between the groups regarding gender, illness duration, lesion size and location, frequency of satellite lymphadenopathy, or lymph node size. Patients with CL+DM were older than those without DM. In the majority of both groups of patients, ulcers were infected, but antibiotics were used in only 1 diabetic. No differences were found in cure rate on day 90 in CL+DM patients vs CL ($P > .05$). Of the 36 patients with DM, 7 (19%) had type 1 diabetes while 29 (81%) had type 2. No significant differences were observed regarding the clinical features of CL among patients with type 1 or type 2 diabetes. The median

Table 1. Demographic and Clinical Features of Cutaneous Leishmaniasis in Patients With and Without Diabetes Mellitus

Demographic/Clinical Features	Cutaneous Leishmaniasis With Diabetes n = 36	Cutaneous Leishmaniasis Without Diabetes n = 36	P Value
Age, mean ± SD, y	49 ± 12	39 ± 13	.0006
Presence of atypical lesions, No. (%)	13 (36)	0 (0)	.0001
Gender, female, No. (%)	23 (64)	20 (56)	.63
Patients with >1 lesion, No. (%)	15 (41)	67 (19)	.07
Size of the major lesion, median (CI), mm	20 (17–31)	19 (18–24)	.91
Area of the major lesion, median (CI), mm	185 (215–712)	246 (247–465)	.49
Frequency of lesions above the belt, No. (%)	13 (33)	8 (22)	.03
Frequency of patients with lymph node enlargement, No. (%)	17 (47)	20 (56)	.63
Cure rate by day 90, No. (%)	24 (67)	20 (56)	.88
Healing time, median (CI), d	90 (69–96)	83 (78–116)	.88

*Fisher exact test.

**Mann-Whitney test.

(interquartile range) of blood sugar levels in patients with type 1 diabetes was 370 (292–470) mg/dL, vs 277 (228–326) mg/dL in those with type 2. Moreover, there were no differences in response to antimony therapy between these 2 groups, as the cure rate on day 90 was 71% in patients with type 1 ($n = 7$) vs 68% in those with type 2 ($n = 25$; $P > .05$). In addition, response to therapy was similar regardless of the type of antidiabetic drugs used. Despite antidiabetic drug use, the majority of patients had above-normal blood sugar levels at admission, which remained throughout follow-up.

To determine whether blood sugar levels influenced cure rate, we compared the therapeutic response in patients with blood sugar levels <200 mg/dL with that of those who had blood sugar levels >250 mg/dL. The cure rate was 43% in the 3/7 patients with blood sugar <200 mg/dL compared with 72% in the 18/25 patients with elevated levels ($P > .05$). While we observed a weak negative correlation between blood sugar levels and healing time ($R = .21$; $P > .05$), we did not find any associations between clinical presentation and response to therapy according to the type of antidiabetic drugs used.

Histopathologic analysis was performed in 9 patients with CL+DM and in 10 with CL only; immunochemical studies were done in 5 patients from each group. No differences were seen in the majority of findings typically observed in patients with CL, for example, acanthosis, hyperkeratosis, hyperplasia of the epiderma, granuloma formation, and number of amastigotes. However, while necrotic foci were observed in all CL patients without DM, this finding was only documented in 50% of CL+DM patients ($P < .05$). Due to the small number of cases

analyzed, it was not possible to determine the impact of blood sugar levels or antidiabetic drugs on histopathologic features. Figure 1 illustrates the frequency of cells expressing CD68, CD20, CD8, and granzyme B. While there were no differences in the frequencies of macrophages (CD68+), B cells (CD20+), and cells expressing granzyme B, the frequency of CD8+ T cells in patients with CL+DM was 1.8-fold lower than in CL patients without DM ($P < .05$).

An important finding of the present study was the documentation of atypical ulcers in patients with DM, which were observed in 13 (36%) out of the 36 CL patients with DM. In contrast to well-delimited oval ulcers with raised borders, diabetic patients presented atypical lesions characterized by superficial, flat ulcers with poorly defined borders (Figure 2).

The clinical characteristics of the 13 DM patients with atypical lesions and 23 cases with typical CL ulcers are shown in Table 2. No significant differences were found between these 2 groups regarding age, number or size of lesions, presence of satellite lymph node, or blood sugar levels. Ulcers above the belt were more frequent in patients with atypical lesions (50%) vs those with typical lesions (20%), yet without significance. One

marked difference between those with typical vs atypical lesions was seen with respect to antimony therapy failure, which occurred in 69% of the patients with atypical lesions vs just 13% of those with typical lesions ($P < .01$).

The cytokine profiles of patients with CL+DM presenting typical and atypical lesions are shown in Figure 3. IFN- γ levels, TNF levels, and IL-1 β levels in patients with DM with atypical ulcers were 978 (571–1083) pg/mL, 103 (737–1399) pg/mL, and 364 (54–418) pg/mL, respectively—higher ($P < .05$) than in those with typical ulcers: 530 (118–796) pg/mL, 156 (20–792) pg/mL, and 4 (0–61) pg/mL, respectively. With regard to cytokine production in soluble *Leishmania* antigen-stimulated PBMCs from CL patients without DM (controls), INF- γ levels (IQR) were higher in controls (1486 [787–2152] pg/mL) than in DM with typical CL ulcers ($P < .05$), while IL-1 β in the controls was lower (45 [3–193] pg/mL) than in CL+DM patients with atypical ulcers ($P < .01$). The levels of CXCL-10, IL-6, and granzyme B were similar between the 2 groups.

DISCUSSION

It is known that DM increases the susceptibility and severity of bacterial fungus infections [30, 31]. The increased susceptibility and severity of bacterial infections in patients with diabetes can be explained by an impairment in chemotaxis, phagocytosis, and the decreased bacteria-killing ability of neutrophils [32]. However, it remains unclear whether DM impairs host killing of *Leishmania* protozoa, as well as whether DM modifies the clinic course of CL. Herein we evaluated the influence of DM on clinical presentation and therapeutic response to CL caused by *L. braziliensis*, the most important species associated with CL in Latin America. While blood sugar levels, type of diabetes, and antidiabetic drug therapy were not observed to modify clinical presentation, CL severity, or response to therapy, 36% of CL+DM patients did present atypical superficial ulcers lacking well-defined borders. These patients had enhanced levels of TNF, IL-1 β , and IFN- γ and experienced higher rates of therapeutic failure.

High blood sugar levels have been associated with severity in diseases other than DM [32–34]. Interestingly, we did not observe an association between elevated levels of blood sugar and CL severity, yet we identified a weak inverse correlation between blood sugar levels and healing time. In 5 malnourished patients with type 1 diabetes with elevated blood sugar levels throughout follow-up, the disease presentation was not more severe and cure was already observed on day 60; in the majority of patients, cure only occurred between 60 and 90 days after onset of therapy.

It has been shown that the antidiabetic drug Glyburide decreases IL-1 β and TNF levels [35] in human CL and reduces immunopathology in mice infected with *L. braziliensis* [36]. While we did not observe any differences between patients

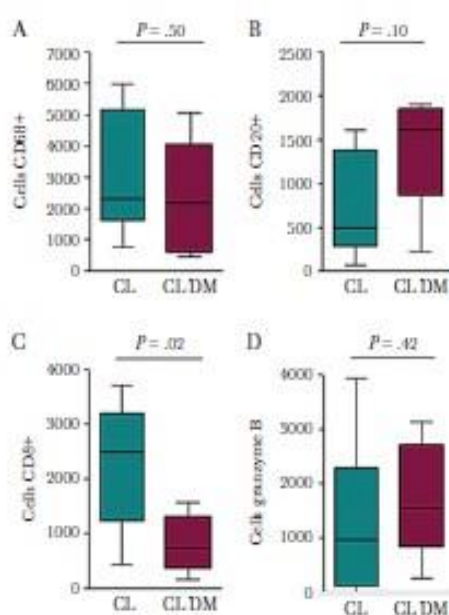


Figure 1. Immunophenotypic analysis in skin biopsy of cutaneous leishmaniasis patients with and without diabetes mellitus. Tissue biopsy from 5 patients with cutaneous leishmaniasis and diabetes mellitus and from 5 patients with cutaneous leishmaniasis without diabetes, incubated with anti-CD68, CD20, CD8, and granzyme B monoclonal antibodies. Reactions were performed with a mouse and rabbit peroxidase kit. Data represents median and interquartile of positively stained cells. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. * $P < .05$. Abbreviations: CL, cutaneous leishmaniasis; DM, diabetes mellitus.



Figure 2 Atypical and typical cutaneous ulcers in patients with diabetes and cutaneous leishmaniasis. Images of skin ulcers taken on day 0 from 4 patients with diabetes mellitus and cutaneous leishmaniasis: 3 cases with atypical ulcers (A, B, C) and 1 from a patient with typical cutaneous leishmaniasis (D).

treated with Glyburide, Gliclazide, or metformin, we cannot rule out the potential benefit of Glyburide due to the small number of patients treated with different antidiabetic agents.

With respect to infections caused by intracellular agents in DM patients, tuberculosis is the most commonly studied association. DM has been shown to increase risk of *M. tuberculosis* infection and tuberculosis severity [37]. It has also been shown that DM decreases the expression of IL-37, and consequently impairs the control of *M. tuberculosis* infection [38]. Moreover, decreased production of IL-6, IL-10, IL-12, monocyte

chemoattractant protein-1, RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), and CXCL-9 by monocytes infected with *M. tuberculosis* has been linked to the decreased ability of monocytes to kill *M. tuberculosis* [39]. Despite a lack of data regarding the consequences of *L. braziliensis* infection in monocytes from diabetic patients, we did not find increased parasite burden in macrophages in our histopathologic analysis of tissue samples from CL+DM patients.

The histopathologic analysis of ulcers in the 2 groups of patients revealed lower frequencies of necrosis and CD8+ T

Table 2 Demographic and Clinic Features of Patients With Cutaneous Leishmaniasis and Diabetes Mellitus With Atypical or Typical Lesions Compared With Patients Without Diabetes (Controls)

	Atypical n = 13	Typical n = 23	Controls n = 36	P Value
Demographic and Clinical Features				
Age, mean \pm SD, y	48 \pm 14	50 \pm 11	39 \pm 14	.0003 ^a
Body mass index, median (CI), kg/m ²	27 (26–29)	26 (24–28)	26 (26–30)	.42 ^b
Illness duration, median (CI), d	35 (27–55)	40 (33–51)	40 (36–46)	.86
No. of lesions, median (CI)	1 (1.06–1.8)	1 (1.25–2.13)	1 (1.07–1.53)	.16 ^c
Total lesion circumference, median (CI), mm	300 (121–1480)	154 (165–380)	246 (247–464)	.38
Frequency of lesions above the belt, No. (%)	6 (46)	6 (26)	8 (22)	.78
Frequency of patients with lymph node enlargement, No. (%)	5 (38)	12 (52)	19 (53)	.84
Blood sugar levels, median (CI), mg/dl	238 (201–301)	293 (258–349)	98 (101–118)	.0001
Failure of therapy, No. (%)	9 (69)	3 (13)	16 (44)	.0012 ^c

^aStudent t test.

^bAll other values determined using the Kruskal-Wallis test.

^cFisher exact test.

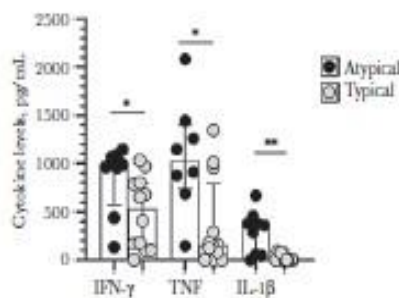


Figure 3. Cytokine levels in the supernatants of mononuclear cells in patients with diabetes mellitus with atypical and typical ulcers. Interferon γ , tumor necrosis factor, and interleukin-1 β levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatants of 3×10^6 peripheral blood mononuclear cells stimulated with soluble *Leishmania* antigen (10 μ g/ml). Dates are represented by medians and interquartile ranges. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. Abbreviations: IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

cells in CL+DM patients. Recently, emphasis has been given to the role of CD8+ T cells in the pathology of CL caused by *L. braziliensis*. CD8+ T cells from CL patients display high expression of cytotoxicity markers, but while they do not kill *Leishmania*, they kill *L. braziliensis*-infected cells [40–42]. The killing of infected cells leads to inflammasome formation, the release of IL-1 β , and ulcer development [41]. Here we found lower frequencies of CD8+ T cells in lesions from diabetic patients compared with those with only CL. We speculate that the decreases in CD8+ T cells and necrosis observed in the ulcers of CL+DM patients may be responsible for the appearance of atypical superficial ulcers.

In light of previous evidence documenting the ability of diabetes to modify the clinical presentation of other infections, the observed similarity among the majority of clinical variables between the 2 groups was an unexpected finding. It is known that around 60% of CL patients are typically male [43, 44]; however, 69% of those with CL+DM were women. Another finding, and perhaps the most important of our study, was the observation that 36% of CL+DM patients presented atypical lesions. Atypical lesions are also found in patients infected with HIV, in those with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), and in pregnant women [7, 45, 46]. Notably, the lesions documented herein in patients with DM were remarkably distinct from all other types of lesions described in CL patients [5].

Atypical CL lesions in patients with HIV and in those with diffuse cutaneous leishmaniasis occur due to an impairment in T-cell response [47]. Alternatively, large vegetative lesions in pregnant women with CL have been associated with an inflammatory reaction due to increased CD4+ T cells expressing IL-4 at the lesion site, indicating a shift to Th2 immune response [48]. This evidence indicates that different inflammation pathways may be related to diverse clinical outcomes in the same disease. Although we found decreased frequencies of CD8+ T

cells and necrosis at the lesion site of CL+DM patients, we also observed higher production of IFN- γ , TNE, and IL-1 β in the supernatants of mononuclear cells from DM patients with atypical lesions compared with those with typical lesions. It is possible that high blood sugar levels may increase the production of IFN- γ , IL-1 β , IL-6, and TNF [49, 50]. The role of an exaggerated inflammatory response in the pathogenesis of *L. braziliensis* has been well documented, as has an association between the exacerbated production of these cytokines and lesion size, as well as therapeutic failure [36, 51].

The most important finding herein was documentation of the capability of DM to modify the clinical presentation of CL, due to the appearance of atypical CL lesions associated with a poor response to therapy. The influence of DM on clinical CL presentation stands in agreement with a recent case report detailing a patient from Morocco who presented vegetative lesions [26]. In our study, the atypical lesions observed were predominantly flat, usually large, and lacked well-defined borders. While more superficial ulcers may occur due to a lower frequency of cytotoxic CD8+ T cells at the lesion site and decreased necrosis, the high rate of failure of therapy seen in these patients may be occurring due to an increase in the synthesis of proinflammatory cytokines.

Acknowledgments

We thank Cristiano Sampato Franco for his secretarial assistance in the preparation of this manuscript. The authors are also grateful to Andris K. Wabler for English language revision services and manuscript copyediting assistance.

Financial support. This study was supported by the National Institutes of Health (NIH A1136032), National Research Council (CNPq), and Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation.

Potential conflicts of interest. The authors have declared that no conflict of interests exist. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 1987; 156:73–83.
2. Tureta ML, Machado PR, Ko A, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2002; 186:1829–34.
3. Vernal S, De Paula NA, Gomes CM, Roselino AM. Disseminated leishmaniasis by *Leishmania viannia subgenus*: a series of 18 cases in Southeastern Brazil. *Open Forum Infect Dis* 2016; 3:XXX–XX.
4. Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:712–5.
5. Mairale CB, Maia LC, Soares GC, et al. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Acta Trop* 2017; 172:248–54.
6. Quicero A, Souza R, Heine C, et al. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2012; 50:4028–34.
7. Guimarães LH, Quicero A, Silva JA, et al. Atypical manifestations of cutaneous leishmaniasis in a region endemic for *Leishmania braziliensis*: clinical, immunological and parasitological aspects. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0005100.
8. Silva SC, Guimarães LH, Silva JA, et al. Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that *Leishmania braziliensis* strain helps determine immunity

- response among American tegumentary leishmaniasis patients. *Acta Trop* 2018; 178:34-9.
9. Peters NC, Egen JC, Secundino N, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008; 321:970-4.
 10. Ribeiro-Gomes FI, Sacks D, et al. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:50.
 11. Jochem RC, Teixeira C. Leishmania commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol* 2009; 25:145-7.
 12. Conceição I, Davis R, Carneiro PP, et al. Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004715.
 13. Carneiro PP, Conceição I, Macedo M, et al. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PLoS One* 2016; 11:e0148084.
 14. Polari LJ, Carneiro PP, Macedo M, et al. *Leishmania braziliensis* infection enhances toll-like receptors 2 and 4 expression and triggers TNF- α and IL-10 production in human cutaneous leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9:120-38.
 15. Srivastava A, Singh N, Mishra M, et al. Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania altonovae* amastigote-specific antigens. *Mol Cell Biochem* 2012; 359: 359-68.
 16. Unger A, O'Neal S, Machado PR, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:574-9.
 17. Costa BS, Carvalho LR, Campos TM, et al. Early cutaneous leishmaniasis patients infected with *Leishmania braziliensis* express increased inflammatory responses after antimony therapy. *J Infect Dis* 2018; 217:840-50.
 18. Bacellar O, Leão H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002; 70: 6734-40.
 19. Zhou B. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.6 million participants. *The Lancet* 2016; 387:1513-30.
 20. Natchella PK, Babu S. Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis. *Immunology* 2017; 152: 13-24.
 21. Aydinli B, Nagash M, Geneta M, et al. Immunological impacts of diabetes on the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol Res* 2019; 2019:6196532.
 22. GB-Santana L, Almeida-Junior JL, Oliveira CA, et al. Diabetes is associated with worse clinical presentation in tuberculosis patients from Brazil: a retrospective cohort study. *PLoS One* 2016; 11:e0146876.
 23. Cheung N, Mitchell P, Wong TY, et al. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010; 376:124-36.
 24. Marboffer W, Stein M, Schleinöfer L, Federlin K. Evidence of in vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1993; 19:183-8.
 25. Albuquerque TC, Munhoz CD, Martins JO, et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:1037-44.
 26. McManus LM, Bloodworth BC, Prihoda TJ, et al. Agonist-dependent failure of neutrophil function in diabetes correlates with extent of hyperglycemia. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 395-404.
 27. Chihab S, Oudhri L, Zouhair K, et al. Unusual clinical presentation of cutaneous leishmaniasis in these diabetic patients [in French]. *Ann Dermatol Venerol* 2012; 139:542-5.
 28. Weirauch JL, Ieromimo SM, Gastam S, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3892-904.
 29. Saldanha MG, Quirós A, Machado PRL, et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 96:645-52.
 30. Goerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26:258-65.
 31. Rodrigues CE, Rodrigues ME, Henriques M, et al. *Candida* sp. infections in patients with diabetes mellitus. *J Clin Med* 2019; 8:76-130.
 32. Inasua D, Coutinho D, Martins M, et al. Neutrophil function impairment is a host susceptibility factor to bacterial infection in diabetes. In: Fuchs O, Athan SS, eds. *Cells of the Immune System*. 1st ed. Intech Open; 2019:1-22.
 33. Leite SA, Locatelli SR, Nogueira SE, et al. Impact of hyperglycemia on morbidity and mortality, length of hospitalization and rate of re-hospitalization in a general hospital setting in Brazil. *Diabetol Metab Syndr* 2010; 2:49-60.
 34. Baker EH, Wood DM, Brennan AJ, et al. Hyperglycaemia and pulmonary infection. *Proc Nutr Soc* 2006; 65:227-35.
 35. Carvalho AM, Novais FO, Paixão CS, et al. Glyburide, a NLRP3 inhibitor, decreases inflammatory response and is a candidate to reduce pathology in *Leishmania braziliensis* infection. *J Invest Dermatol* 2020; 140:246-9.e2.
 36. Novais FO, Carvalho AM, Clark ML, et al. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLoS Pathog* 2017; 13:e1006196.
 37. Hodgson K, Morris I, Bridson T, et al. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology* 2015; 144:171-85.
 38. Montoya-Ruano A, Castro-García P, Torres-Jaurez F, et al. Glucose levels affect IL-37 expression in monocyte-derived macrophages altering the *Mycobacterium tuberculosis* intracellular growth control. *Microb Pathog* 2016; 97: 148-53.
 39. Lopez-Lopez N, Martínez AGR, García-Hernández MH, et al. Type-2 diabetes alters the basal phenotype of human macrophages and diminishes their capacity to respond, internalize, and control *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018; 113:e170326.
 40. Santos Gda S, Rosaventura V, Ribeiro Cardoso C, et al. CD8(+) granzyme B(+) mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+) mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 2013; 133:1533-40.
 41. Novais FO, Carvalho LR, Graff JW, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003504.
 42. Cardoso TM, Machado A, Costa DL, et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun* 2015; 83:898-906.
 43. Jeronima L, Cleby MJ, Guimarães LH, et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania* (Vianna) *braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86:626-33.
 44. Teles GC, Fonseca FR, Gonçalves MIR. American tegumentary leishmaniasis in the Brazilian Amazon from 2010 to 2014. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2019; 61:e22.
 45. Morgan DJ, Guimarães LH, Machado PR, et al. Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: exuberant lesions and potential fetal complications. *Clin Infect Dis* 2007; 45:478-82.
 46. Barral A, Costa IM, Hittencourt AI, et al. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol* 1995; 34:474-9.
 47. Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell response and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 537-42.
 48. Dutra WO, Barbosa DE, de Souza PEA, et al. A Th2-type response is associated with exuberant lesions in pregnant women infected with *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis* 2019; 219:480-8.
 49. Pickup JC, Chuang GD, Thomas SM, Bart D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67:291-300.
 50. Rapoport MI, Mor A, Varol E, et al. Decreased secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1998; 11:635-42.
 51. Carvalho LJ, Panto S, Dutra WO, et al. Effect of LACK and KMP11 on IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 2006; 61:337-42.

13. TÍTULOS E REFERÊNCIAS DE OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO.

Emerging Microbes & Infections
2020, VOL. 9
<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1773744>



OPEN ACCESS

Unbalanced production of LTB₄/PGE₂ driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis

Icaro Bonyek-Silva^{a,b}, Sara Nunes^{a,b}, Reinan L. Santos^{a,b}, Filipe R. Lima^{a,b}, Alexsandro Lago^b, Juliana Silva^b, Lucas P. Carvalho^{a,b}, Sergio M. Arruda^{a,b}, Henrique C. Serezaní^c, Edgar M. Carvalho^{a,b,d}, Claudia I. Brodskyn^{a,b,e} and Natalia M. Tavares^{a,b,e}

^aGonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Brazil; ^bFederal University of Bahia (UFBA), Salvador, Brazil; ^cDivision of Infectious Diseases, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA; ^dNational Institute of Science and Technology (INCT) in Tropical Diseases, Salvador, Brazil; ^eNational Institute of Science and Technology (INCT), Institute of Investigation in Immunology (iii), São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Poorly controlled diabetes mellitus leads to several comorbidities, including susceptibility to infections. Hyperglycemia increases phagocyte responsiveness, however immune cells from people with diabetes show inadequate antimicrobial functions. We and others have shown that aberrant production of leukotriene B₄ (LTB₄) is detrimental to host defense in models of bacterial infection. Here, we will unveil the consequences of high glucose in the outcome of *Leishmania braziliensis* skin infection in people with diabetes and determine the role of LTB₄ in human phagocytes. We show that diabetes leads to higher systemic levels of LTB₄, IL-6 and TNF-α in cutaneous leishmaniasis. Only LTB₄ correlated with blood glucose levels and healing time in diabetes comorbidity. Skin lesions of people with leishmaniasis and diabetes exhibit increased neutrophil and amastigote numbers. Monocyte-derived macrophages from these individuals showed higher *L. braziliensis* loads, reduced production of Reactive Oxygen Species and unbalanced LTB₄/PGE₂ ratio. Our data reveal a systemic inflammation driven by diabetes comorbidity in opposition to a local reduced capacity to resolve *L. braziliensis* infection and a worse disease outcome.

ARTICLE HISTORY Received 24 March 2020; Revised 19 May 2020; Accepted 20 May 2020

KEYWORDS Diabetes; human leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; lipid mediators; LTB₄; PGE₂

Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, which occurs when insulin is not produced (Type 1) or inefficiently recognized (Type 2) [1,2]. Both types of diabetes are associated with secondary complications, such as cardiovascular diseases, retinopathy, nephropathy, neuropathy, reduced wound healing and increased susceptibility to infections, particularly in the skin [1–7]. The recent increase in the burden of diabetes [8,9] and reports of abnormal cases of cutaneous leishmaniasis (CL) in individuals with diabetes [10,11] led us to investigate the consequences of association of these diseases. The main goal of this study is to evaluate the influence of diabetes and its inflammatory mediators in the outcome of *Leishmania braziliensis* skin infection.

Hyperglycemia is thought to cause a state called sterile inflammation, characterized by a low-grade inflammatory response [12]. Although inflammation is crucial to clear pathogens and to induce tissue repair, chronic and sustained inflammatory responses cause

tissue damage, leading to immunopathology and worse disease outcome. The tissue damage results from increased production of TNF-α, Interleukin-1β, metalloproteases and recently, we have shown that lipid mediators, such as leukotrienes (LTB₄), when produced in abundance, increases susceptibility to skin infection in experimental models of diabetes [13–15]. These inflammatory mediators are also involved in CL caused by *Leishmania braziliensis*, the causative agent of CL in Brazil, resulting in skin ulcerative lesions [16]. Histological analysis of CL ulcers revealed rare presence of parasites and an intense inflammatory infiltrate, which can lead to a delayed healing process and chronic lesions [17]. In this context, we and others also have shown the participation of lipid inflammatory mediators, including LTB₄ and Prostaglandin E₂ (PGE₂) in phagocyte antimicrobial effector functions upon infection of different pathogens, including *Leishmania* spp. [18–21].

Lipid mediators are produced from the metabolism of arachidonic acid (AA) present in the cell membrane

CONTACT Natalia M. Tavares natalia.tavares@fio-cruz.br Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Institute, LaPHE, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador, BA, Brazil

Supplemental data for this article can be accessed <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1773744>

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shengyuan Cultural Communication Co., Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Article

Multi-omic Analyses of Plasma Cytokines, Lipidomics, and Transcriptomics Distinguish Treatment Outcomes in Cutaneous Leishmaniasis

Hayna Malta-Santos,^{1,2} Kiyoshi F. Fukutani,^{2,3} Carlos A. Sorgi,⁴ Artur T.L. Queiroz,^{2,3} Viviane Nardini,⁴ Juliana Silva,⁵ Alex Lago,⁵ Lucas P. Carvalho,^{2,3} Paulo L.R. Machado,⁵ Patricia T. Bozza,⁶ Jaqueline França-Costa,^{2,3} Lucia H. Faccioli,⁴ Edgar M. Carvalho,^{1,2,3} Bruno B. Andrade,^{1,2,3,5,6,7*} and Valéria M. Borges^{1,2,3,10,*}

SUMMARY

Leishmania braziliensis infection frequently results in cutaneous leishmaniasis (CL). An increase in incidence of drug-resistant CL leading to treatment failure has been reported. Identification of reliable predictors of treatment outcomes is necessary to optimize patient care. Here, we performed a prospective case-control study in which plasma levels of cytokines and lipid mediators were assessed at different time points during antileishmanial therapy in patients with CL from Brazil. Multidimensional analyses were employed to describe a combination of biomarkers able to predict and characterize treatment failure. We found a biosignature influenced mainly by plasma levels of lipid mediators that accurately predicted treatment failure. Furthermore, transcriptomic analysis of a publicly available data set revealed that expression levels of genes related to lipid metabolism measured in skin lesions could distinguish treatment outcomes in CL. Thus, activation of pathways linked to lipid biosynthesis predicts treatment failure in CL. The biomarkers identified may be further explored as therapeutic targets.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a group of diseases caused by *Leishmania* spp parasites. The World Health Organization (WHO) considers leishmaniasis a serious public health concern (World Health Organization, 2018), with a worldwide incidence reaching as high as 1.2 million new cases every year (Ahuar et al., 2012). Individuals infected with *Leishmania* can develop a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from localized cutaneous disease (cutaneous leishmaniasis [CL]) to a chronic systemic illness named visceral leishmaniasis (VL) (Dutra et al., 2011). The determinants of disease outcomes are described to involve factors directly linked to parasite species, as well as those associated with the host immune system (Dutra et al., 2011). Brazil is a major endemic region for both cutaneous and visceral leishmaniasis, with a recent geographical spread of disease transmission and increased detection of cases in more urbanized areas (Bustamante et al., 2009; Costa, 2008; Desjeux, 2001; Nascimento et al., 2008). Within this country, *Leishmania braziliensis* accounts for the vast majority of the CL cases (Scorza et al., 2017). This parasite species has been associated with development of different clinical forms such as localized, mucosal, and disseminated leishmaniasis (Queiroz et al., 2012; Scorza et al., 2017), highlighting its contribution to the high burden of this disease. Although there are many different pathophysiologic mechanisms underlying the progression of distinct clinical forms of leishmaniasis, the treatment options are few, with no significant recent advances in the field that have led to implementation of new therapies (Llana et al., 2018).

Pentavalent antimonials (Sb³⁺) are the first-line drugs used to treat leishmaniasis in Brazil and other countries (World Health Organization, 2018). Other medications, such as amphotericin B, pentamidine, and miltefosine, are often used as alternative treatment options in patients who have failed Sb³⁺ therapy or relapsed (Llana et al., 2018). Treatment failure is reflected by persistence of open ulcers without re-epithelialization, whereas relapse is defined as the reactivation of lesions once the therapy is terminated (Ponte-Suero et al., 2017). In Brazil, studies have shown that occurrence of treatment failure in CL can be as high as 45% (Machado et al., 2010; Prates et al., 2017). Factors that may underlie this high incidence of unfavorable

¹Faculdade de Medicina da Bahia (FAMED), Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

²Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil

³Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER), Salvador, Brazil

⁴Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

⁵Serviço de Imunologia, C-HUPES, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

⁶Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁷Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil

⁸Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate University, Salvador, Brazil

⁹These authors contributed equally

^{*}Lead Contact

^{*}Correspondence: brunoandrade@focmed.br (B.B.A.)

valeria.jorge@focmed.br (V.M.B.)
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101840>



Localized skin inflammation during cutaneous leishmaniasis drives a chronic, systemic IFN- γ signature

Camila Farias Amorim, Fernanda O. Novais, Ba T. Nguyen, Mauricio T. Nascimento, Jamile Lago, Alexsandro S. Lago, Lucas P. Carvalho, Daniel P. Beiting, Phillip Scott

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.03.20240978>

Abstract

Cutaneous leishmaniasis is a localized infection controlled by CD4⁺ T cells that produce IFN- γ within lesions. Phagocytic cells recruited to lesions, such as monocytes, are then exposed to IFN- γ which triggers their ability to kill the intracellular parasites. Consistent with this, a transcriptional analysis of lesions from patients identified the presence of a strong interferon stimulated gene (ISG) signature. To determine what systemic responses are occurring that might influence the disease, we performed RNA sequencing (RNA-seq) on the blood of *L. braziliensis*-infected patients, as well as healthy controls. Functional enrichment analysis identified a transcriptional ISG signature as the dominant response in the blood of patients. An increase in monocytes and macrophages in the blood, estimated from our RNA-seq dataset, was positively correlated with this ISG signature. Consistent with this result, patients had circulating IFN- γ in their serum. A cytotoxicity signature, which is a dominant feature in the lesions, was also found in the blood and correlated with an increased abundance of cytolytic cells. Thus, two transcriptional signatures present in lesions were found systemically, although with a substantially reduced number of differentially expressed genes (DEGs). Finally, we found that the number of DEGs and ISGs in leishmaniasis was similar to tuberculosis – another localized infection – but significantly less than observed in malaria. In contrast, the cytolytic signature and increased cytolytic cell abundance was not found in tuberculosis or malaria. Our results indicate that systemic signatures can reflect what is occurring in leishmanial lesions. Furthermore, the presence of an ISG signature in blood monocytes and macrophages suggests a mechanism to limit systemic spread of the parasite, as well as enhance parasite control by pre-activating cells prior to lesion entry.

Influence of Obesity on Clinical Manifestations and Response to Therapy in Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*

Tainã Lago, Lucas Carvalho, Mauricio Nascimento, Luiz H Guimarães, Jamile Lago, Léa Castellucci, Augusto M Carvalho, Alex Lago, Edgar M Carvalho ✉

Clinical Infectious Diseases, ciab236, <https://doi.org/10.1093/cid/ciab236>

Published: 16 March 2021 Article history ▼

“ Cite Permissions Share ▼

Abstract

Background

Cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *L. braziliensis* is characterized by a single ulcer or multiple cutaneous lesions with raised borders. Cure rates below 60% are observed in response to meglumine antimoniate therapy. We investigated the impact of obesity on CL clinical presentation and therapeutic response.

Methods

A total of 90 age-matched CL patients were included (30 obese, 30 overweight and 30 with normal BMI). CL was diagnosed through documentation of *L. braziliensis* DNA by PCR or identification of amastigotes in biopsied skin lesion samples. Serum cytokine levels were determined by chemiluminescence. Antimony therapy with Glucantime (20mg/kg/day) was administered for 20 days.

Results

Obese CL patients may present hypertrophic ulcers rather than typical oval, ulcerated lesions. A direct correlation between BMI and healing time was noted. After one course of Antimony, cure was achieved in 73% of patients with normal BMI, 37% of overweight subjects, yet just 18% of obese CL patients ($p < 0.01$). Obese CL cases additionally presented higher leptin levels than overweight patients or those with normal BMI ($p < 0.05$).

Conclusions

Obesity modifies the clinical presentation of CL and host immune response, and is associated with greater failure to therapy.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, Obesity, Atypical lesions, Immune response, Cure rate

Topic: obesity, body mass index procedure, immune response, cutaneous leishmaniasis, ulcer, leishmania braziliensis, signs and symptoms, overweight

Issue Section: Major Article