

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA**

GABRIELA MARQUEZIN BORTHOLAZZI

**EFEITO DO MESILATO DE DESFERROXAMINA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM
O MALTOLATO DE GÁLIO NA REPLICAÇÃO DO *Mycobacterium leprae***

**BAURU
2023**

GABRIELA MARQUEZIN BORTHOLAZZI

**EFEITO DO MESILATO DE DESFERROXAMINA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM
O MALTOLATO DE GÁLIO NA REPLICAÇÃO DO *Mycobacterium leprae***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP- “Dr. Antônio Guilherme de Souza” como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração Análises Clínicas, Diagnóstico Laboratorial e Laboratório de Pesquisa sob orientação da Ms. Suzana Madeira Diório.

**BAURU
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO
INSTITUTO "LAURO DE SOUZA LIMA"

B648e Bortholazzi, Gabriela Marquezin

Efeito do mesilato de desferroxamina e de sua associação com o maltolato de gálio na replicação do *Mycobacterium leprae* / Gabriela Marquezin Bortholazzi, Bauru, 2023.
33f.

Monografia apresentada ao programa de Especialização Multiprofissional em Assistência Dermatológica do Centro Formador de Recursos Humanos para o SUS/SP "Dr. Antônio Guilherme de Souza", unidade didática Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Me. Suzana Madeira Diório.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Mesilato de desferroxamina 4. Gálio 5. Replicação. I. Diório, Suzana Madeira. II. Título.

CRB8/8247

GABRIELA MARQUEZIN BORTHOLAZZI

**EFEITO DO MESILATO DE DESFERROXAMINA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM
O MALTOLATO DE GÁLIO NA REPLICAÇÃO DO *Mycobacterium leprae***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP- “Dr. Antônio Guilherme de Souza” como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração Análises Clínicas, Diagnóstico Laboratorial e Laboratório de Pesquisa sob orientação da Ms. Suzana Madeira Diório.

Bauru, 23/02/2023

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, granulomatosa de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*. A introdução da poliquimioterapia pela Organização Mundial da Saúde em 1981, resultou na cura de milhões de indivíduos infectados pelo bacilo, no entanto ela ainda é considerada endêmica e negligenciada em países como o Brasil. A indústria farmacêutica não tem mostrado interesse em investir na pesquisa de novos fármacos, porém novas opções terapêuticas são importantes para o controle da endemia. Uma das alternativas de terapia para infecções que são causadas por microrganismos intracelulares é o bloqueio de ferro. Este metal tem grande importância na replicação dos patógenos no hospedeiro então, o uso de quelantes para a redução da carga parasitária é uma das possibilidades estudadas. Um dos compostos utilizados como quelante do ferro é o mesilato de desferroxamina (DFX), que tem atividade antimicrobiana e vem sendo estudado no tratamento de diversas doenças como a talassemia. O maltolato de gálio também é um quelante capaz de se ligar ao ferro, competindo em sua via metabólica. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do DFX, administrado sozinho ou em associação com o maltolato de gálio, na replicação do *Mycobacterium leprae* em modelo experimental murino. Os camundongos infectados foram divididos em três grupos (controle, DFX e DFX + gálio) e o tratamento teve início 60 dias após a inoculação sendo administrado por 90 dias. Os animais receberam ração com restrição de ferro e água ad libitum. A suspensão do maltolato de gálio (150mg/kg) foi administrada diariamente via oral por gavage. O DFX foi aplicado por via intraperitoneal na concentração de 10 mg/kg, uma vez por semana durante cinco semanas. Os camundongos foram eutanasiados após 150 e 240 dias após inoculação. Em relação ao primeiro tempo de eutanásia (150 dias), não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de bacilos recuperados entre o controle e os animais tratados; após 240 dias, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o número de bacilos recuperados entre o grupo controle e os animais tratados com DFX e DFX + gálio oral ($p < 0,0088$ e $p < 0,0032$ respectivamente). Os resultados mostraram que o uso de quelantes de ferro como o DFX e o gálio oral não impediram a replicação do bacilo, mas contribuíram para a diminuição da quantidade recuperada (carga bacilar).

Palavras-chave: Hanseníase 1. *Mycobacterium leprae* 2. Mesilato de desferroxamina 3. Gálio 4. Replicação 5.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious, contagious, granulomatous disease of chronic evolution, caused by *Mycobacterium leprae*. The introduction of multidrug therapy by the World Health Organization in 1981 resulted in the cure of millions of individuals infected by the bacillus, however it is still considered endemic and neglected in countries like Brazil. The pharmaceutical industry has not shown interest in investing in the research of new drugs, but new therapeutic options are important for controlling the endemic disease. One of the therapy alternatives for infections that are caused by intracellular microorganisms is iron blockade. This metal is of great importance in the replication of pathogens in the host, so the use of chelators to reduce the parasite load is one of the possibilities studied. One of the compounds used as a iron chelator is desferrioxamine mesylate (DFX), which has antimicrobial activity and has been studied in the treatment of various diseases such as thalassemia. Gallium maltolate is also a chelator capable of binding to iron, competing in its metabolic pathway. The objective of the study was to evaluate the effect of DFX, administered alone or in association with gallium maltolate, on the replication of *Mycobacterium leprae* in a murine experimental model. Infected mice were divided into 3 groups (control, DFX and DFX + gallium) and treatment started 60 days after inoculation and was administered for 90 days. The animals received iron-restricted chow and water ad libitum. The suspension of gallium maltolate (150mg/kg) was administered orally daily by gavage. DFX was applied intraperitoneally at a concentration of 10 mg/kg, once a week for five weeks. The mice were euthanized after 150 and 240 days after inoculation. Regarding the first time of euthanasia (150 days), there was no statistically significant difference between the number of bacilli recovered between the control and treated animals; after 240 days, there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the number of bacilli recovered between the control group and the animals treated with DFX and DFX + oral gallium ($p < 0.0088$ and $p < 0.0032$ respectively). The results showed that the use of iron chelators such as DFX and oral gallium did not prevent the bacillus from replicating, but contributed to a decrease in the amount recovered (bacillary load).

Keywords: Leprosy 1. *Mycobacterium leprae* 2. Gallium 3. Desferrioxamine mesylate 4. Replication 5.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVOS	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 ANIMAIS.....	14
4.2 INÓCULO.....	14
4.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS	14
4.4 EUTANÁSIA.....	15
4.5 PRAPARO DA SUSPENSÃO E CONTAGEM DO NÚMERO DE BACILOS OBTIDOS DO COXIM PLANTAR.....	15
4.6 ANÁLISE DE RESULTADOS	16
4.7 COMITE DE ÉTICA.....	16
5 RESULTADOS	17
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros casos de hanseníase relatados no Brasil são da época da colonização e, provavelmente, a doença foi trazida para as Américas pelos colonizadores espanhóis, portugueses e escravos africanos. A manutenção da doença é um problema de saúde pública que se dá pelas condições sanitárias desfavoráveis e a carência de recursos econômicos enfrentados por grande parte da população brasileira. ¹

É uma doença infectocontagiosa e de evolução lenta causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). O bacilo fica localizado de preferência na pele e nas células de Schwann e é um parasita intracelular obrigatório, principalmente de macrófagos. Sua reprodução acontece por fissão binária e são considerados organismos Gram-positivos e álcool-ácido resistentes (BAAR) quando submetidos a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. ^{2,3,4}

Uma das características marcantes do bacilo é a de não se reproduzir em meios de cultura artificiais ou celulares, o que a torna um grande obstáculo para o avanço em estudos relacionados à microbiologia do patógeno. Porém, em 1960, Charles Shepard demonstrou pela primeira vez a multiplicação do *M. leprae*, fora do organismo humano, em coxim plantar de camundongos imunocompetentes, inoculados com suspensão de bacilos obtido de paciente não tratado. ⁵

A padronização da técnica de inoculação (técnica de Shepard) foi um marco na pesquisa do bacilo e da doença, propiciando um importante avanço em estudos, especialmente na área de terapêutica e resistência medicamentosa. ⁶⁻⁷

O *M. leprae* se propaga pelo meio ambiente por meio das vias áreas superiores de uma pessoa que esteja infectada e sem tratamento, e isso pode afetar pessoas que sejam predispostas a essa doença. ²

Sua manifestação acontece por meio de sintomas e sinais dermatoneurológicos, afetando pele e os nervos periféricos, olhos, mãos e pés, podendo levar a deformidades e incapacidades físicas. Essas condições modificam diversos parâmetros na vida de uma pessoa com hanseníase, seja ele, sociais, emocionais e psicológicos e quando associados prejudicam a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença. ⁸

O diagnóstico da hanseníase é realizado, principalmente, por meio de exame clínico dermatoneurológico para identificação de lesões/áreas da pele com alterações de sensibilidade e/ou nervos periféricos. Entretanto, um dos exames laboratoriais que pode auxiliar no diagnóstico é o de raspado intradérmico (baciloscopia) considerado de fácil execução, baixo custo e pouco invasivo. Outros exames como histopatologia, eletrofisiológicos, teste rápido imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgM para *M. leprae* e PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) também auxiliam no diagnóstico diferencial de outras doenças dermatoneurológicas, casos suspeitos de recidiva e tratamento. ^{9,10,11}

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 foram registrados no mundo 127.396 casos novos da hanseníase, sendo que destes, 17.979 foram no Brasil. A diminuição no número de casos diagnosticados acredita-se que esteja associada à pandemia da Covid-19 e o isolamento social imposto. Além disso, os serviços de saúde ficaram sobrecarregados, priorizando atendimentos de urgência/emergência. ^{11,12}. O diagnóstico tardio da hanseníase é um problema grave pois aumenta o risco de o paciente já apresentar algum grau de incapacidades físicas.

A implantação da poliquimioterapia (PQT) em 1981 pela OMS foi um dos mais importantes avanços técnicos na história do controle da doença, contribuindo drasticamente para queda da prevalência da hanseníase. O Brasil, por meio da Coordenação Nacional do Programa de Hanseníase, adotou a PQT/OMS como o único tratamento para os doentes de hanseníase apenas em 1991. ^{13,14}. O tratamento varia de acordo com a forma clínica da doença sendo que, para os pacientes que apresentam a forma paucibacilar (PB) a duração é de seis meses e para os multibacilares (MB) a duração é de doze meses. ¹¹

O esquema terapêutico é composto pela associação de três antimicrobianos – rifampicina (RFP), dapsona (DDS) e clofazimina (CLO) – a qual denominamos de Poliquimioterapia Única (PQT-U). Essa associação diminui o risco de o bacilo desenvolver resistência medicamentosa, o que ocorre com frequência quando se utiliza apenas uma droga, impossibilitando a cura da doença. Além disso, a PQT atua prevenindo as deformidades e incapacidades físicas que a doença costuma apresentar durante a evolução. ¹¹

A DDS exerce efeito bacteriostático sobre o bacilo que age por meio da competição com o ácido paraaminobenzóico (PABA), fazendo com que ocorra uma queda ou bloqueio da síntese do ácido fólico, inibindo o crescimento bacteriano. ¹⁵

A RFP é um derivado piperazínico da rifampicina SV extraída do *Streptomyces mediterranei*. Possui um efeito altamente bactericida atuando seletivamente sobre a enzima RNA polimerase, unindo-se a esta de forma não covalente, produzindo uma mudança de conformação, inativando-a e conseqüentemente bloqueando a síntese do RNA mensageiro. Devido a sua poderosa ação bactericida contra o *M. leprae*, a eficácia da PQT é grandemente dependente dessa droga. ¹⁶

A CLO também tem efeito bactericida, porém com menos intensidade, ligando-se preferencialmente ao DNA do bacilo. Sua atividade de ação é a desintegração do DNA bacteriano, levando a apoptose, isso por conta da ativação da fosfolipase A2 bacteriana e assim tem a liberação de lisofosfolípidios que é tóxico para as micobactérias. Exibe alguma atividade antiinflamatória clinicamente importante no controle do eritema nodoso hansênico, no entanto, seu mecanismo de ação exato é desconhecido. ¹⁷

De acordo com a OMS¹⁸, a ofloxacina (OFLO) é uma droga utilizada como substitutiva naqueles casos em há resistência medicamentosa. Porém a utilização dessa droga em excesso e irregular pode levar a quadros de resistência também para o *M. leprae*. A OFLO é antibiótico bactericida e pertence à classe das fluoroquinolonas. ¹⁹

A minociclina tem ação bactericida e faz parte do grupo das tetraciclinas. É uma droga utilizada como substitutiva no esquema terapêutico. Tem função de inibir a síntese proteica por ligação com os ribossomos dos bacilos. Sua eficácia é maior quando combinada com a dapsona e a rifampicina. ^{20,21}

A hanseníase é considerada uma doença negligenciada devido à sua prevalência em pessoas com baixas condições socioeconômicas. Por esse motivo, a indústria farmacêutica não tem interesse em investir na pesquisa de novos fármacos e as agências de fomento à pesquisa não tem aberto chamadas com apoio financeiro à projetos nesta linha de investigação. ²². No entanto, a busca por novos fármacos é

muito importante para o controle da endemia e também para aqueles casos em que o bacilo é resistente ao esquema padrão.

O Fe é fundamental para a regulação do sistema imunológico humano, atuando tanto na resposta celular quanto humoral. Portanto, a mudança na disponibilidade de Fe para o organismo é uma tática para aumentar o potencial de defesa do hospedeiro e diminuir o progresso da doença. ²³

Além de atuar no sistema imunológico humano, o Fe também é um metal de extrema importância para a sobrevivência de microrganismos patogênicos, sendo essencial na interação entre ele e o seu hospedeiro. Quando se tem uma dieta rica em ferro o risco de desenvolver uma infecção é alto, porque um dos efeitos desse metal é favorecer a sobrevivência de bactérias. ^{24,25}

Estudos sobre a proliferação de bactérias e fungos no tecido do hospedeiro têm demonstrado que seu crescimento é limitado não só por mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também pela disponibilidade de nutrientes, como o Fe, importante fator de crescimento que participa de processos biológicos essenciais como transporte de oxigênio, regulação gênica e síntese de DNA. ^{26,27}. A necessidade de Fe e a capacidade de adquiri-lo in vivo têm sido descritas em diversos agentes patogênicos como fatores de virulência. ²⁸

Em bactérias patogênicas, um dos fatores que desencadeiam a infecção e conseqüentemente a sua colonização é a privação de Fe, quando em contato com o hospedeiro, pois a quantidade de Fe livre é estritamente limitada e geralmente ligada a proteínas, tais como transferrina, lactoferrina e ferritina. ^{29,30}

O Fe pode se apresentar em dois tipos de estados de oxidação, sendo eles o Fe²⁺ (íon ferroso) e Fe³⁺ (íon férrico). As espécies do gênero *Mycobacterium* são capazes de absorver a forma de Fe³⁺ por meio de estratégias para a sua sobrevivência e crescimento, podendo causar infecções em seus hospedeiros. ^{31,32}

Uma das alternativas de terapia para infecções que são causadas por microrganismos intracelulares é o bloqueio de Fe. Este metal tem grande importância na replicação dos patógenos no hospedeiro então, o uso de quelantes para a redução da carga parasitaria é uma das possibilidades estudadas. ^{25,33}

Os dois tipos de íons do ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) podem fazer ligações que são conhecidas como quelantes que por sua vez são capazes de fazer ligações com o cobre, zinco ou gálio. O uso de moléculas quelantes é uma das estratégias para a restrição de Fe, pois elas retêm o metal, impedindo que ele seja absorvido pelo microrganismo. ^{24,34}

Um dos compostos utilizados como quelante do Fe, e que é utilizado no tratamento da sobrecarga do mesmo no organismo, é o mesilato de desferroxamina (DFX). O DFX também tem atividade antimicrobiana e vem sendo estudado no tratamento de diversas doenças como a talassemia. ³⁵ Ele está disponível desde 1981, sendo indicado para pacientes que apresentam doença falciforme, betatalassemia, síndrome mielodisplásica, aumento de ferro no organismo e para anemias que precisam de transfusões de sangue. ³⁶

Estudos relatam uma relação entre o Fe e o processo de infecção por alguns microrganismos como o *Trypanosoma cruzi*. Lalonde e Holbein³⁷ e Loo e Lalonde³⁸ utilizaram camundongos infectados pelo parasita, que foram tratados com DFX ou com uma dieta com deficiência de ferro; eles observaram que após o tratamento com o DFX a mortalidade e a parasitemia diminuíram e, como consequência, houve uma melhora no quadro infeccioso. ²³

2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença negligenciada e endêmica em vários países, inclusive no Brasil. A PQT é composta por três fármacos que são administrados concomitantemente a fim de prevenir a resistência medicamentosa. Os relatos de casos de resistência têm aumentado e isto tem despertado grande preocupação entre os programas nacionais e internacionais de controle da doença.

Vale lembrar que é de extrema importância que o bacilo resistente seja detectado, tanto para orientar o tratamento como para evitar que essas bactérias sejam transmitidas para outras pessoas, incluindo os próprios familiares do paciente. No entanto, o processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é complexo e de alto custo, que pode demorar até 10 anos ou mais e com baixa probabilidade de sucesso, ou seja, chegar até o paciente.

Apesar da PQT ter se mostrado um dos mais importantes avanços técnicos na história do controle da doença, é importante salientar que o número de drogas disponíveis para o tratamento é bastante reduzido. Nos casos em que o bacilo é resistente ou o paciente apresenta algum efeito colateral à uma das drogas do esquema padrão, restam poucas medicações alternativas.

Em estudo realizado por Bernstein³⁹, foi verificado que o maltolato de gálio compete com o ferro em sua via metabólica. Em outro estudo realizado por pesquisadores da instituição, observou-se que esse composto exerceu um efeito na redução da replicação do *M. leprae* em camundongos BALB/c inoculados com o bacilo (dados não publicados).

Em nosso estudo utilizamos o mesilato de desferroxamina (DFX), quelante de ferro, para avaliação da associação entre o maltolato de gálio e o DFX e observar se haveria uma diminuição ou inibição na replicação do bacilo.

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito do mesilato de desferroxamina na replicação do *M. leprae* em modelo experimental murino.

Avaliar o efeito do mesilato de desferroxamina associado ao maltolato de gálio na replicação do *M. leprae* em modelo experimental murino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 30 camundongos isogênicos, fêmeas, da linhagem BALB/c, com seis a sete semanas de idade, provenientes do biotério do Instituto "Lauro de Souza Lima", Bauru – São Paulo. Os bacilos foram obtidos de camundongos atímicos nude (*athymic nude, nu/nu – Foxn1nu*) previamente inoculados por via intradérmica, em ambos coxins plantares traseiros, com uma suspensão da cepa *Tha153* de *M. leprae*, conforme descrito por Trombone. ⁴⁰

4.2 INÓCULO

Os camundongos foram inoculados em ambos coxins plantares traseiros, por via intradérmica, com uma suspensão contendo $5,0 \times 10^3$ bacilos/0,03ml, de acordo com protocolo descrito em Laboratory Techniques for Leprosy. ⁴¹. Brevemente, os coxins plantares traseiros de um camundongo nude foram excisados e macerados em solução salina balanceada de Hank's para preparo da suspensão bacilar; em seguida, para ajuste da concentração do inóculo, 30 μ L da suspensão foram depositados em uma lâmina de microscopia para contagem do número de bacilos; a lâmina foi submetida a técnica de coloração de Ziehl Nielsen a frio.

4.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais inoculados foram divididos em 3 grupos, com 10 animais cada; o tratamento teve início após 60 dias de inoculação (figura 1) e foi administrado por 90 dias conforme descrito no quadro 1.

Figura 1: Linha do tempo do projeto



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 1: Esquema de administração do tratamento por cada grupo do estudo.

GRUPO	TRATAMENTO
Controle (CTL)	Não tratado
Desferroxamina (DFX)	Desferroxamina intraperitoneal 10 mg/kg por camundongo, 1x/semana durante 5 semanas
Desferroxamina + Gálio Oral (DFX+GaM)	Desferroxamina intraperitoneal 10 mg/kg por camundongo, 1x/semana durante 5 semanas + gavagem de gálio 150 mg/kg/dia

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os animais receberam ração peletizada com restrição de ferro (Fe 25ppm, Rhoster) da marca Envigo e água *ad libitum*. A suspensão do maltolato de gálio foi preparada em metilcelulose a 1%, por uma farmácia de manipulação para controle de estabilidade e concentração; a administração oral foi realizada por meio da técnica de gavagem. O DFX (Desferal 500mg, Novartis) foi aplicado na concentração de 10 mg/kg e por via intraperitoneal.

4.4 EUTANÁSIA

Os camundongos foram submetidos a eutanásia após 150 dias de inoculação (1ª eutanásia - término do tratamento) e 240 dias (2ª eutanásia – 3 meses após termino do tratamento).

4.5 PRAPARO DA SUSPENSÃO E CONTAGEM DO NÚMERO DE BACIOS OBTIDOS DO COXIM PLANTAR

Após a eutanásia, o coxim plantar esquerdo dos camundongos infectados foram excisados e utilizados para análise de multiplicação do bacilo. Para a obtenção da suspensão bacilar, os coxins foram individualmente triturados em solução fisiológica estéril com auxílio de um homogeneizador de tecido (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX®); 10 µl desta suspensão e 10 µL de solução fenol-soro foram depositados e espalhado em uma lâmina de microscopia previamente marcada com três círculos de 1 cm cada. Após a secagem, os esfregaços foram fixados passando-se a lâmina três vezes na chama do bico de Bunsen. Em seguida as lâminas foram coradas pelo método de Ziehl Neelsen a frio. A contagem dos bacilos foi realizada com auxílio de microscópio, em objetiva de imersão (aumento de 100 x 10); foram observados 20 campos por círculo, totalizando 60 campos contados por amostra. Foi considerado

multiplicação bacilar o índice obtido de $\geq 10^5$ bacilos/coxim (Laboratory Techniques for Leprosy).⁴¹

4.6 ANÁLISE DE RESULTADOS

Os dados referentes à contagem do número de bacilos obtidos por coxim plantar foram analisados pelo software Graph Pad Prism® versão 9 para realização das análises estatísticas e montagem dos gráficos. Os dados foram analisados pelos testes Mann-Whitney e análises de variância ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunn para amostras independentes, para as comparações entre os grupos experimentais. O limite para significância estatística adotado foi de p -valor $< 0,05$.

4.7 COMITE DE ÉTICA

O projeto foi submetido a análise pela comissão científica do Instituto Lauro de Souza Lima/Bauru/SP e do comitê de ética no uso de animais (CEUA), sendo aprovados sob os números 407/22 e 003/19 respectivamente.

5 RESULTADOS

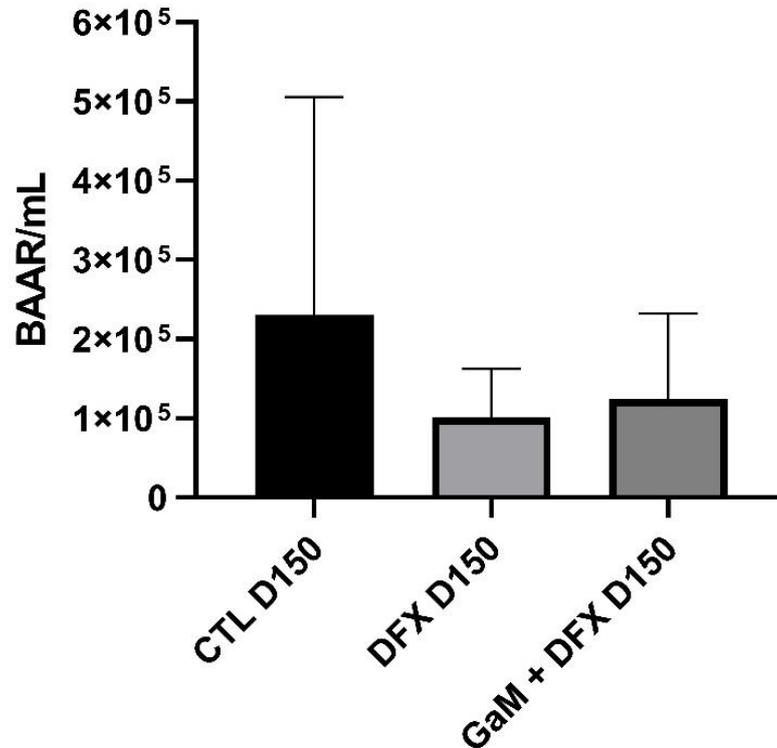
Após o término do tratamento foi realizada a primeira eutanásia (D150) dos camundongos inoculados (n=13), sendo 5 do grupo controle, 3 do grupo tratado com DFX e 5 do grupo tratado com gálio oral mais DFX. Dois camundongos foram a óbito antes de completar o tempo do tratamento, não sendo possível realizar a análise dos coxins plantares. Os resultados da contagem do número de bacilos por coxim plantar estão expressos na tabela 1. No grupo controle houve multiplicação do bacilo em 3/5 dos animais ($\geq 10e5$ bacilos/coxim). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de bacilos recuperados entre o controle e os animais tratados conforme descrito no gráfico 1. Em relação a contagem do número de bacilos no grupo tratado com gálio oral mais DFX, 3/5 dos camundongos obtiveram multiplicação bacilar ($\geq 10e5$ bacilos/coxim). Já no grupo tratado apenas com DFX, a multiplicação bacilar ocorreu em 2/3 dos animais ($\geq 10e5$ bacilos/coxim).

Tabela 1 – Número de bacilos recuperados por coxim plantar de camundongos BALB/c inoculados com *Mycobacterium leprae*, entre os diferentes grupos de tratamento, no tempo D150 (1ª eutanásia)

	BAAR/60 campos	Pata Ziehl (BAAR total)
Grupo controle positivo	41	1,80E+05
	0	0,00E+00
	58	2,54E+05
	8	3,51E+04
	103	4,51E+05
Gallium oral + DFX	52	2,28E+05
	56	2,45E+05
	23	1,01E+05
	2	8,77E+03
	9	3,94E+04
DFX	7	3,07E+04
	33	1,45E+05
	29	1,27E+05

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 1 – Número de bacilos recuperados por coxim plantar de camundongos BALB/c inoculados com *Mycobacterium leprae*, entre os diferentes grupos de tratamento, no tempo D150 (1ª eutanásia), comparando-se o grupo controle aos grupos tratados



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após 90 dias do tratamento e 240 (D240) da inoculação foi realizada a segunda eutanásia dos animais (n=14), sendo 5 do grupo controle, 4 do grupo tratado com DFX e 5 do grupo tratado com gálio oral mais DFX. Um camundongo foi a óbito antes de completar o tempo de tratamento, não sendo possível realizar a análise dos coxins plantares.

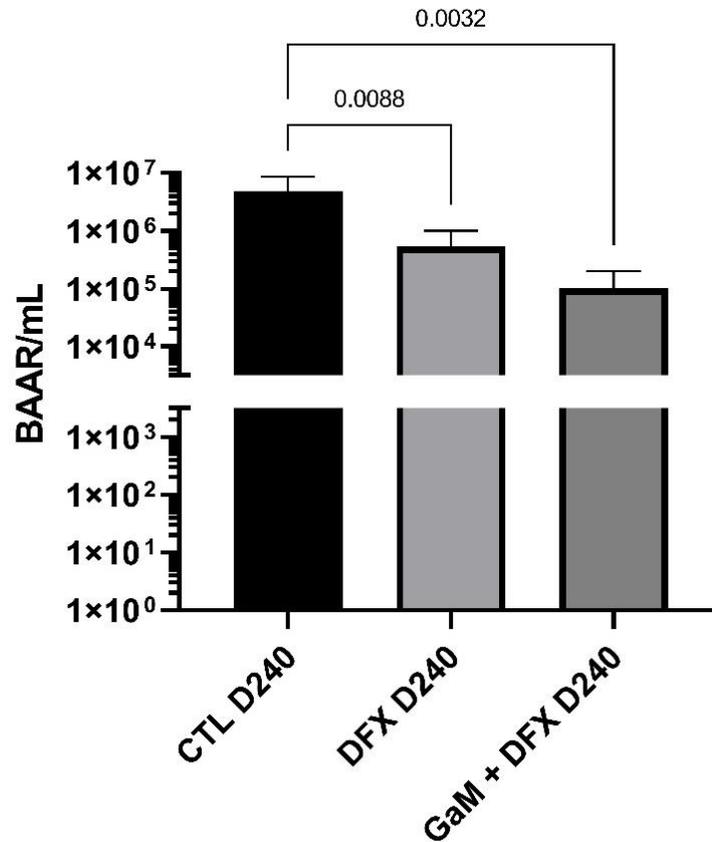
Os resultados da contagem do número de bacilos (D240) por coxim plantar estão expressos na tabela 2. No grupo controle houve multiplicação do bacilo em 5/5 dos animais ($\geq 10^5$ bacilos/coxim). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o número de bacilos recuperados entre o controle e os animais tratados conforme descrito no gráfico 2; a diferença foi maior entre o controle e o grupo gálio oral mais DFX ($p = 0,0032$). Em relação a contagem de bacilos no grupo tratado com gálio oral mais DFX, houve multiplicação bacilar em 2/5 dos camundongos ($\geq 10^5$ bacilos/coxim). Já no grupo tratado apenas com DFX, a multiplicação bacilar foi observada em 4/4 dos animais ($\geq 10^5$ bacilos/coxim).

Tabela 2 – Número de bacilos recuperados por coxim plantar de camundongos BALB/c inoculados com *Mycobacterium leprae* entre os diferentes grupos de tratamento, no tempo D240 (2ª eutanásia)

	BAAR/60 campos	Pata Ziehl (Baar total)
Grupo controle positivo	2267	9,94E+06
	1137	4,98E+06
	646	2,83E+06
	732	3,21E+06
	703	3,08E+06
Gallium oral + DFX	22	9,64E+04
	53	2,32E+05
	38	1,67E+05
	2	8,77E+03
	1	4,38E+03
DFX	253	1,11E+06
	160	7,01E+05
	49	2,15E+05
	27	1,18E+05

Fonte: Elaborado pelo autor.

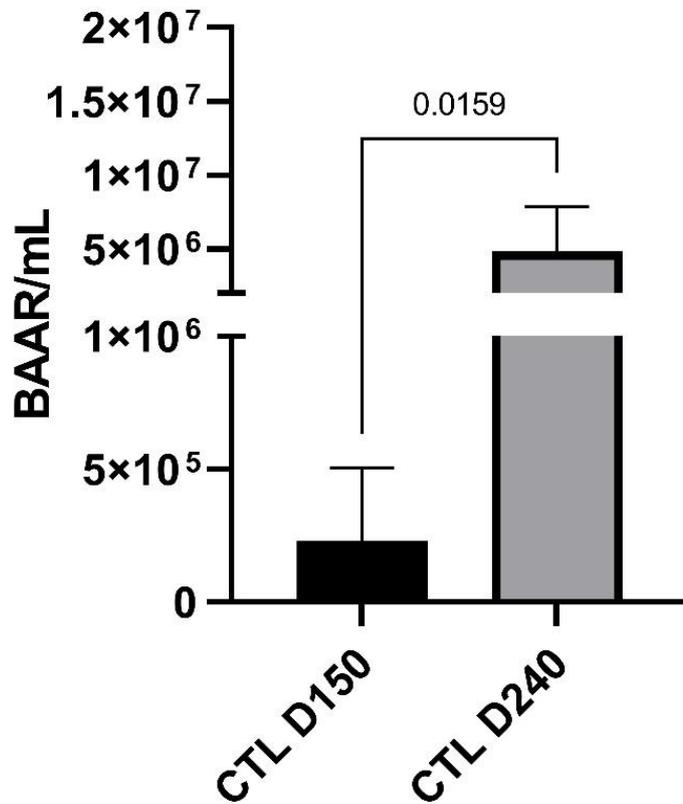
Gráfico 2 – Número de bacilos recuperados por coxim plantar de camundongos BALB/c inoculados com *Mycobacterium leprae*, entre os diferentes grupos de tratamento, no tempo D240 (2ª eutanásia), comparando-se o grupo controle aos grupos tratados



Fonte: Elaborado pelo autor.

No gráfico 3, estão descritos os resultados da multiplicação do bacilo entre os camundongos que não receberam tratamento, em relação aos diferentes tempos de eutanásia, demonstrando que houve a instalação da infecção. No D240 é esperado recuperar mais bacilos do que no D150 ($p < 0,0159$), conforme a curva padrão de multiplicação do bacilo em camundongos imunocompetentes. LOUIS LEVY & BAOHONG JI. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* (2006) 77, 5–24

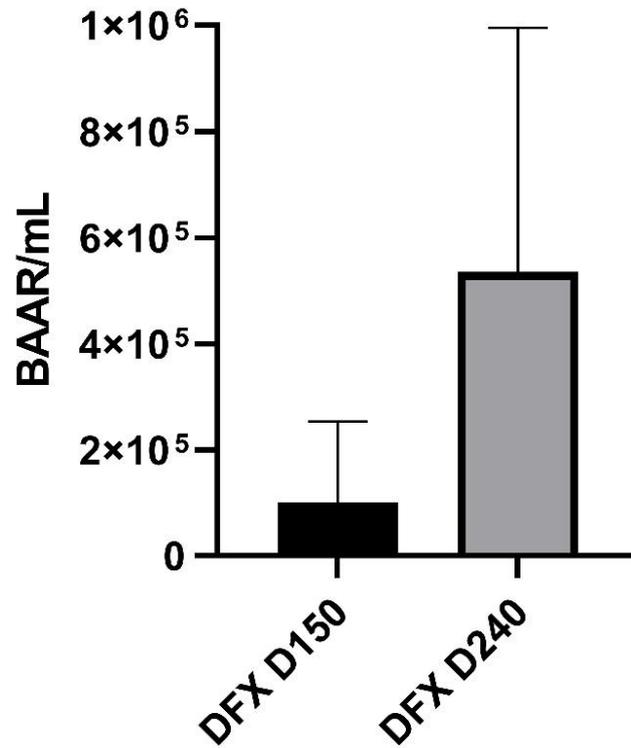
Gráfico 3 – Número de bacilos recuperados por coxim plantar de camundongos BALB/c inoculados com *Mycobacterium leprae* (grupo controle) nos tempos D150 e D240



Fonte: Elaborado pelo autor.

No gráfico 4 estão apresentados os resultados do grupo tratado com DFX nos D150 e D240. Observou-se um aumento no número de bacilos recuperados no D240 em relação ao D150, indicando que o tratamento com o DFX não impediu a multiplicação bacilar.

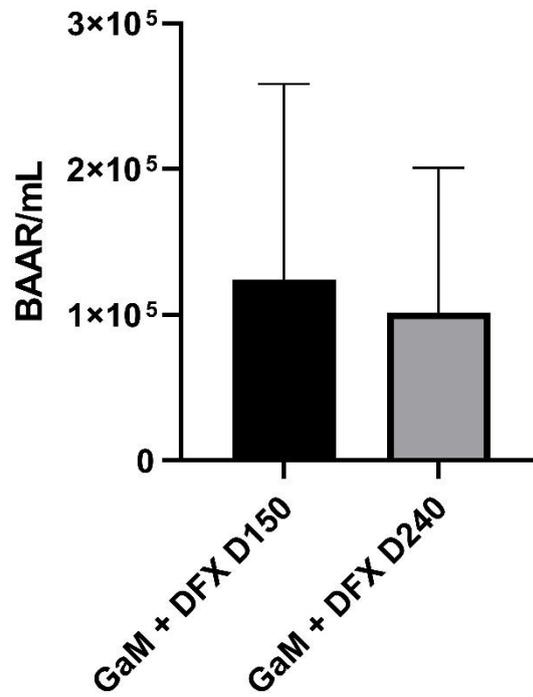
Gráfico 4 – Número de bacilos recuperados por coxim plantar de camundongos BALB/c inoculados com *Mycobacterium leprae* e tratados com mesilato de desferroxamina nos tempos D150 e D240



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos camundongos tratados gálio oral mais DFX, foi observada uma pequena diminuição no número de bacilos recuperados no D240 em relação ao D150, porém esses valores não foram estatisticamente significativos. (Gráfico 5)

Gráfico 5 – Número de bacilos recuperados por coxim plantar de camundongos BALB/c inoculados com *Mycobacterium leprae*, tratados com gálio oral e mesilato de desferroxamina nos tempos D150 e D240



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O ferro (Fe) é um metal fundamental para a manutenção de todos os organismos, apresentando funções celulares básicas e atuando nas vias metabólicas, incluindo as respiratórias do hospedeiro e do microrganismo.^{25,42}

Quando o hospedeiro está infectado com algum patógeno, ocorre uma competição pela disponibilidade do Fe do hospedeiro e então, estratégias de sobrevivência são realizadas como também mecanismos de defesa microbida do hospedeiro são ativadas. O Fe é utilizado pelos microrganismos para diversas funções sejam elas metabólicas, replicação microbiana, como também no transporte de elétrons, glicólise e na síntese de DNA. Portanto, este elemento é um importante fator de crescimento para bactérias patogênicas. As micobactérias são patógenos estritamente intracelulares, assim como a *Chlamydia sp* e *Legionella pneumophila*. Elas dependem do Fe do hospedeiro para sua sobrevivência, então a restrição da absorção do metal pelas células infectadas, impossibilita o crescimento desses patógenos nas células dos hospedeiros.⁴²

As bactérias que são intracelulares precisam se estabelecer dentro de uma célula do hospedeiro para conseguir sobreviver e se reproduzir. A principal célula utilizada por essas bactérias são os macrófagos, pois acabam escapando do sistema imune. Outro fato importante é que os macrófagos são células essenciais para a reciclagem do ferro e dessa forma as bactérias intracelulares conseguem com maior facilidade obter ferro.⁴³

A hanseníase é uma doença causada pela infecção pelo *Mycobacterium leprae*, patógeno intracelular obrigatório, cujos locais preferenciais são os macrófagos e as células de Schwann. A doença tem alto poder incapacitante é endêmica no país, atinge uma parcela mais vulnerável da população, então qualquer esforço para diminuir a replicação do bacilo e conseqüentemente a transmissão é de extrema importância.⁴³

A estratégia do nosso estudo foi restringir o acesso do *M. leprae* ao Fe disponível na célula do camundongo, na tentativa de eliminar mecanismos que o bacilo precisaria para a sua sobrevivência. Para a restrição do Fe os camundongos foram alimentados com ração contendo baixa concentração de Fe (25 ppm). No D150 houve replicação do bacilo nos três grupos (01 controle e 02 tratados) indicando que o tratamento não exerceu efeito bactericida independentemente do tratamento com o

DFX ter sido administrado sozinho ou em combinação com o Gálio. (Gráfico 1). No entanto, no D240, a quantidade do número de bacilos recuperados entre os camundongos tratados (DFX e DFX + galio oral) foi menor quando comparada ao grupo controle ($P < 0,0088$ e $P < 0,0032$ respectivamente). Em estudo feito com camundongos BALB/C infectados por *Leishmania chagasi* e tratados com a DFX, quelante de ferro, mostrou que o DFX foi capaz de provocar uma redução significativa da carga parasitária hepática. Os resultados apresentados neste estudo fornecem evidências de que a deficiência de ferro pode contribuir para o controle da infecção e, portanto, pode estar associada a uma carga parasitária menor. ³³

Em relação ao tratamento, os resultados mostraram que o tipo de tratamento, ou seja, DFX sozinho ou associado ao Gálio oral, não influenciou na quantidade de bacilo recuperado, tanto no D150 quanto no D240. Embora esses resultados tenham sido pouco significativos, não podemos desconsiderar o efeito do DFX na replicação do *M. leprae*. As micobactérias são organismos intracelulares que produzem sideróforos, que são metabólitos secundários específicos para íons de Fe, produzidos em ambientes com baixa disponibilidade desse metal, chamados de micobactinas. No *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), problemas na síntese das micobactinas impedem o crescimento dessa espécie de micobactéria. ⁴⁴

Em estudo realizado por Boelaert⁴⁵, foi demonstrado que o crescimento do *M. tuberculosis* é reduzido pela suspensão da disponibilidade de Fe, tanto pelo uso de algum quelante, como é o caso da deferoxamina; exposição ao endógeno quelantes de ferro apo-transferrina e apo-lactoferrina; quanto incubação com sais de gálio ou transferrina de gálio que ocupam vias de ferro com um metal que não pode ser utilizado pelo *M. tuberculosis*.

Por isso o presente estudo teve como iniciativa o uso de quelantes para deixar o camundongo com doses baixas de ferro em seu organismo e obteve como resultado uma diminuição de bacilos encontrados nos coxins plantares dos camundongos infectados com *M. leprae* e obteve como resultado uma diminuição de bacilos encontrados nos coxins plantares dos camundongos infectados com *M. leprae*.

Como há pouco ferro não quelado (ferro não puro) no hospedeiro, as bactérias invasoras devem obter ferro de proteínas circulantes contendo ferro, como transferrina, lactoferrina ou ferritina (uma proteína de armazenamento de ferro). ⁴⁶

A suplementação de Fe pelo hospedeiro está associada a um risco aumentado de desenvolver processos infecciosos. Em estudos realizados por Boelaert⁴⁵; Paradkar⁴⁷; Souza²⁵ foi observado que é possível o tratamento de infecções causadas por microrganismos intracelulares com o uso de quelantes de ferro.

Estudo *in vitro* realizado por Paradkar⁴⁷ mostrou que o crescimento intracelular de algumas bactérias é regulado pelos níveis do Fe presentes no interior da célula hospedeira, como é o caso da *Chlamydia psittaci*, *trachomatis* e *Legionella pneumophila*. Isso acontece porque os macrófagos que são expressos na ferroportina da superfície celular (único exportador de ferro celular) limitam o crescimento intracelular dessas bactérias. O autor testou o uso de quelantes de Fe oral como a deferriprona e desferasirox em macrófagos de camundongos e observaram um crescimento bacteriano intracelular reduzido, sugerindo que o uso de quelantes podem ser uma via terapêuticos para infecções bacterianas intracelulares.

Estudos clínicos em camundongos com administração de suplementação de ferro para tratar a anemia também mostraram uma ligação direta entre a captação de ferro e o risco aumentado de apresentar infecções e uma piora na evolução da doença, como por exemplo a tuberculose. ^{48,49}

A maioria das espécies de bactérias apresentam mecanismos para obter o ferro e se multiplicarem dentro de um organismo (hospedeiro) para provocar a doença e quando há uma alteração na homeostase do ferro para esses microrganismos pode haver influencia no decorrer da doença. ⁴²

Existem dificuldades de estudar o *M. leprae* pelo fato dele não ser cultivável *in vitro*, em meio de cultura como as outras bactérias como por exemplo o *Mycobacterium tuberculosis* que é uma micobactéria como o *M. leprae*. Então o crescimento bacilar do *M. leprae* é apenas *in vivo*, dificultando os estudos relacionados a esse patógeno, porque dependemos de camundongos para estudos. Além do obstáculo se der apenas *in vivo* que é cultivável o bacilo, ele demora para se multiplicar e isso prejudica o tempo de estudo, por isso poucas pessoas tem interesse em fazer estudos relacionados a hanseníase.

7 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos em nosso estudo, concluímos que:

1. O uso de quelantes de ferro como o DFX (sozinho ou administrado em associação com o maltolato de gálio) não mostrou efeito bactericida sobre o *M. leprae*.
2. O DFX administrado sozinho ou em associação com o maltolato de gálio, contribuiu significativamente para a diminuição da carga bacilar do *M. leprae*.
3. Provavelmente o *M. leprae* utiliza outras vias ou fonte de metabólitos para se manter vivo no interior da célula.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da saúde (BR). Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública [Internet]. Brasília; 2016. [citado em 2022 jun 5]. Disponível em: http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/diretrizes_para_e_limizacao_hanseniase_-_manual_-_3fev16_isbn_nucom_final_2.pdf
2. Ministério da saúde (BR). Guia para controle da Hanseníase [Internet]. Brasília; 2002. [citado em 2022 jun 5]. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniase.pdf
3. Boechat N, Pinheiro LCS. A hanseníase e a sua quimioterapia. Revista Virtual de Química (Doenças Negligenciadas). 2012 Jun;4(3):247-256. doi: 10.5935/1984-6835.20120020.
4. Niitsuma ENA, Bueno I de C, Arantes EO, Carvalho APM, Xavier Junior GF, Fernandes G da R et al. Fatores associados ao adoecimento por hanseníase em contatos: revisão sistemática e metanálise. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2021 Jun;30;24. doi: 10.1590/1980-549720210039.
5. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. J Exp Med. 1960 Sept;112(3):445-454. doi:10.1084/jem.112.3.445.
6. Rees RJW. The impact of experimental human leprosy in the mouse on leprosy research. Int J Lepr other Mycobact Dis [Internet]. 1971 [cited 2022 Jun 6];39(2 pt 2):201-215. Available from: http://ijl.ilsl.br/detalhe_artigo.php?id=MzIzNQ==#.
7. Shepard CC. A kinetic method for the study of activity of drugs against Mycobacterium leprae in mice. Int J Lepr Other Mycobact Dis [Internet]. 1967 Sept [cited 2022 Mai 30];35:429-435. Available from: <http://ila.ilsl.br/pdfs/v35n4pt1a01.pdf>.
8. Barcelos RMFM, Sousa GS de, Almeida MV de, Palacio FGL, Gaíva MAM, Ferreira SMB. Leprosy patients quality of life: a scoping review. Revista da Escola de Enfermagem da USP. 2021;55. doi: 10.1590/1980-220x-reeusp-2020-0357.
9. Ministério da saúde (BR). Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase [Internet]. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010. [citado em 2022 Jun 3]. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniase.pdf.

10. Conitec. Proposta de esquema terapêutico para o tratamento da hanseníase: multidrogaterapia única (MDT-U) [Internet]. Brasília; 2018 out. [citado em 2022 Jun 11]. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/2018/Relatorio_EsquemaMultidrogaterapiaUnicaparaHanseniose.pdf.
11. Ministério da saúde (BR). Hanseníase [Internet]. 2022. [citado em 2022 mai 18]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hanseniose-1>.
12. World Health Organization = Organisation mondiale de la Santé. Weekly Epidemiological Record, 2021, vol. 96, 36 [full issue]. Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire [Internet]. 2021 Sep10;96(36):421-444. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345048>.
13. World Health Organization. Study Group on Chemotherapy of leprosy for control programmes [Internet]. Geneva: WHO-Technical Report Series, 675. 1982. [citado em 2022 Jun 10]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38984/WHO_TRS_675.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
14. Ministério da Saúde (BR). Relatório do Grupo Técnico: Instruções Normativas, Regulamentação Referente a Portaria Ministerial n. 862/GM de 07/08/92. (mimeo) [Internet]. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/Centro Nacional de Epidemiologia/Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária; 1992. [citado em 2022 Jun 18]. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_hanseniose.pdf.
15. Duo Filho VB et al. *Mycobacterium leprae*: Aspectos da resistência aos fármacos na poliquimioterapia. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR [Internet]. 2021. [citado em 2022 Jun 15];25(1):79-85. Disponível em: <https://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/7911/4075>.
16. Williams DL, Gillis TP. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. Lepr Ver [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2022 Ago 26];75(2):118–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282962>.
17. Nascimento DN. Clofazimine: what can tuberculosis teach for leprosy? Hansen Int [Internet]. 2020;45:1-4. doi: doi.org/10.47878/hi.2020.v45.37258.
18. World Health Organization. A guide for surveillance of antimicrobial resistance in leprosy. Regional Office for South-East Asia [Internet]. 2017. [cited 2022 Mai 25]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290225492>.
19. Saito H, Tomioka H, Nagashima K. In vitro and in vivo activities of ofloxacin against *Mycobacterium leprae* infection induced in mice. Int J Lepr Other Mycobact Dis. Official Organ of the International Leprosy Association [Internet]. 1986 Dec 1 [cited 2022 Mai 18];54(4):560–562. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3546546>.

20. Diniz LM, Catabriga MD de S, Souza Filho JB de. Avaliação de hansenianos tratados com esquema alternativo dose única ROM (rifampicina, ofloxacina e minociclina), após sete a nove anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010 Dec;43:695–9. doi: 10.1590/S0037-86822010000600019.
21. Lemos RF. Avaliação dos pacientes com hanseníase multibacilar submetidos ao esquema terapêutico substitutivo [Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas)]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas; 2013.
22. Véras GCB, Lima Júnior JF, Cândido EL, Maia ER. Risk factors for physical disability due to leprosy: a case-control study. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2021 Sep;29(3):411–423. doi: 10.1590/1414-462X202129030182.
23. Arantes JM et al. *Trypanosoma cruzi*: Treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. *Experimental parasitology*. 2007 Sep;117:43-50. doi: doi:10.1016/j.exppara.2007.03.006.
24. Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Med Res Rev*. 2002;22(1):26-64. doi:10.1002/med.1027.
25. Souza VNB de, Malaspina TS de S, Campanelli AP, Ghidella C, Ura S, Dalpino D, et al. Increased hepcidin expression in multibacillary leprosy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012 Dec 1;107:183–189. doi: 10.1590/S0074-02762012000900026.
26. Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol*. 1999;181(20):6223-6229. doi:10.1128/JB.181.20.6223-6229.1999.
27. Ding C, Festa RA, Sun TS, Wang ZY. Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens. *Mol Microbiol*. 2014;93(1):10-23. doi:10.1111/mmi.12653.
28. Lee J, Kim YB, Kwon M. Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*. *J Microbiol*. 2007;45(2):179-184.
29. Deneer HG, Potter AA. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect Immun*. 1989;57(3):798-804. doi:10.1128/iai.57.3.798-804.1989.
30. Stuchi LP. Identificação e caracterização de genes do sistema de captação de ferro regulados pelo repressor fur em *Klebsiella pneumoniae* [Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde]. Universidade de São Francisco, Bragança Paulista; 2012.

31. Rodriguez GM. Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 2006;14(7):320-327. doi:10.1016/j.tim.2006.05.006.
32. Rocha VL. Avaliação da expressão de um suposto gene responsável pela síntese de sideróforo em *Mycobacterium massiliense*, em diferentes condições de disponibilidade de ferro [Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública)]. Universidade Federal de Goiás; 2014.
33. Malafaia G, Marcon L de N, Pereira L de F, Pedrosa ML, Rezende SA. Leishmania chagasi: Effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. *Experimental Parasitology.* 2011 Mar 1;127(3):719–723. doi: doi.org/10.1016/j.exppara.2010.11.010doi.org/10.1016/j.exppara.2010.11.010.
34. Zhou T, Winkelmann G, Dai ZY, Hider RC. Design of clinically useful macromolecular iron chelators. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(7):893-903. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01291.x
35. Gokarn K, Pal RB. Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Infect Drug Resist.* 2018;11:61-75. doi: 10.2147/IDR.S148602.
36. Novartis [Internet]. Desferal-Mesilato de Desferroxamina: pó liofilizado; 2018. [citado 2022 Jul 26]. Disponível em: <https://portal.novartis.com.br/medicamentos/wp-content/uploads/2021/10/Bula-DEFERAL-Po-Liofilizado-para-Solucao-Injetavel-Paciente.pdf>.
37. Lalonde RG, Holbein BE. Papel do ferro na infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos. *Journal of clinical investigation.* 1984;23:470–476.
38. Loo VG, Lalonde RG. Papel do ferro no crescimento intracelular do *Trypanosoma cruzi*. *Infecção e Imunidade.* 1984;45:726-730.
39. Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol Ver* [Internet]. 1998 [cited 2022 Jun 20];50(4):665-682. Available from: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/50/4/665.long>.
40. Trombone AP, Pedrini SC, Diório SM, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp.* 2014;(85):50620. doi:10.3791/50620.
41. World Health Organization. Laboratory techniques for leprosy [Internet]. Unidade de hanseníase. 1986. [cited 2022 Jun 21]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61778?locale-attribute=pt&>.
42. Schaible UE, Kaufmann SH. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(12):946-953. doi:10.1038/nrmicro1046.

43. Andrade PR. *Mycobacterium leprae* e o efeito do TNF na ativação de células de Schwann humanas [Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)]. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 2010.
44. Ramos ABA. Metabolismo do Ferro, Infecção e Imunidade [Dissertação de Mestrado]. Universidade Fernando Pessoa, Porto; 2017.
45. Boelaert JRB, Vandecasteele SJ, Appelberg R, Gordeuk VR. The Effect of the Host's Iron Status on Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(12):1745–1753. doi: <https://doi.org/10.1086/518040>.
46. Hall RM, Ratledge C. Aquisição de ferro mediada por exoquelina pelo bacilo da hanseníase. *Mycobacterium leprae*. 1987;133(1):193-199. doi:10.1099/00221287-133-1-193.
47. Paradkar PN, De Domenico I, Durchfort N, Zohn I, Kaplan J, Ward DM. Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. *Blood*. 2008;112(3):866-874. doi:10.1182/blood-2007-12-126854.
48. Lounis N, Truffot-Pernot C, Grosset J, Gordeuk VR, Boelaert JR. Iron and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Virol*. 2001;20(3):123-126. doi:10.1016/s1386-6532(00)00136-0.
49. Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SH. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol*. 1999;71:267-377. doi:10.1016/s0065-2776(08)60405-8.