

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Bruna Letícia Martins

**Avaliação do efeito da suplementação de ferro e
vitamina D na infecção experimental murina *pelo*
*Mycobacterium leprae***

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carla Pereira Latini

**Botucatu
(2023)**

Bruna Letícia Martins

Avaliação do efeito da suplementação do ferro e
vitamina D na infecção experimental murina pelo
Mycobacterium leprae.

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carla Pereira Latini

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Martins, Bruna Letícia.

Avaliação do efeito da suplementação de ferro e vitamina D na infecção experimental murina pelo *Mycobacterium leprae* / Bruna Letícia Martins. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientador: Ana Carla Pereira Latini
Capes: 40101096

1. Ferro. 2. Hanseníase. 3. *Mycobacterium leprae*.
4. Vitamina D.

Palavras-chave: Ferro; Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Vitamina D.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNA LETÍCIA MARTINS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 29 dias do mês de setembro do ano de 2023, às 09:00 horas, no(a) Sala 2 de Reuniões do Prédio da Administração da FMB/Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de BRUNA LETÍCIA MARTINS, intitulada **Avaliação do efeito da suplementação de ferro e vitamina D na infecção experimental murina pelo *Mycobacterium leprae***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ANA CARLA PEREIRA LATINI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru/SP, Prof. Dr. JAMES VENTURINI (Participação Virtual) do(a) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / Faculdade de Medicina (Famed), Profa. Dra. FABIANA COVOLO DE SOUZA SANTANA (Participação Presencial) do(a) Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) / Bauru/SP, Profa. Dra. LUCIANA RAQUEL VINCENZI FACHIN (Participação Presencial) do(a) Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru/SP, Professora Doutora ADRIANA SIERRA ASSENCIO ALMEIDA BARBOSA (Participação Presencial) do(a) Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) / Bauru/SP. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. ANA CARLA PEREIRA LATINI

Aos meus pais, que foram a fonte da minha motivação, a base da minha perseverança e a personificação do amor. Esta tese é um testemunho da crença inabalável deles em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar e abençoar minha trajetória.

À minha orientadora, Dr^a Ana Carla Pereira Latini, pela confiança, apoio e dedicação dirigidas a mim ao longo desses anos. Obrigada por me “resgatar” e por me ensinar tanto. Carinho eterno por você!

Aos meus amados pais, que sempre incentivaram meu crescimento profissional e a querer sempre mais. A minha irmã, Fernanda, por estar sempre presente, ser minha confidente e válvula de escape. Espero ser sempre motivo de orgulho para vocês!

Ao Raoni, meu marido, por todo cuidado, zelo e incentivo desde o começo dessa jornada, especialmente nos momentos mais difíceis.

Ao Jonatas Perico, companheiro ímpar de laboratório, com quem compartilhei várias risadas, contas matemáticas, “surto” e cafés. Essa trajetória não teria sido a mesma sem você ao meu lado. Deixo registrado (apenas aqui) meu carinho por você.

À Daniele Bertoluci, pela amizade, companheirismo e por me acolher desde minha primeira semana no Instituto Lauro de Souza Lima. Obrigada pelos ensinamentos e conselhos.

À Graziela Gonçalves e Mariane Casalenovo pela amizade, companheirismo e por dividirem os momentos de descontração e alegrias que ficarão para sempre em meu coração.

À Profa. Dra. Vânia Nieto Brito de Souza pela colaboração inestimável e enriquecedora ao trabalho.

À Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira pela colaboração na técnica de Imuno-histoquímica. E à bióloga Adriana Sierra pelo importante auxílio na execução da técnica.

À equipe técnica de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima pela confecção dos blocos e cortes histológicos utilizados neste trabalho.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima por toda a infraestrutura oferecida que me permitiu o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

“When you lose small mind you free your life.”
(Aerials - System of a Down)

RESUMO

A interferência de fatores nutricionais sobre o sistema imunológico apresenta grande relevância para o controle ou progressão de doenças infecciosas. Sabe-se que o ferro é essencial para a sobrevivência e multiplicação de patógenos e que a vitamina D possui papéis que vão além de sua função clássica e tem sido apontada como um potente estimulador de mecanismos associados com a eliminação de patógenos. Na hanseníase existem muitos mecanismos fisiopatológicos parcialmente compreendidos, como o impacto de nutrientes sobre a progressão da doença. Para avaliar a influência do status do ferro e vitamina D sobre a infecção pelo *M. leprae* em camundongos BALB/c, animais infectados receberam dietas deficientes ou suplementadas de ferro ou vitamina D e ração padrão. Após 100 dias de infecção, os coxins plantares foram processados e analisados quanto ao índice baciloscópico, expressão proteica e gênica de mediadores do metabolismo do ferro (hepcidina/*HAMP1*, ferroportina/*SLC40A1* e lipocalina-2/*LCN2*) e da vitamina D (catelicidina/*CAMP*, beclina-1/*BECN1* e interferon- γ /*IFNG*). Os efeitos da suplementação e restrição dietética de ferro e vitamina D também foram avaliados *in vitro* pela quantificação da secreção de citocinas pelas células peritoneais totais e esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c não infectados que receberam as diferentes dietas aqui avaliadas. A suplementação de ferro no grupo infectado não aumentou os níveis séricos desse elemento como nos animais não infectados que receberam a mesma dieta. Os resultados de baciloscopia mostraram menor multiplicação do *M. leprae* nos animais que receberam a dieta restritiva de ferro. As análises moleculares revelaram que a deficiência de vitamina D favoreceu significativamente as expressões dos genes *SLC40A1*, *CAMP* e *BECN1*, enquanto que *in situ* apenas a expressão da catelicidina foi mais induzida nas condições de restrição de vitamina D e de suplementação de ferro. Foram observadas ainda uma correlação negativa entre a multiplicação bacilar e a expressão do gene *SLC40A1* na condição nutricional padrão, bem como uma correlação positiva entre a expressão proteica de catelicidina e a multiplicação bacilar sob condição de suplementação de ferro. Os resultados *in vitro* mostram que nas células peritoneais a suplementação de vitamina D e a restrição de ferro diminuíram a produção de IL-6 e TNF em resposta ao *M. leprae*, enquanto os esplenócitos apresentaram redução na produção de TNF

nessas mesmas condições. Níveis mais baixos de IFN- γ foram observados tanto nos esplenócitos suplementados quanto deficientes de ferro. Além disso, suplementação com ferro também diminuiu as produções das interleucinas 6 e 10. Nossos resultados apontam para uma interferência do status desses nutrientes na interação entre o hospedeiro e o *M. leprae*, com potencial para interferir na progressão da hanseníase, doença que está significativamente associada a condições sociais desfavoráveis.

Palavras-chave: Hanseníase; Vitamina D; Ferro; *Mycobacterium leprae*.

ABSTRACT

The interference of nutritional factors on the immune system is highly relevant to the control or progression of infectious diseases. It is known that iron is essential for the survival and multiplication of pathogens, and that vitamin D has roles that go beyond its classical function and has been identified as a potent stimulator of mechanisms associated with pathogen elimination. In leprosy, there are many partially understood physiopathological mechanisms, such as the impact of nutrients on disease progression. To assess the influence of iron and vitamin D status on *M. leprae* infection in BALB/c mice, infected animals were given iron or vitamin D-deficient or supplemented diets along with standard food. After 100 days of infection, the footpad were processed and analyzed for the bacilloscopic index, protein expression, and gene expression of iron metabolism mediators (hepcidin/*HAMP1*, ferroportin/*SLC40A1* and lipocalin-2/*LCN2*) and vitamin D (cathelicidin/*CAMP*, beclin-1/*BECN1* and interferon- γ /*IFNG*). The effects of iron and vitamin D dietary supplementation and restriction were also evaluated *in vitro* by quantifying cytokine secretion by total peritoneal cells and splenocytes obtained from non-infected BALB/c mice receiving the different diets assessed here. Iron supplementation in the infected group did not increase serum levels of this element as seen in non-infected animals receiving the same diet. Bacilloscopy results showed reduced *M. leprae* multiplication in animals on the iron-restricted diet. Molecular analyses revealed that vitamin D deficiency significantly favored the expressions of the *SLC40A1*, *CAMP* and *BECN1* genes, while *in situ* only cathelicidin expression was more induced under conditions of vitamin D restriction and iron supplementation. A negative correlation was also observed between bacillary multiplication and *SLC40A1* gene expression under standard nutritional conditions, as well as a positive correlation between cathelicidin protein expression and bacillary multiplication under iron supplementation conditions. *In vitro* results showed that in peritoneal cells, vitamin D supplementation and iron restriction reduced IL-6 and TNF production in response to *M. leprae*, while splenocytes showed reduced TNF production under these same conditions. Lower levels of IFN- γ were observed in both iron-supplemented and iron-deficient splenocytes. Furthermore, iron supplementation also reduced the production of interleukins 6 and 10. Our results suggest an interference of the status of these nutrients in the interaction between the host and *M.*

leprae, with the potential to interfere with the progression of leprosy, a disease significantly associated with unfavorable social conditions.

Keywords: Leprosy; Vitamin D; Iron; *Mycobacterium leprae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da absorção de ferro pelos enterócitos e seu transporte até a corrente sanguínea	16
Figura 2 - Mecanismo de ação da hepcidina no metabolismo do ferro	17
Figura 3 - Representação da regulação transcricional da vitamina D	22
Figura 4 - Fluxograma de execução do estudo	28
Figura 5 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos com diferentes condições dietéticas de ferro e estimulados <i>in vitro</i> com <i>M. leprae</i>	39
Figura 6 - Proliferação de esplenócitos obtidos de camundongos com dieta modificada de ferro ou padrão	40
Figura 7 - Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com diferentes condições dietéticas de ferro e estimulados <i>in vitro</i> com antígenos sonificado de <i>M. leprae</i>	41
Figura 8 - Níveis séricos de ferro dos camundongos infectados e não infectados após dieta padrão ou com modificação do teor de ferro.	43
Figura 9 - Quantificação de <i>M. leprae</i> por baciloscopia após tratamento com dieta padrão ou modificada de ferro.....	44
Figura 10 - Expressão gênica relativa em coxim plantar de camundongos com dietas modificadas de ferro.....	45
Figura 11 - Imunodeteção de mediadores do ferro e imunológicos em camundongos infectados por <i>M. leprae</i> e tratados com dietas modificadas de ferro	46
Figura 12 - Fotomicrografia da expressão proteica de catelicidina em camundongos infectados com <i>M. leprae</i> com diferentes condições dietéticas de ferro	47
Figura 13 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos com diferentes condições dietéticas de vitamina D e estimulados <i>in vitro</i> com <i>M. leprae</i>	48
Figura 14 - Proliferação de esplenócitos obtidos de camundongos com dieta modificada de vitamina D ou padrão	49
Figura 15 - Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com diferentes condições dietéticas de vitamina D e estimulados <i>in vitro</i> com antígenos sonificado de <i>M. leprae</i>	50
Figura 16 - Quantificação de <i>M. leprae</i> por baciloscopia após tratamento com dieta padrão ou modificada de vitamina D	52

Figura 17 - Expressão gênica relativa em coxim plantar de camundongos com dietas modificadas de vitamina D	53
Figura 18 - Imunodeteção de mediadores do ferro e imunológicos em camundongos infectados por <i>M. leprae</i> e tratados com dietas modificadas com vitamina D	55
Figura 19 - Fotomicrografia da expressão proteica de catelicidina em camundongos infectados com <i>M. leprae</i> com diferentes condições dietéticas de vitamina D	56
Figura 20 - Correlação entre os resultados de multiplicação de <i>M. leprae</i> e a expressão gênica da <i>SLC40A1</i>	57
Figura 21 - Correlação entre os resultados de multiplicação de <i>M. leprae</i> e a expressão proteica <i>in situ</i> de catelicidina.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	9
1.1 Hanseníase	9
1.1.1 <i>Mycobacterium leprae</i>	11
1.1.2 Imunopatogênese da hanseníase	12
1.2 Imunidade nutricional	14
1.2.1 Metabolismo do ferro	15
1.2.1.1 Papel do ferro e sua modulação nas infecções	17
1.2.2 Metabolismo da vitamina D e o sistema imunológico	20
1.2.2.1 Influência da Vitamina D nas infecções	22
2 OBJETIVO GERAL	26
2.1 Objetivos específicos	26
3 MÉTODOS	28
3.1 Desenho do estudo	28
3.2 Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i> e inoculação dos camundongos	29
3.3 Dosagens séricas de ferro e vitamina D	29
3.4 Avaliação de mediadores inflamatórios em cultura de células peritoneais e esplenócitos	29
3.4.1 Cultivo de células peritoneais <i>in vitro</i>	29
3.4.1.1 Purificação do <i>Mycobacterium leprae</i> para infecção das células peritoneais	30
3.4.2 Cultivo de esplenócitos <i>in vitro</i>	30
3.4.2.1 Avaliação da proliferação celular	31
3.4.3 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	31
3.5 Avaliação dos mediadores do ferro e vitamina D na infecção pelo <i>Mycobacterium leprae in vivo</i>	32
3.5.1 Análise da multiplicação do <i>Mycobacterium leprae</i> em modelo murino	32
3.5.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	32
3.5.3 Expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real	33

3.5.4 Imuno-histoquímica	34
3.5.4.1 Análise de imagens digitalizadas.....	35
3.6 Análise dos resultados.....	35
4 RESULTADOS	38
4.1 Avaliação dos efeitos das dietas modificadas em teor de ferro	38
4.1.1 Avaliação <i>in vitro</i>	38
4.1.1.1 Cultura de células peritoneais totais.....	38
4.1.1.1.1 Produção de IL-10, IL-6 e TNF	38
4.1.1.2 Cultura de esplenócitos	40
4.1.1.2.1 Ensaio de proliferação celular	40
4.1.1.2.2 Produção de citocinas	40
4.1.2 Avaliação <i>in vivo</i>	43
4.1.2.1 Níveis séricos de ferro.....	43
4.1.2.2 Multiplicação de <i>M. leprae</i> em modelo murino	43
4.1.2.3 Expressão gênica	44
4.1.2.4 Expressão <i>in situ</i> por imuno-histoquímica	45
4.2 Avaliação dos efeitos das dietas modificadas em teor de vitamina D	47
4.2.1 Avaliação <i>in vitro</i>	47
4.2.1.1 Cultura de macrófagos peritoneais.....	47
4.2.1.1.1 Produção de IL-10, IL-6 e TNF	47
4.2.2 Cultura de esplenócitos	49
4.2.2.1.1 Ensaio de proliferação celular	49
4.2.2.1.2 Produção de citocinas	50
4.2.3 Avaliação <i>in vivo</i>	51
4.2.3.1 Níveis séricos de vitamina D	51
4.2.3.2 Multiplicação de <i>M. leprae</i> em modelo murino	51
4.2.3.3 Expressão gênica	52

4.2.3.4 Expressão <i>in situ</i> por imuno-histoquímica	54
4.3 Correlações <i>in vivo</i>	56
4.3.1 Correlação entre multiplicação de <i>M. leprae</i> e expressão gênica	56
4.3.2 Correlação entre multiplicação de <i>M. leprae</i> e expressão proteica	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Hanseníase

A hanseníase é uma doença neural e dermatológica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ou *Mycobacterium lepromatosis*, bacilos intracelulares obrigatórios e álcool-ácido resistentes (1). Caracteristicamente, a hanseníase é uma doença infecciosa que apresenta um espectro de fenótipos clínicos determinado, principalmente, pela resposta imunológica do hospedeiro que direciona a progressão da doença bem como suas características histopatológicas, clínicas e a carga bacilar (2).

A classificação da hanseníase foi amplamente debatida e redefinida ao longo dos anos e, atualmente, dois esquemas classificatórios são utilizados para definição de diagnóstico e tratamento da doença (3). O primeiro, é a classificação proposta por Ridley e Jopling (4) baseada em critérios imunopatológicos que categoriza a doença em dois polos, o tuberculóide (TT) e o virchowiano (VV), e em três formas intermediárias, dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV). O segundo sistema de classificação é o definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que, baseado no número de lesões cutâneas e no índice baciloscópico, classifica os pacientes em paucibacilares (PB), que apresentam até 5 lesões e, quando disponível, baciloscopia negativa, ou multibacilares (MB), que apresentam mais de 5 lesões ou baciloscopia positiva (5,6).

O período de incubação do *M. leprae* é excepcionalmente longo, podendo levar mais de 10 anos para se manifestar (7). O estágio inicial da infecção é chamado de hanseníase indeterminada (HI), onde a resposta imune mediada por células não está totalmente definida e a doença pode progredir em direção a qualquer um dos polos do espectro ou regredir (2,8).

O polo TT é a forma menos grave da doença, pois os pacientes desse polo arquitetam uma resposta imune celular robusta e eficaz contra o *M. leprae*. As principais manifestações clínicas são a presença de uma ou poucas lesões anestésicas, hipopigmentadas, e de borda elevada (3).

No polo VV a hanseníase evolui de forma progressiva e sistêmica em razão da resposta imune celular deficiente e ausente do paciente que permite a multiplicação exacerbada do bacilo. Consequentemente, a doença se manifesta com inúmeras lesões disseminadas que, quando não tratadas, formam pápulas ou nódulos bilaterais. Há também maior comprometimento neural resultando na hipertrofia de nervos

periféricos e comprometimento sensitivo e/ou motor. Outra característica clínica marcante dos pacientes VV é a face leonina (lesões nodulares) e madarose (perda de cílios ou sobrancelha) (3,8).

As formas dimorfas, DT, DD e DV, correspondem à estados instáveis da hanseníase e, de acordo com a resposta imunológica ou na ausência de tratamento, os pacientes dimorfos tendem ao polo VV. Como manifestações clínicas apresentam placas eritematosas circulares ou anulares, com bordas externas difusas e bem definidas internamente (2,8).

As reações hansênicas são episódios de grande destaque na evolução da hanseníase e tratam-se de respostas imunológicas severas no decurso da doença sendo a principal causa das complicações e incapacidades permanentes. As reações hansênicas afetam principalmente nervos periféricos e são frequentes, especialmente, em pacientes dimorfos (2,9). Existem dois tipos de reações hansênicas, a reação tipo 1, ou reação reversa (RR), e a reação tipo 2, ou eritema nodoso hansênico (ENH). A RR acomete pacientes com menor carga bacilar e é decorrente do aumento da imunidade celular e hipersensibilidade aos antígenos do *M. leprae* que resulta em inflamação e piora das lesões preexistentes (3,9). O ENH acomete pacientes com maior carga bacilar e se manifesta de forma sistêmica por meio da inflamação aguda de nervos e da pele, além de ser caracterizado por infiltrados inflamatórios de células polimorfonucleares e pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (9).

A transmissão da hanseníase ocorre por meio das vias aéreas superiores pela inalação do *M. leprae*. A maior parte da população é naturalmente resistente ao *M. leprae* não desenvolvendo a doença. Em suma, o bacilo possui baixa transmissibilidade e por isso a exposição prolongada, o contato próximo com pacientes MBs não tratados e a suscetibilidade do indivíduo são fatores chaves dentro da cadeia de transmissão da doença (10). Ressalta-se que determinantes socioeconômicos e aspectos culturais e ambientais, são fortemente associados à disseminação da hanseníase (9).

A poliquimioterapia (PQT), instituída pela OMS em 1982, é o atual esquema de tratamento prescrito para hanseníase e associa dapsona, rifampicina e clofazimina. Esse esquema multimedamentoso conjuga drogas com efeito bacteriostático e bactericida que atuam sob múltiplos alvos minimizando os riscos de resistência do bacilo (11). Casos classificados como MB devem ser tratados por 12 meses e casos

PB devem ser tratados por 6 meses. Ressalta-se uma recente mudança pela OMS, que a partir de 2018 passou a recomendar a associação dos três medicamentos (dapsona, rifampicina e clofazimina) para o tratamento de todos os casos de hanseníase independente de sua classificação (12). No Brasil, esse esquema terapêutico foi aderido a partir de 2021

Com o advento da PQT na década de 80, a prevalência da hanseníase diminuiu drasticamente não sendo mais considerada um problema de saúde pública mundial pela OMS em 2005 (prevalência inferior a 1 caso por 10.000 habitantes) (13). No entanto, a hanseníase ainda é endêmica e um importante problema de saúde pública em alguns países tropicais em desenvolvimento (1). Em 2021 a OMS contabilizou 140.594 novos casos de hanseníase no mundo, desses 18.318 novos casos foram detectados no Brasil, que juntamente com a Índia e Indonésia possuem o maior número de novos casos detectados no mundo (14).

A hanseníase é a doença de pele mais antiga do mundo, estigmatizada devido às suas sequelas incapacitantes e, principalmente, negligenciada. Apesar de extensivamente estudada, muitos aspectos acerca da doença necessitam ser melhor elucidados. A incapacidade do cultivo do *M. leprae* em meios artificiais limita e torna desafiador o conhecimento aprofundado de seus mecanismos imunopatogênicos e fisiológicos (9,15).

1.1.1 *Mycobacterium leprae*

Apesar dos relatos históricos de mais de 3.000 anos sobre a hanseníase, o *M. leprae* foi identificado somente em 1873 pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen sendo associado como agente causador da hanseníase. Han et al. (16) descreveram em 2008 um segundo agente causador da hanseníase, o *M. lepromatosis* isolado de pacientes com a hanseníase virchowiana difusa, forma endêmica única e mais prevalente no México (17).

O bacilo pertence a classe *Schizomycetes*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium* (10). O *M. leprae* é um bacilo reto, ou ligeiramente curvo, que mede cerca de 1 a 8 µm de comprimento, 0,2 a 0,5 µm de diâmetro, é imóvel, gram-positivo e álcool-ácido resistente (BAAR). Na microscopia pode ser observado individualmente ou de forma agrupada (globias). É um patógeno intracelular obrigatório que possui forte tropismo pelas células de Schwann em nervos periféricos, sendo fagocitado pelos macrófagos na pele. O seu tempo de multiplicação

é excepcionalmente longo, em média, de 12 a 14 dias e sua temperatura ideal para replicação varia entre 33 a 35°C, justificando a maior incidência das manifestações clínicas da hanseníase nas áreas superficiais e frias do corpo (10,18).

A sobrevivência e a replicação do *M. leprae* exigem condições específicas e altamente dependentes do metabolismo da célula hospedeira, peculiaridade que está fortemente vinculada ao seu genoma que devido a uma evolução redutiva é rico em pseudogenes e genes não codificantes (19). O *M. leprae* nunca foi cultivado em meios artificiais e, atualmente, sua manutenção é realizada em modelo animal com camundongos imunocompetentes ou imunossuprimidos (20). O modelo desenvolvido por Shepard na década de 60 tem permitido grandes avanços no estudo da doença (21). A partir da inoculação em coxim plantar de camundongos, que induz formação de um granuloma local, este modelo viabiliza a avaliação de resistência a drogas, além de servir como modelo experimental e fornecer microrganismos viáveis para o estudo da doença (21).

A parede celular do *M. leprae* exerce um papel chave na patogênese da doença, pois medeia a entrada deste nas células hospedeiras bem como participa de mecanismos de escape do sistema imune. A parede celular é formada por um complexo de peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos, com destaque para o glicolipídeo-fenólico-I (PGL- I) componente antigênico específico do *M. leprae* (22,23). Acredita-se que o PGL-I está fortemente associado nas interações hospedeiro-patógeno, e desempenhe um papel imunossupressor (20).

O metabolismo do *M. leprae* é limitado, em razão da perda de vários genes funcionais, diante disso, uma grande estratégia de sobrevivência do bacilo da hanseníase é a modulação do metabolismo da célula hospedeira. O *M. leprae* induz mudanças no microambiente tecidual que inibem as funções efetoras da resposta imune celular criando condições a favor da progressão da infecção. Um exemplo bem descrito é a modulação do metabolismo lipídico pelo *M. leprae* que induz o acúmulo de gotículas lipídicas na célula hospedeira, o que confere aspecto espumoso e favorece o escape do patógeno da resposta imune, além da utilização dos lipídios como fonte de carbono (20,24).

1.1.2 Imunopatogênese da hanseníase

A primeira linha de defesa do organismo contra o *M. leprae* é a imunidade inata, que reconhece o patógeno através da interação dos receptores de reconhecimento

de padrões (PRRs) das células fagocíticas com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esse reconhecimento induz a transdução de sinais específicos que resultam na liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios, recrutamento de células natural killer (NK), linfócitos T citotóxicos e leucócitos polimorfonucleares para eliminação do patógeno (20,25).

Uma resposta imune inata efetiva associada a baixa virulência do *M. leprae* pode ser suficiente para não instalação da hanseníase (10). Em caso de não eliminação do patógeno, as células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos (APCs), migram para os linfonodos e estimulam as células T virgens a se diferenciarem iniciando a resposta imune adquirida (20).

Indiscutivelmente o conceito espectral da hanseníase advém da capacidade do hospedeiro em arquitetar diferentes graus de resposta imunológica frente ao *M. leprae*. As citocinas e quimiocinas liberadas no início da infecção determinam a diferenciação e proliferação dos linfócitos T-helper. Observa-se uma prevalência de linfócitos T-helper 1 (Th1) no polo TT, enquanto que no polo VV há predomínio de linfócitos do perfil T-helper 2 (Th2) (10,25,26).

A resposta imune do tipo Th1, predominante no polo TT, caracteriza-se pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF) que induzem a imunidade mediada por células e ativação de macrófagos microbicidas (M1). Os macrófagos M1 exibem uma alta atividade antimicrobiana, inflamatória e de apresentação de antígenos. Assim, a resposta Th1 reduz a proliferação do *M. leprae* e restringe a doença(1,10,20,25).

Por outro lado, a resposta imune do tipo Th2, predominante no polo VV, é mediada pela secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que induzem a resposta imune humoral com consequente proliferação de linfócitos B, produção de anticorpos contra PGL-I. Além disso, observa-se a polarização de macrófagos M2, que possuem ações anti-inflamatórias e de reparo tecidual M2 com produção de TGF- β , IL-10 e fator de crescimento de fibroblastos (FGF)- β . O desfecho dessa resposta imunológica é a forma disseminada da doença com alta carga bacilar (1,10,20,25).

Apesar do paradigma Th1/Th2 ter grande destaque na imunopatogênese da hanseníase, outros subconjuntos de células podem estar juntamente envolvidos em sua patogênese, e neste contexto destacam-se as células T reguladoras (Tregs) e Th17 (1). As células Tregs possuem funções imunossupressoras intermediadas pela secreção de citocinas e moléculas inibitórias sendo associadas à não responsividade

das células T e a sobrevivência do *M. leprae*, por isso são mais frequentes em pacientes VV. Já as células Th17, secretoras de IL-17 e IL-22, são associadas a uma função protetora contra o *M. leprae* por estarem envolvidas com a inflamação e recrutamento de outras células, exibindo maior atuação no polo TT em comparação ao polo VV e nas reações hansênicas (1,20).

1.2 Imunidade nutricional

A chamada imunidade nutricional baseia-se em mecanismos que limitam a biodisponibilidade de nutrientes ao patógeno. Essencialmente, a restrição de elementos envolvidos em processos metabólicos do patógeno pode impactar na sua multiplicação e, conseqüentemente, na progressão de doenças infecciosas (27,28). Em vista disso, a imunidade nutricional torna-se um mecanismo adjacente importante de ser compreendido (29) .

A restrição ao acesso de metais de transição, como ferro (Fe), zinco e manganês, pelo hospedeiro frente ao patógeno é a estratégia mais investigada dentro da imunidade nutricional (30,31). Os metais têm posição de destaque devido ao seu envolvimento em inúmeros processos que englobam desde o metabolismo bacteriano até a regulação de fatores de virulência (32). Corbin et al. (33) observaram a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* em abscessos teciduais de camundongos relacionada com a quelação de zinco e manganês, além de maior proliferação estafilocócica em abscessos enriquecidos com estes metais.

Por outro lado, para o hospedeiro os metais auxiliam nas funções bactericidas de células do sistema imunológico, como os macrófagos, além de atuarem como cofatores para processos biológicos. Assim, é fundamental destacar que a nutrição exerce uma influência significativa sobre o sistema imunológico e, tanto as deficiências nutricionais quanto o excesso de certos micronutrientes, podem ter um impacto adverso na imunidade afetando a funcionalidade das células imunes (29,31,32).

Outros micronutrientes adquiridos através da dieta, como as vitaminas, ácidos graxos e aminoácidos, também oferecem suporte para o sistema imunológico, por exemplo, auxiliando na biossíntese de imunoglobulinas, citocinas e receptores (27). A importância dos micronutrientes e seu papel sinérgico no sistema imune tem como marco inicial o ensaio clínico de James Linde conduzido em 1753 que associou a deficiência de vitamina C com escorbuto (28,34).

Assim a interação multidirecional entre nutrição, infecção e imunidade impulsiona uma potencial estratégia terapêutica alternativa para infecções bacterianas pautada no impacto clínico das deficiências e suplementação dos micronutrientes (35). Na hanseníase os estudos voltados para a influência dos nutrientes sobre a doença são poucos e com limitações, resultando em grandes lacunas de conhecimento acerca da doença (36).

1.2.1 Metabolismo do ferro

O Fe é um oligoelemento essencial para quase todas as células e organismos vivos, pois está envolvido em vários processos bioquímicos e metabólicos (37). É o metal de transição mais comumente encontrado nos estados de oxidação +2 (Fe^{2+} /ferro ferroso) e +3 (Fe^{3+} /ferro férrico) (38).

No organismo, o Fe é armazenado, principalmente, no grupo heme das hemoglobinas, nos hepatócitos e nos macrófagos esplênicos após destruição dos eritrócitos senescentes. O Fe é constantemente reciclado e sua eliminação é limitada, ocorrendo via descamação fisiológica das células da pele, do trato geniturinário e gastrointestinal ou sangramentos (39,40).

A homeostase do Fe é mantida sistemicamente através de mecanismos que regulam sua absorção intestinal, utilização, armazenamento e distribuição. A absorção de Fe no intestino é modulada por 3 mecanismos independentes: pela quantidade de Fe consumido na dieta; de acordo com os estoques de Fe do corpo; em resposta à eritropoiese ineficaz (41).

Os enterócitos são responsáveis pela absorção do Fe da dieta no lúmen duodenal, sendo necessária a redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} por enzimas que estão acopladas aos transportadores transmembrana. Assim, o Fe^{2+} é transportado através da membrana apical pelo transportador de íon metálico divalente 1 (DMT1) e ao chegar no meio intracelular é armazenado pela ferritina, uma proteína de armazenamento presente no citosol cuja principal função é oxidar e sequestrar o excesso de Fe^{2+} . Em seguida, o mecanismo de exportação do Fe para a corrente sanguínea acontece via proteína transportadora ferroportina, que é acompanhada da atividade de enzimas oxidativas, expressas na membrana basolateral dos enterócitos (Figura 1). A ferroportina é o único exportador de Fe^{2+} e é expressa nas membranas dos macrófagos e hepatócitos (37,39).

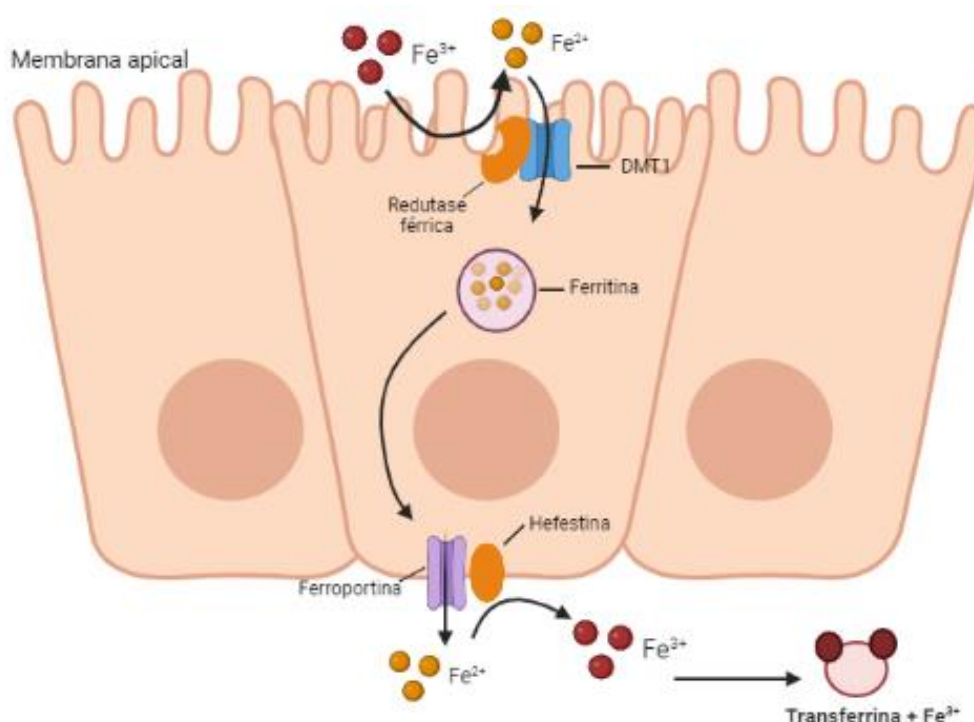


Figura 1 – Representação da absorção de ferro pelos enterócitos e seu transporte até a corrente sanguínea. Fe^{3+} : ferro férrico, Fe^{2+} : ferro ferroso, DMT1: transportador de íon metálico divalente 1. (Criado em BioRender.com)

No plasma, após sua reoxidação, o Fe^{3+} se liga à transferrina tornando-se solúvel e possibilitando sua circulação pelo organismo. Fisiologicamente, o Fe plasmático está majoritariamente associado a transferrina. A transferrina é uma glicoproteína com dois sítios de ligação e tem como função o fornecimento de Fe para as células. (39). O complexo transferrina/ Fe^{3+} se liga ao receptor de transferrina (TfR), localizado na superfície celular, sofrendo endocitose. No interior do endossomo uma bomba de prótons acidifica o meio resultando na dissociação do complexo transferrina/ Fe^{3+} . O transportador DMT1 exporta o Fe do endossomo para o citoplasma que pode ser destinado para as mitocôndrias para formação do grupo heme quando esse processo está ocorrendo nas células eritróides, ou ser armazenado na forma de ferritina e hemossiderina nas células não eritróides. Após a liberação, a transferrina e seu receptor são enviados para a superfície celular e reutilizados em novos ciclos de ligação de Fe (39,41).

Outro elemento importante na homeostase sistêmica de Fe é a hepcidina, um hormônio circulante sintetizado pelo fígado e responsável por regular o efluxo de Fe pela ferroportina, resultando no controle da saturação da transferrina. A hepcidina atua

através de dois mecanismos: (i) ligação com consequente oclusão da ferroportina e endocitose e (ii) degradação permanente da ferroportina da superfície celular. Os níveis de hepcidina são controlados pelos estímulos que atuam na homeostase do Fe e por processos inflamatórios (Figura 2) (39,42).

A expressão da hepcidina induzida pela inflamação é sinalizada aos hepatócitos, principalmente, pela citocina inflamatória IL-6 que ativa a região promotora do gene *HAMP1*, por intermédio do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT 3), inibindo a atividade da ferroportina, acarretando na depleção de Fe do meio extracelular. (42). Em contraponto a esse mecanismo, a hipoferremia e a atuação do regulador eritropoiético agem concomitantemente suprimindo a produção da hepcidina para aumentar a disponibilidade de Fe para funções essenciais (43).

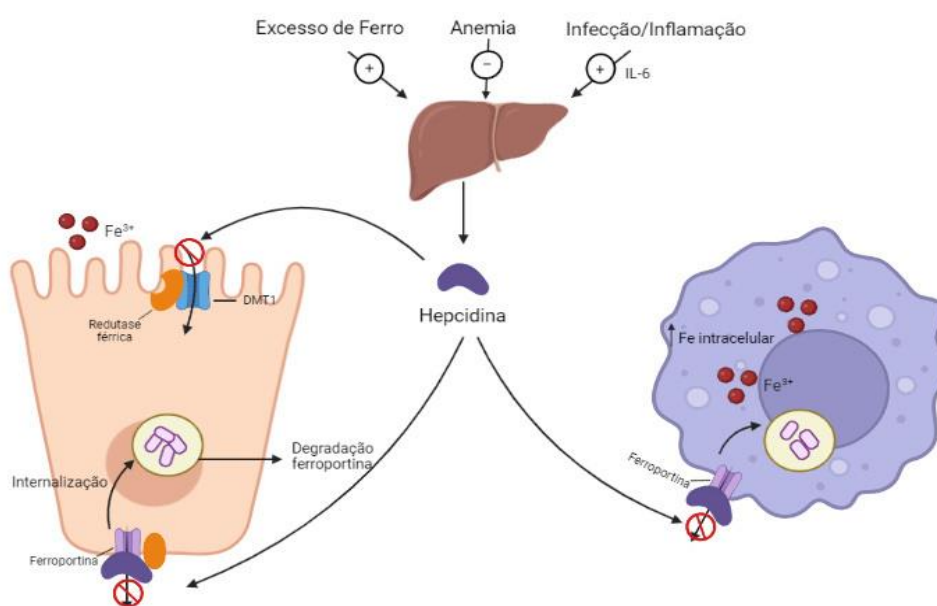


Figura 2 - Mecanismo de ação da hepcidina no metabolismo do ferro. IL-6: interleucina 6, Fe³⁺: ferro férrico, Fe²⁺: ferro ferroso, DMT1: transportador de íon metálico divalente 1. (Criado em BioRender.com)

1.2.1.1 Papel do ferro e sua modulação nas infecções

O Fe ocupa uma posição de destaque na interação patógeno-hospedeiro, pois atua como um cofator essencial tanto para os mecanismos de virulência e proliferação do patógeno quanto para as respostas imunológicas do hospedeiro (44). A redução dos níveis de Fe é uma importante estratégia de defesa do hospedeiro (45). A inflamação, seja aguda ou crônica, desencadeia distúrbios metabólicos que afetam a

homeostasia do Fe alterando as concentrações de seus principais indicadores (ferritina, transferrina e hepcidina) (46).

A produção de hepcidina mediada por citocinas está intimamente associada ao quadro de hipoferremia observado nas infecções crônicas e agudas, e exibe um efeito protetor contra patógenos extracelulares, uma vez que concentrações aumentadas de hepcidina inibem a atividade da ferroportina, acarretando na depleção de Fe do meio extracelular e limitação da disponibilidade do ferro. A ferroportina também pode ser regulada por moléculas microbianas, como os lipopolissacarídeos (LPS), estimulando os receptores do tipo Toll-Like (TLR), sensores-chave da imunidade inata, suprimindo os níveis de RNA mensageiro (mRNA) para expressão da ferroportina e a exportação de Fe celular (42–44). Por consequência a modulação positiva da hepcidina pode ser prejudicial ao hospedeiro ao favorecer os patógenos intracelulares em decorrência do acúmulo do Fe intracelular pela degradação da ferroportina (47).

Souza et al. (48) observaram níveis elevados de hepcidina na urina e em lesões de pacientes MB, cenário que favorece a retenção de Fe no interior dos macrófagos e, assim, a multiplicação do *M. leprae*. Em contraste, nas lesões de pacientes PBs observaram maior expressão de ferroportina e menor expressão de hepcidina. No mesmo sentido, esses autores encontraram aumento expressivo da forma solúvel do receptor de transferrina em pacientes MB. Contudo, os estudos voltados para relevância do Fe nutricional sobre a hanseníase são poucos e com limitações e os efeitos da homeostasia do Fe não são amplamente compreendidos nessa doença (36). Desse modo, investigar o papel do Fe dietético na multiplicação do *M. leprae* é claramente importante.

Em contrapartida aos mecanismos do hospedeiro, os patógenos desenvolveram múltiplos recursos para sequestro e aquisição de ferro. Pode-se citar como principais estratégias as hemolisinas e proteases para clivagem dos eritrócitos e hemoglobina, com consequente liberação de ferro; receptores específicos de ligação à transferrina e ferritina; e os sideróforos, que são agentes quelantes específicos com alta afinidade pelo Fe (49,50). Os sideróforos são um importante fator de virulência e a principal via de obtenção de Fe³⁺ da maioria dos patógenos e atuam ligando-se ao Fe extracelular não ligado à transferrina (NTBI - *non-transferrin bound iron*) ou ainda sequestrando o Fe associado à transferrina (51). A biossíntese dos sideróforos pelos patógenos é regulada pelos níveis ambientais de Fe, sendo estimulada sob baixas concentrações de Fe e suprimida sob altas concentrações do metal (52).

O principal sideróforo secretado pelo *M. leprae* é a exoquelina, um polipeptídeo de baixo peso molecular, hidrofílico, secretado para o meio extracelular para sequestrar o Fe (53). O sequenciamento do genoma do *M. leprae* não identificou genes para biossíntese de 2 sideróforos amplamente isolados de outras micobactérias, a micobactina e a carboximicobactina. Ao contrário de outras micobactérias, o *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, logo é desafiador e difícil a identificação e recuperação de quaisquer sideróforos. O Fe capturado pelas micobactérias é armazenado ligado à bacterioferritina, proteína semelhante a ferritina dos mamíferos, expressa sob condições de excesso de Fe (52–55).

A contrarresposta do organismo aos sideróforos é a produção de lipocalina-2, uma proteína de fase aguda secretada por neutrófilos e macrófagos epiteliais, capaz de se ligar aos sideróforos carregados de Fe interrompendo a estratégia de sequestro de Fe do patógeno (56). A escassez de Fe resultante da ação da lipocalina-2 é um dos mecanismos de imunidade nutricional natural do hospedeiro. É importante ressaltar que a lipocalina-2 não tem ligação direta com o íon ferro, somente com os sideróforos, auxiliando no combate aos patógenos intracelulares exercendo um efeito bacteriostático pela indução de hipoferremia de forma independente da hepcidina (57). O papel da lipocalina-2 é amplamente avaliado nas infecções bacterianas, contudo não são muitos os estudos sobre sua influência na progressão da hanseníase. Bazid et al. (58) observaram níveis séricos de lipocalina-2 significativamente menores em doentes de hanseníase em relação ao grupo controle. No entanto, considerando as formas clínicas observaram níveis mais altos dessa proteína em pacientes com hanseníase MB do que em pacientes classificados como PBs, o que denota a tentativa de restringir a captação de Fe pelo patógeno na presença de maior carga bacilar.

Outro recurso do hospedeiro que impacta na disputa pelo Fe com os patógenos, sobretudo os intracelulares, é a proteína Nramp-1 (proteína 1 de macrófagos associada à resistência natural). Trata-se de uma proteína intracelular expressa no fagolissosomo dos macrófagos que funciona como uma bomba de efluxo transportando íons metálicos divalentes, como o ferro, para o citoplasma restringindo a proliferação do patógeno (59). Apesar de não ser totalmente esclarecido como a função de transporte dessa proteína contribui para os efeitos associados à sua expressão, o Nramp-1 tem sido associado à resistência a patógenos intracelulares, como os do gênero *Mycobacterium*, e à regulação positiva de funções pró-

inflamatórias de macrófagos. Estudos demonstram que polimorfismos do gene *NRAMP1* estão associados à suscetibilidade à hanseníase (60,61).

Notoriamente as infecções causam alterações no metabolismo do Fe, sendo um desafio para a estratégia de defesa do hospedeiro restringir o acesso ao Fe pelos patógenos, sem causar danos a si mesmo. Não obstante, os patógenos se adaptaram e também se muniram de mecanismos capazes de driblar a defesa do hospedeiro e manipular a maquinaria operacional do Fe dispondo de uma vantagem de sobrevivência (45).

As evidências acerca do papel do Fe em micobacterioses são, em sua maioria, derivadas de outras doenças, em particular, da tuberculose. Estudos corroboram com a influência do status do Fe na progressão da tuberculose, assim como o excesso de Fe favorece a proliferação do *M. tuberculosis* (62,63). Lounis et al. (63) demonstraram que a multiplicação do *M. tuberculosis* foi significativamente aumentada em camundongos BALB/c suplementados com Fe (hidroxila férrica).

Os estudos voltados para a relevância do Fe nutricional sobre a hanseníase são poucos e com limitações, desse modo existem lacunas na compreensão da interação entre o patógeno e o hospedeiro nos aspectos que tangem a homeostasia do Fe na hanseníase (36).

1.2.2 Metabolismo da vitamina D e o sistema imunológico

A vitamina D (VTD) é uma vitamina lipossolúvel sintetizada, principalmente, pela pele após a exposição à luz ultravioleta e pouco obtida através da dieta. No organismo a VTD sofre 2 processos de bioconversão, primeiramente no fígado onde é convertida para sua forma de armazenamento e circulante, a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), e posteriormente, nos rins é convertida pela ação da 1- α -hidroxilase para sua forma biologicamente ativa, a 1,25 -hidroxivitamina D (1,25(OH)D). Sua síntese, normalmente, é controlada pelos níveis séricos de cálcio, paratormônio e 1,25(OH)D. O receptor de vitamina D (VDR) está expresso majoritariamente nos enterócitos, porém são receptores também encontrados em outras células nucleadas, como as do sistema imunológico (64).

Classicamente a VTD está vinculada ao processo de homeostase do cálcio e metabolismo ósseo, contudo, funções consideradas não clássicas, por exemplo sua influência sobre a imunidade inata e adaptativa, têm sido amplamente estudadas. A conexão entre o sistema imunológico e VTD provém dos VDRs expressos nas células

do sistema imune e também pela bioconversão intracelular desse metabólito realizada pelos macrófagos através da enzima 1α -hidroxilase (65,66).

No sistema imune inato as ações imunomoduladoras da VTD se iniciam pela ativação dos TLRs aumentando a expressão dos VDRs e a atividade da 1α -hidroxilase. Citocinas, como IFN- γ e IL-4, também possuem sinalização positiva na atividade da 1α -hidroxilase. A ligação da $1,25(\text{OH})\text{D}$, metabólito ativo, ao receptor expressos em monócitos ou macrófagos desencadeia o mecanismo de resposta do sistema imune contra a infecção pelo aumento da capacidade fagocítica e quimiotática dos macrófagos. A ativação dos VDRs de macrófagos é responsável pela ativação direta da transcrição da catelicidina, peptídeo que atua nas membranas microbianas para eliminação de bactérias e fungos (65–67). Estudos demonstraram a capacidade da catelicidina em neutralizar o crescimento de micobactérias, especificamente *Mycobacterium tuberculosis* (68,69).

Na imunidade adaptativa a VTD fomenta modificações que minimizam uma resposta imunológica exacerbada. Nas células dendríticas, células ponte entre a imunidade inata e adaptativa, a VTD modula alterações que induzem uma imunidade adaptativa de perfil mais tolerogênico por intermédio da diminuição da expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), reduzindo a apresentação de antígenos, com consequente diminuição da secreção de IL-12 e de moléculas coestimuladoras. A modulação da VTD na imunidade adaptativa também se estende a polarização das células T, suprimindo o fenótipo Th1, Th17 e suas citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-17 e IL-21) e estimulando a síntese de citocinas do perfil Th2 (IL-4) e Tregs (IL-10) suprimindo respostas pró-inflamatórias. A VTD também inibe a diferenciação e proliferação dos linfócitos B, com consequente prejuízo na secreção das imunoglobulinas (65–67).

A metabolização da VTD pelo sistema imunológico é regulada independentemente dos níveis sistêmicos desse hormônio em sua forma ativa, uma vez que, o tempo de meia vida varia entre 4 a 6 horas. Ressalta-se ainda que, nesse cenário a regulação da 1α -hidroxilase também é desassociada da via renal e totalmente controlada por sinais imunológicos, contudo a síntese autócrina da $1,25(\text{OH})\text{D}$ é dependente da disponibilidade da $25(\text{OH})\text{D}$ circulante (67).

O VDR é um membro da superfamília de receptores hormonais nucleares que são fatores de transcrição induzíveis por ligantes. O VDR expresso nas células pode intermediar dois principais tipos de respostas associadas a VTD, a não genômica,

desencadeando uma cascata de sinalização intracelular independente de transcrição gênica, e a resposta da via genômica atuando como fator de transcrição em regiões promotoras de diversos genes. (70). Como fator de transcrição o VDR regula genes ao ser ativado pelo seu ligante 1,25(OH)D, que induz a sua translocação para o núcleo, onde associa-se ao receptor de retinóide X (PXR) formando um heterodímero capaz de se ligar à sítios específicos na região promotora dos genes, denominados elementos de respostas à VTD (VDRE), e recrutando proteínas coregulatórias resultando na expressão ou repressão do gene-alvo (Figura 3) (71,72).

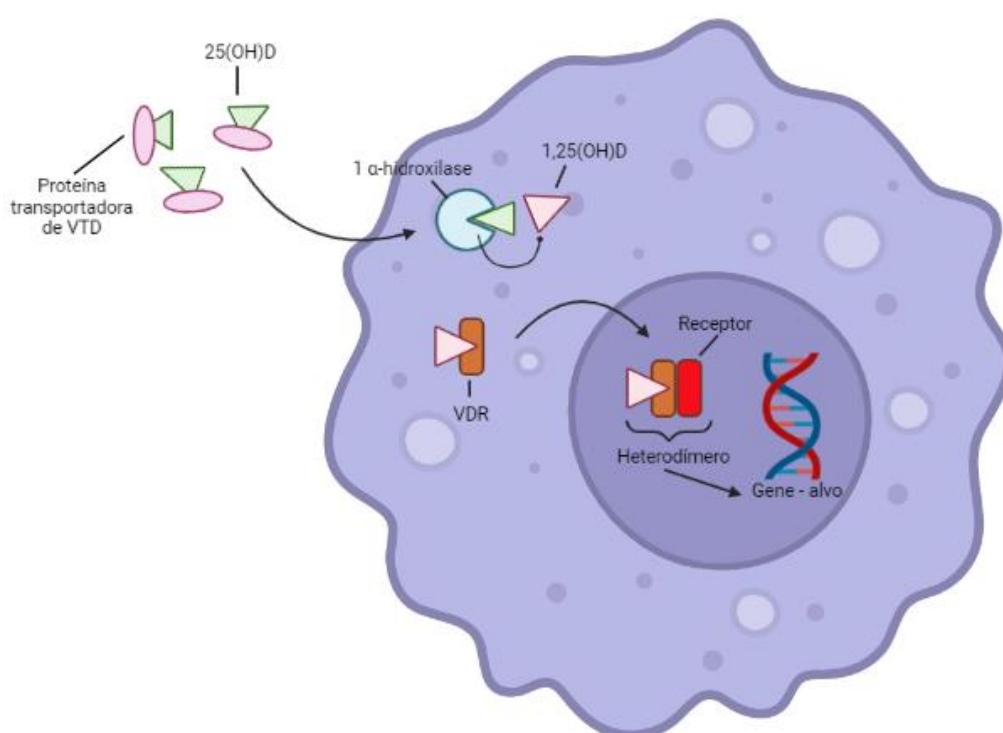


Figura 3 - Representação da regulação transcricional da vitamina D. A 25(OH)D é internalizada, convertida para 1,25(OH)D pela 1-α-hidroxilase que se liga ao VDR sendo translocada para o núcleo celular onde associa-se a outro receptor e atua na regulação de genes-alvo. VTD: vitamina D, VDR: receptor de vitamina D. (Criado em BioRender.com)

1.2.2.1 Influência da Vitamina D nas infecções

Os avanços no conhecimento dos mecanismos envolvidos na imunomodulação pela VTD evidenciaram a relação fisiológica entre este micronutriente e a resposta imune que, apesar de não ter uma ação antimicrobiana direta, atua de forma significativa sobre os principais componentes da imunidade inata e adaptativa.

Capacidade que, como previamente descrito, está intimamente associada com a conversão intracelular da VTD e a expressão do VDR (66).

Na imunidade inata, a insuficiência de VTD resulta em níveis menores de expressão do antimicrobiano catelicidina, logo a insuficiência desse micronutriente tem potencial para regular a resposta imune durante uma infecção. Adicionalmente, mecanismos de autofagia e a formação de autofagossomos em monócitos são influenciados também pelo status da VTD, aumentando a morte intracelular de patógenos, por exemplo *M. tuberculosis*. A deficiência de VTD também prejudica a capacidade dos macrófagos de amadurecerem e liberarem citocinas e quimiocinas inflamatórias (73,74).

Vários estudos apontam o benefício da VTD no tratamento da tuberculose, assim como a associação da sua insuficiência com maior incidência da doença. A conversão de 1,25(OH)D nos macrófagos induz positivamente expressão de catelicidina, β -defensina e intermediários reativos de oxigênio. Além disso, a VTD parece ser capaz de aumentar a fagocitose e reduzir a disponibilidade de Fe intracelular limitando o crescimento do *M. tuberculosis*. É improvável que estes efeitos reguladores da VTD sobre o sistema imune estejam restritos à tuberculose e às doenças infecciosas (73,75,76).

Na imunidade adaptativa a deficiência da VTD favorece a resposta imune pró-inflamatória envolvendo células Th1 e Th17. Na hanseníase as células T têm papel fundamental na imunopatogênese da doença e a resposta Th1 é a mais eficiente na contenção do bacilo (77). A deficiência de VTD observada em micobacterioses tem uma forte correlação negativa com o aumento de citocinas pró-inflamatórias. Mandal et al. (78) apontaram associação entre os níveis de expressão do VDR e a progressão da hanseníase, e que pacientes com reações hansênicas apresentam baixos níveis séricos de VTD e, particularmente, os que são acometidos pelo ENH baixa expressão de VDR (78). Apesar dos níveis de VTD não estarem diretamente associados com hanseníase, polimorfismos no gene VDR tem sido correlacionado com a progressão da hanseníase e índice baciloscópico mais elevado (78,79).

A influência de fatores genéticos humanos sobre a suscetibilidade à hanseníase tem sido amplamente estudada, e dentre os genes associados com o risco da doença encontra-se o gene que codifica o VDR, já que pode influenciar no crescimento intracelular da micobactéria (80). O estudo de Araújo et al. (81) associou os polimorfismos T61968C e A61894G do gene *VDR* com o risco de hanseníase na

população brasileira e descreveu ainda que estes controlam o equilíbrio das citocinas Th1 e Th2, que prediz a evolução clínica da hanseníase. Ademais, polimorfismos do gene VDR também foram associados com a suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis* (82).

O gene *CAMP* que codifica a catelicidina, um potente peptídeo antimicrobiano contra patógenos intracelulares, é alvo do VDR sendo regulado positivamente pela presença de VTD (72). Oliveira et al. (72) demonstraram essa regulação ao encontrarem forte associação entre a expressão gênica de *VDR* e *CAMP* com os níveis séricos de 25(OH)D em pacientes com hanseníase.

A VTD pode exercer influência da sobre a homeostase do Fe pela supressão transcricional que o VDR exerce sobre o gene *HAMP1*. Níveis suficientes de VTD diminuem a transcrição de *HAMP1* e, conseqüentemente, diminuem os níveis de Fe intracelular. Em contrapartida, a insuficiência de VTD aumenta a síntese de hepcidina e os níveis de Fe intracelular. Assim, a regulação da hepcidina mediada pela VTD pode ser uma faceta importante da defesa em infecções causadas por patógenos intracelulares (83).

Nesse cenário, a VTD é um importante nutriente na modulação da resposta imune e, conseqüentemente, para o controle da proliferação do *M. leprae*, bem como progressão e prognóstico da hanseníase. Contudo, o impacto e relevância na hanseníase não são bem estudados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos níveis de Fe e VTD da dieta sobre a infecção pelo *M. leprae* *in vivo* e *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação ou restrição dietética de Fe ou VTD na infecção experimental de camundongos BALB/c pelo *M. leprae*, segundo o método de Shepard (21), considerando os seguintes parâmetros:

- Multiplicação bacilar por baciloscopia;
- Expressão gênica e proteica *in situ* dos mediadores do metabolismo do Fe: hepcidina (*HAMP1*), ferroportina (*SLC40A1*), e lipocalina-2 (*LCN2*);
- Expressão gênica e proteica *in situ* dos mediadores imunológicos associados com a VTD: catelicidina (*CAMP*), beclina-1(*BECN1*) e interferon-gama (*IFNG*).

Avaliar o efeito da suplementação ou restrição dietética de Fe ou VTD sobre a resposta *in vitro* de células infectadas com *M. leprae* das seguintes formas:

- Quantificação da secreção das citocinas IL-6, IL10, IL-17A e TNF por células peritoneais de camundongos submetidos às diferentes dietas aqui avaliadas;
- Quantificação da produção dos mediadores inflamatórios: proliferação celular e citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IFN- γ e TNF por esplenócitos de camundongos submetidos às diferentes dietas aqui avaliadas.

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

O modelo experimental desse estudo foi composto por camundongos machos da linhagem BALB/c que, imediatamente após desmame, receberam ração modificada (Pragsoluções Biociências) ou ração padrão (AIN-93M) ofertadas *ad libitum* e mantidas até o sacrifício. A Figura 4 ilustra as principais etapas do estudo

Os animais foram divididos em 2 grandes grupos experimentais: não infectados e infectados. Os camundongos foram ainda subdivididos em 5 grupos de 5 animais, de acordo com a dieta experimental da seguinte maneira:

- Dieta padrão: ração padrão para manutenção da vida adulta (quantidades mínimas de VTD de 2.000 UI/Kg e Fe 50ppm) (84);
- Dieta deficiente de Fe: ração modificada com 0% de Fe;
- Dieta suplementada com Fe: ração modificada com 500 ppm de Fe;
- Dieta deficiente de VTD: ração modificada com 0 UI/Kg;
- Dieta suplementada com VTD: ração modificada com 10.000 UI/kg.

Os grupos de animais não infectados receberam as respectivas dietas por 30 dias, imediatamente após desmame, e em seguida sacrificados para coleta das células peritoneais e esplenócitos para execução dos experimentos *in vitro*.

Os grupos de animais infectados foram inoculados aos 60 dias de vida e a infecção foi mantida por 100 dias. Estes animais receberam as respectivas dietas após desmame e durante o período de infecção, totalizando 140 dias de dieta, e eutanasiados para a execução das avaliações *in vivo*.

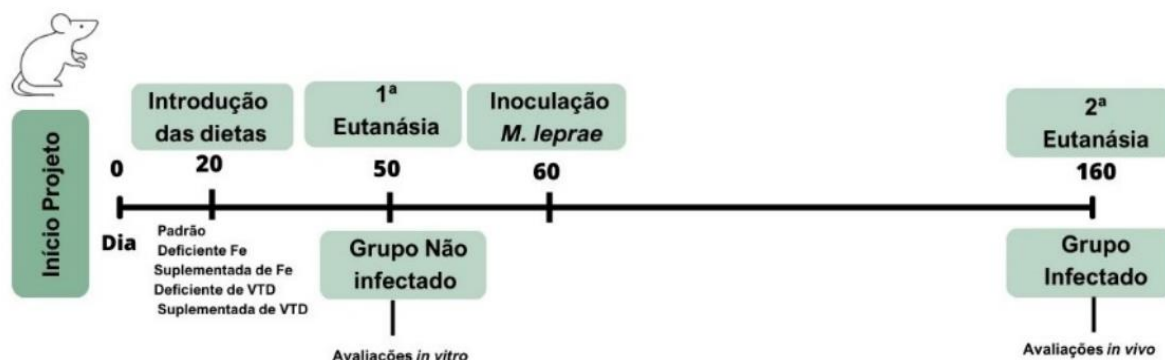


Figura 4 - Fluxograma de execução do estudo. Linha do tempo com especificação das principais etapas do estudo. Fe: ferro, VTD: vitamina D

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais (ILSL003/18) do Instituto Lauro de Souza Lima.

3.2 Obtenção do *Mycobacterium leprae* e inoculação dos camundongos

Os inóculos de *M. leprae* para infecção dos camundongos utilizados no estudo foram obtidos a partir dos coxins plantares de camundongos atímicos nude (athymic nude, nu/nu – *Foxn1^{nu}*) previamente infectados com a cepa *Thai-53*, conforme descrito por Trombone et al. (85). Os bacilos foram quantificados após a coloração de Ziehl Nielsen a frio para ajuste do inóculo de infecção. Os camundongos BALB/c foram infectados, por via intradérmica, na superfície plantar de ambas as patas traseiras com suspensão bacilar contendo $1,0 \times 10^4$ bacilos/mL, conforme descrito por Shepard (21).

3.3 Dosagens séricas de ferro e vitamina D

Os níveis séricos de Fe e 25(OH)D foram dosados no soro dos camundongos infectados e não infectados coletados por punção cardíaca, após eutanásia. A quantificação do Fe sérico foi realizada por método colorimétrico utilizando kit comercial Quimifer (Ebram) com faixa de detecção de 0 à 1000 µg/dL. A dosagem da 25(OH) foi realizado por turbidimetria utilizando o kit comercial Turb Vit-D (Ebram) com faixa de detecção de 7,6 à 147,8 ng/mL. Ambas dosagens foram feitas em equipamento bioquímico automatizado BS-300 (Mindray).

3.4 Avaliação de mediadores inflamatórios em cultura de células peritoneais e esplenócitos

Os grupos de animais não infectados que receberam as dietas de suplementação ou deficiência de Fe ou VTD foram avaliados quanto a produção de mediadores inflamatórios *in vitro*.

3.4.1 Cultivo de células peritoneais *in vitro*

Células peritoneais totais foram obtidas por lavagem da cavidade peritoneal com solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelado suplementado com 3% de soro fetal bovino seguido de centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspense em meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina 100U/ml e estreptomicina A 100 µg/ml). A concentração celular foi ajustada para 1×10^6

células/ml, através da contagem em câmara de Neubauer utilizando corante vermelho neutro (proporção 1:8), e 200 µl da suspensão foi distribuída por poço em placas de 24 poços.

As células foram cultivadas na presença de *M. leprae* por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂) em multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1. Como controle positivo, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escheria coli* (LPS) (Sigma) na concentração final de 10 µg/mL. Como controle negativo as células peritoneais foram cultivadas em meio suplementado idêntico na ausência de estímulo. Os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio.

3.4.1.1 Purificação do *Mycobacterium leprae* para infecção das células peritoneais

Os bacilos para infecção *in vitro* das células peritoneais foram obtidos dos coxins plantares de camundongos atímicos nude previamente inoculados com a cepa *Thai 53* de *M. leprae*, conforme protocolo de Trombone et al. (85). Resumidamente, o protocolo para a recuperação dos bacilos incluiu dissecação do coxim plantar, isolamento do tecido, processamento em homogeneizador de tecidos (Turrax-IKA) seguido de purificação pela digestão enzimática com tripsina a 0,05%. A contagem de *M. leprae* foi feita após coloração de Ziehl-Neelsen.

3.4.2 Cultivo de esplenócitos *in vitro*

As células esplênicas foram obtidas após maceração dos baços com meio RPMI e recuperadas por centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão de lise (NH₄Cl 0,15M) e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente para lise osmótica dos eritrócitos. Após, realizou-se uma etapa de lavagem e inativação do tampão de lise com RPMI. Imediatamente as células foram ressuspensas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina 100U/ml e estreptomicina A 100 µg/ml), contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan (proporção 1:2) e a concentração celular foi ajustada para 5 x 10⁶ células/ml e 100 µl da suspensão foi distribuída em placas de 96 poços.

As células foram estimuladas com antígeno sonificado do *M. leprae* na concentração final de 10 µg/mL (gentilmente cedido pelo Dr. Patrick Brennan,

Colorado State University, USA). Como controle positivo, os esplenócitos foram estimulados com Concanavalina A (*ConA*) (Sigma) na concentração final de 2,5 µg/mL e como controle negativo os esplenócitos foram cultivados apenas com meio RPMI suplementado. As culturas foram incubadas por 72 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para dosagem de citocinas. Os esplenócitos estimulados com antígeno de *M. leprae* sonificado, *ConA* e cultura controle foram utilizados para o ensaio de avaliação da proliferação celular.

3.4.2.1 Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular da cultura de esplenócitos foi avaliada pelo ensaio MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio). Após 72 horas de cultivo, adicionou-se aos poços de cultura 20 µl de solução de MTT (Sigma) em 5 mg/mL com incubação de 2 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes, cuidadosamente, descartados. Em seguida, foi adicionado 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) em cada poço. Após 5 minutos de reação, as placas foram submetidas a leitura a 540nm em leitor de ELISA (ThermoFisher Scientific). As dosagens foram feitas em triplicatas. As absorbâncias das células controles de cada dieta foram consideradas como 100% de viabilidade celular e utilizadas como referência para os cálculos percentuais de viabilidade das células estimuladas.

3.4.3 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

A quantificação das citocinas nos sobrenadantes das culturas foi realizada por meio do ensaio Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences e tal), conforme instruções do fabricante. Nos sobrenadantes da cultura de células peritoneais foram quantificadas IL-6, IL10, IL-17A e TNF. Já os sobrenadantes da cultura de esplenócitos foram quantificados para os níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IFN-γ e TNF. Brevemente, os sobrenadantes das culturas e dos padrões de citocinas, diluídos previamente, foram misturados com um pool de *beads* (IL-2, IL-4, IL-6, IL10, IL-17A, IFN-γ e TNF) e do reagente de detecção PE com subsequente incubação por 120 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram lavadas duas vezes com wash buffer, o sobrenadante cuidadosamente descartado e as beads ressuspensas em wash buffer para análise em equipamento de citometria de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences).

Após a coleta dos dados as concentrações de citocinas foram calculadas com base nos resultados das curvas padrões usando o software FCAP Array (BD Biosciences).

O limite de detecção para cada uma das citocinas quantificada pelo CBA Mouse Th1/Th2/Th17 kit estão especificados no Quadro 1.

Quadro 1. Limite de detecção das citocinas do kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17.

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IL-2	0,1
IL-4	0,03
IL-6	1,4
IL-10	16,8
IL-17A	0,8
IFN- γ	0,5
TNF	0,9

3.5 Avaliação dos mediadores do ferro e vitamina D na infecção pelo *Mycobacterium leprae* in vivo

3.5.1 Análise da multiplicação do *Mycobacterium leprae* em modelo murino

Para quantificação da multiplicação do *M. leprae*, após término da dieta, os camundongos foram eutanasiados e seus coxins plantares excisados, pesados e triturados. Para obtenção da suspensão bacilar apenas um dos coxins plantares traseiros foi processado em solução fisiológica estéril com auxílio de um homogeneizador de tecidos (85). Os bacilos foram contabilizados após a coloração de Ziehl-Nielsen a frio em microscópio ótico avaliando o total de 60 campos por amostra conforme Shepard (86).

3.5.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Metade do segundo coxim plantar excisado foi coletado em 1 mL de Trizol (Invitrogen) e destinado para extração de RNA pelo kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras foram transferidas para microtubos com esferas de cerâmica (Bertin Technologies) para processamento em equipamento Precellys24 (Bertin Technologies). Foram feitos três ciclos de homogeneização e lise de 1 pulso de 6.500 rpm por 10 segundos seguido de incubação em gelo por 5 minutos. O homogeneizado foi transferido para novo microtubo e incubado, em temperatura ambiente, por 5

minutos. Foram adicionados 100 µl da solução eliminadora de gDNA (disponibilizada no kit) ao lisado e, vigorosamente, homogeneizado em vórtex. Em seguida, adicionou-se 180 µl de clorofórmio seguido de homogeneização em vórtex, incubação em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a 12.000g por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa superior contendo o RNA foi transferida para novo microtubo e transferida para o equipamento Qiacube (Qiagen) para extração automatizada. Ao final do processo o RNA foi ressuspenso em 30 µl de água ultrapura. O RNA extraído foi avaliado quanto a quantidade e pureza através da leitura em espectrofotômetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por reação de transcrição reversa com SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) a partir de 1 µg de RNA, conforme as instruções do fabricante.

3.5.3 Expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real

As expressões dos genes alvos *HAMP1* (hepcidina), *SLC40A1* (ferroportina), *IFNG* (interferon-gama), *LCN2* (lipocalina), *CAMP* (catelicidina) e *BECN1* (beclina-1) e do gene constitutivo *ACTB* (β -actina) foram avaliadas por ensaios TaqMan Gene Expression (Thermo Fisher) em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems). Os seguintes ensaios inventariados para camundongos foram empregados: *HAMP1-Mm00519025_m1*; *SLC40A1-Mm01254822_m1*, *IFNG-Mm01168134_m1*; *LCN2-Mm01324470_m1*; *CAMP-Mm00438285_m1*; *BECN1-Mm01265461_m1* e *ACTB-Mm00607939_s1*.

As reações foram feitas em volume final de 25 µl, com 1,25 µl de ensaio, 12,5 µl de mix reação (TaqMan™ Gene Expression Master Mix), 8,75 µl de água para PCR e 2,5 µl de cDNA. As condições da reação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

As expressões dos genes de interesse foram calculadas pelo método da curva padrão relativa. Para isso, um pool de amostras de cDNA foi diluído de forma seriada em 6 pontos e esta curva foi amplificada simultaneamente com as amostras para os alvos e referência. Os dados de expressão dos alvos foram então normalizados pela expressão do controle endógeno *ACTB*.

3.5.4 Imuno-histoquímica

Parte de um dos coxins plantares de cada camundongo foi processada para inclusão em parafina, microtomia (5 µm) e análise imuno-histoquímica, conforme previamente descrito (87,88). Foram avaliados marcadores do metabolismo de Fe (ferroportina, hepcidina, lipocalina-2) e mediadores inflamatórios (beclina-1, catelicidina, interferon-γ), em grupos experimentais submetidos a dietas com deficiência ou suplementação de Fe e VTD, além de controle com dieta padrão. No Quadro 2, encontra-se o detalhamento dos anticorpos primários empregados neste estudo.

Quadro 2. Anticorpos, fatores de diluição e tampões para imuno-histoquímica.

Anticorpo (Fabricante)	Diluição	Tampão
anti-Hepcidin (Abcam 190775)	1:50	Tris-EDTA
anti-SLC40A1 (Abcam78066)	1:80	Citrato de sódio 10 mM
anti-Lipocalin-2 (Abcam 227814)	1:1500	Tris-EDTA
anti-Cathelicidin (Abcam 207758)	1:1500	Tris-EDTA
anti-Beclin 1 (Abcam 232461)	1:50	Tris-EDTA
anti-Interferon gamma (Abcam 231301)	1:100	Tris-EDTA

Cortes microscópicos de cada espécime e grupo, foram dispostos em lâminas silanizadas (Perfecta), desparafinizados em estufa a 60 °C seguida de banhos em xilol e hidratados por gradientes de etanol (100%, 90% e 70%). A recuperação antigênica foi obtida em câmara de pressão (DakoCytomation Pascal), por 5 minutos a 98 °C, com os espécimes submersos em tampão citrato de sódio (10 mM) ou Tris/EDTA (10 mM/1 mM, pH 9,0), conforme indicado pelo fabricante dos anticorpos (Quadro 1). Em seguida, passaram por bloqueio de peroxidase endógena, utilizando peróxido de hidrogênio a 5%, por 30 minutos, para inibir as interações de peroxidase endógena. Após essa etapa, os cortes foram tratados com solução de bloqueio de reação cruzada contendo Molico® 1% em solução salina tamponada (TBS, *tris-buffered saline*), por 60 minutos, para bloquear ligação não específica de anticorpos. Os espécimes foram então, incubados com anticorpos primários para os alvos de interesse, diluídos em tampão TBS/BSA 1%, *overnight*, a 4 °C. Após a incubação com os anticorpos primários, o sistema EnVision Flex/HRP (Dako Agilent, USA) foi utilizado para imunodeteção dos alvos celulares. O substrato cromogênico diaminobenzidina (Liquid DAB+, Dako Agilent, USA) foi empregado para revelar a reação imuno-

histoquímica. Após essa etapa, os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris e montados em meio aquoso Glycergel® (Dako Agilent, USA). Controles negativos internos consistiram em cortes nos quais os anticorpos primários foram substituídos por solução de bloqueio (TBS/Molico® 1%).

3.5.4.1 Análise de imagens digitalizadas

Os cortes microscópicos foram submetidos a captura de imagens na câmera Axiocam 234 HRc (Carl Zeiss, DE), acoplada ao fotomicroscópio Axiophot 2 (Carl Zeiss, DE), em objetiva 40x. A avaliação semiquantitativa da imunoexpressão tecidual de ferroportina, hepcidina, lipocalina-2, beclina-1, catelicidina e interferon- γ , foi conduzida no *software* de acesso aberto, ImageJ 1.53a (National Institutes of Health, USA) (89). No IHC Profiler as proteínas expressas *in situ* são mensuradas pela intensidade de pixels por amostra, que variam de 0 (= preto) a 255 (= branco). Os dados são expressões em uma pontuação de quatro níveis: muito positivo (MP), positivo (P), pouco positivo (PP) e negativo (N). Intensidades de 0 a 60 pontuam para a zona muito positiva, de 61 a 120 para a zona positiva, de 121 a 180 para a zona pouco positiva e de 181 a 235 para a zona negativa. Os quatro níveis obtidos por imagem, são então convertidos em escores de densidade óptica, conforme a fórmula fornecida por S. Jafari et al. (89): $(4MP + 3P + 2PP + 1N) / 100$. Os dados foram tabulados e comparados estatisticamente no *software* GraphPad Prism 9.0.0™ (GraphPad Software, USA).

3.6 Análise dos resultados

Os resultados referentes às modificações dietéticas de ferro e vitamina D foram submetidos a análise estatística de forma independente. Para avaliar os efeitos entre as dietas padrão, deficiente e suplementada, bem como para validar os estímulos utilizados, foram aplicados testes de múltiplas comparações. Adicionalmente, o teste de comparações múltiplas foi empregado utilizado o grupo da dieta padrão como parâmetro de controle para contrastar os efeitos do desequilíbrio com a condição ideal. Além disso, as condições de suplementação e deficiência foram comparadas diretamente entre si por meio de testes de comparação entre dois grupos.

Inicialmente, os dados foram submetidos à análise de distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para dados que apresentaram distribuição normal, foram utilizados o Teste t de Student e/ou ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para

comparações múltiplas, ou pelo teste de Dunnett para comparações com o grupo controle (dieta padrão). Já para dados não paramétricos, foram utilizados o teste de Mann-Whitney e/ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas.

As análises de correlação entre a multiplicação do *M. leprae* e a expressão gênica e proteica *in situ* dos mediadores do metabolismo do Fe e da VTD foram realizadas pelo teste de correlação de Spearman.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism versão 9.0.0 adotando o nível de significância de p valor menor do que 0,05.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos efeitos das dietas modificadas em teor de ferro

4.1.1 Avaliação *in vitro*

4.1.1.1 Cultura de células peritoneais totais

4.1.1.1.1 Produção de IL-10, IL-6 e TNF

Em nosso estudo, a deficiência de Fe acarretou na diminuição da secreção de IL-6 (Figura 5 A) e TNF (Figura 5 C) pelas células peritoneais infectados *in vitro* com *M. leprae*. Nessa condição de cultura a produção de IL-6 foi menor em relação a dieta padrão (p 0,01). Já a secreção de TNF das células peritoneais totais provenientes da deficiência de Fe estimulados com *M. leprae* foi menor e relação a dieta padrão (p 0,0007) e suplementada de Fe (p 0,009).

Não foram detectados níveis expressivos de IL-10 nas culturas controles e com estímulo de *M. leprae* (Figura 5 B), e somente em pequenas quantidades na presença de LPS. Entretanto, os níveis de IL-10 no estímulo com LPS foram significativamente diferentes entre as dietas com suplementação e deficiência (p 0,049), sendo que a deficiência de Fe inibiu a secreção dessa citocina.

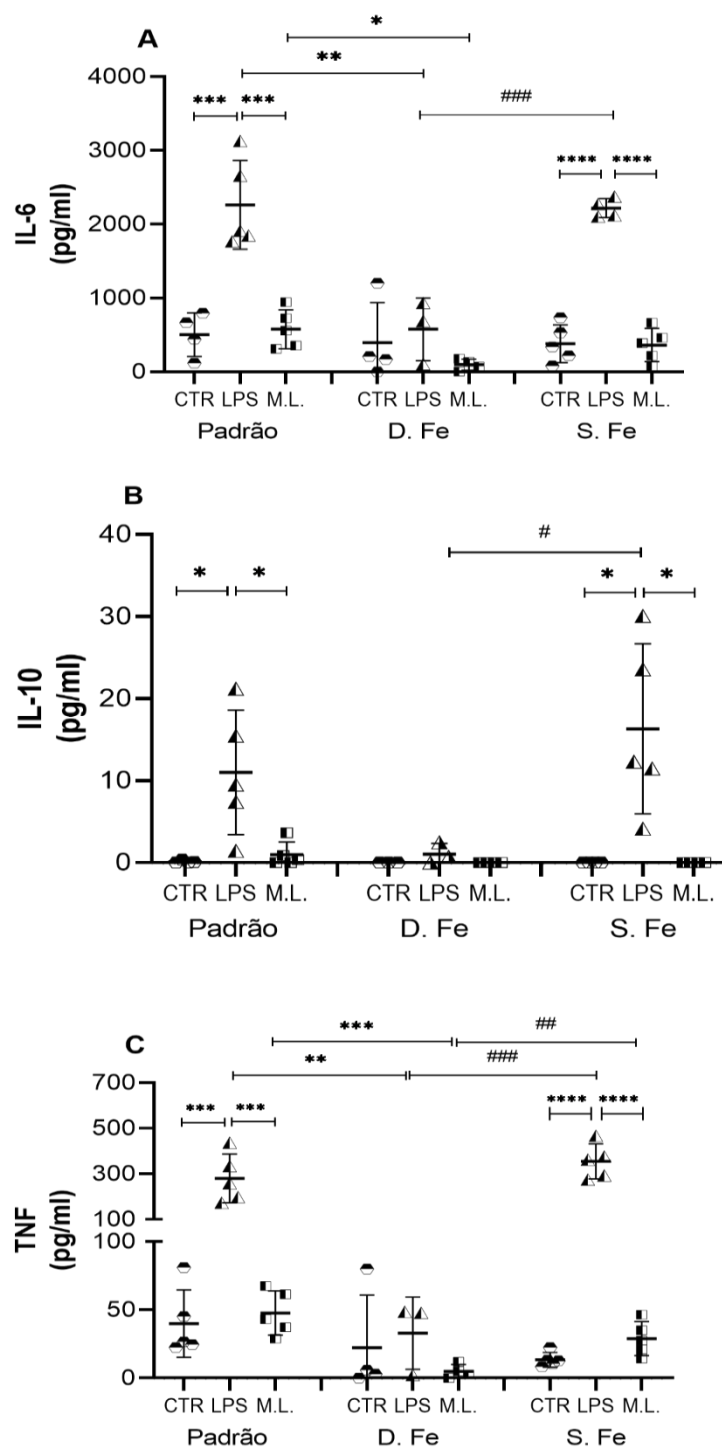


Figura 5 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos com diferentes condições dietéticas de ferro e estimulados *in vitro* com *M. leprae*. Os macrófagos peritoneais foram recuperados de camundongos com dieta padrão, deficiente ou suplementada de ferro e estimulados com *M. leprae* ou LPS e não estimulados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ representam diferença estatística por ANOVA. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; representam diferença estatística por Teste t. D. Fe: deficiente de ferro, S. Fe: suplementado de ferro, M.L.: *Mycobacterium leprae*, CTR: controle, LPS: lipopolissacarídeo

4.1.1.2 Cultura de esplenócitos

4.1.1.2.1 Ensaio de proliferação celular

Os esplenócitos obtidos de camundongos com dieta suplementada ou deficiente de Fe apresentaram o mesmo nível de resposta proliferativa dos esplenócitos da dieta padrão quando estimulados por *ConA* ou antígeno sonicado de *M. leprae* (Figura 6).

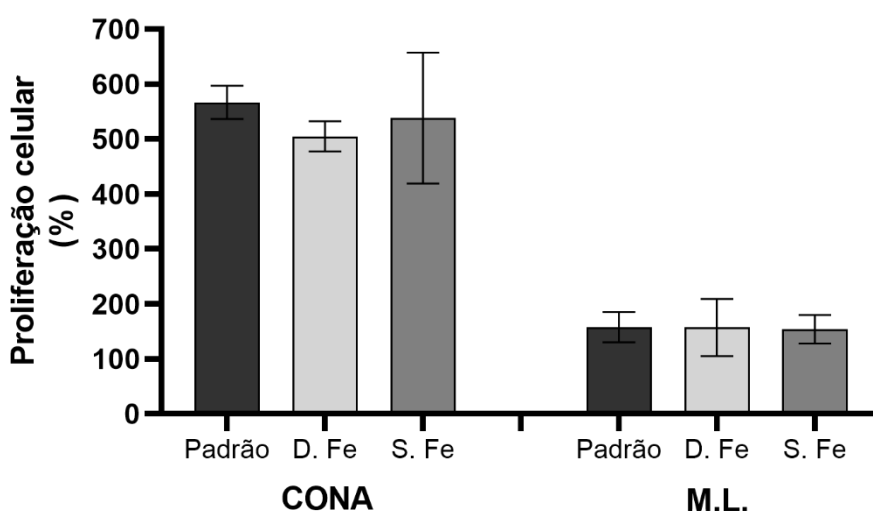


Figura 6 - Proliferação de esplenócitos obtidos de camundongos com dieta modificada de ferro ou padrão. Esplenócitos estimulados *in vitro* com *ConA* e antígeno sonicado de *M. leprae* por 72 horas. A porcentagem de proliferação para cada dieta foi calculada assumindo a média da absorbância dos esplenócitos sem estímulo como 100% de viabilidade celular. D. Fe: deficiente de ferro; S. Fe: suplementado de ferro., M.L.: antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae*; CONA: concanavalina A

4.1.1.2.2 Produção de citocinas

A Figura 7 mostra os níveis de secreção de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-10 e IL-17 pelos esplenócitos obtidos dos camundongos submetidos a suplementação ou deficiência de Fe.

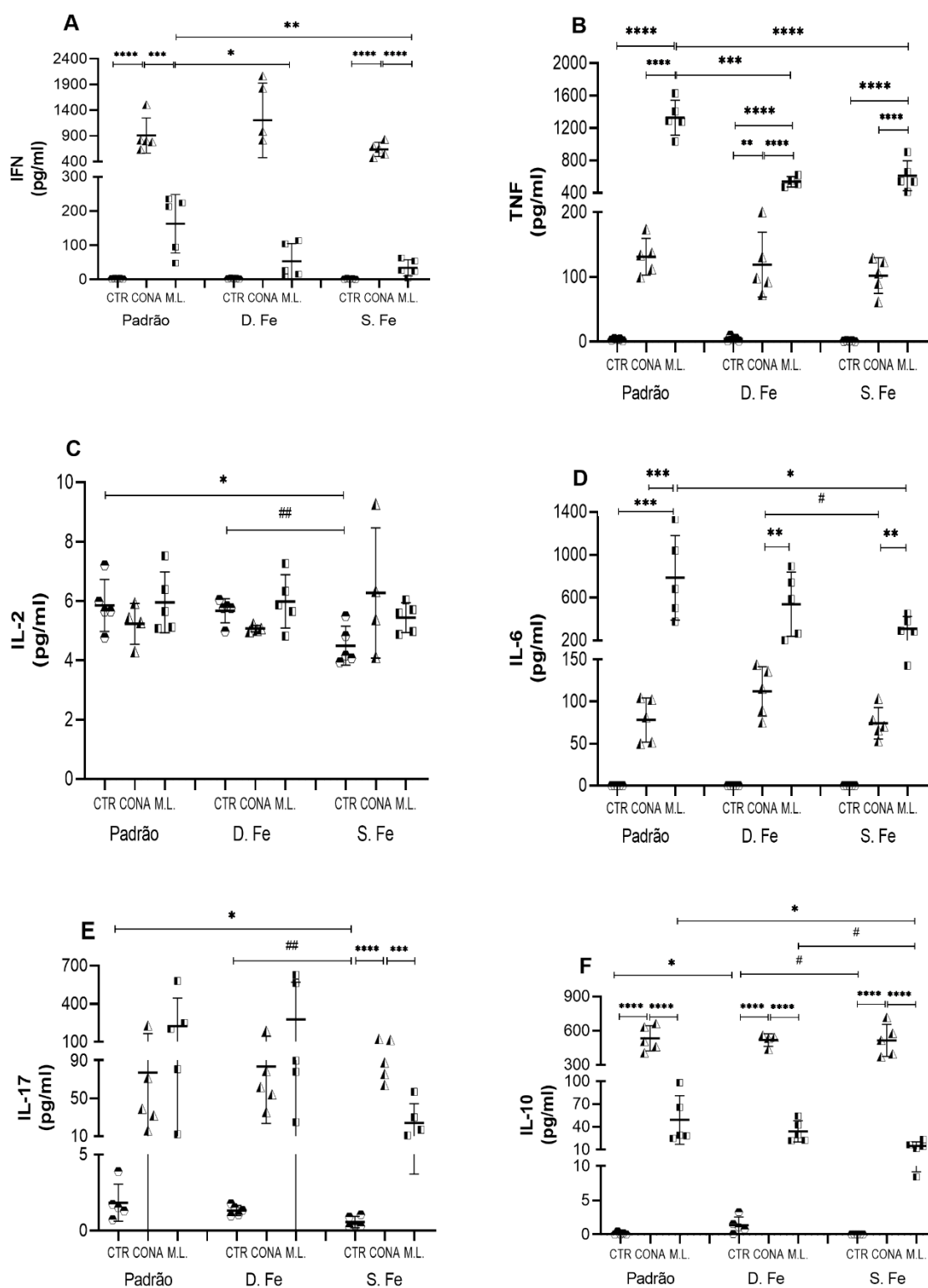


Figura 7 - Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com diferentes condições dietéticas de ferro e estimulados *in vitro* com antígenos sonicated de *M. leprae*. Os esplenócitos foram recuperados de camundongos com dieta padrão, deficiente ou suplementada de ferro. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ representam diferença estatística por ANOVA. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; representam diferença estatística por Teste t. D. Fe: deficiente de ferro, S. Fe: suplementado de ferro, M.L.: antígeno sonicated de *Mycobacterium leprae*, CTR: controle, CONA: concanavalina A

A produção de IFN- γ (Figura 7 A) e TNF (Figura 7 B) pelos esplenócitos estimulados com antígeno sonicado de *M. leprae* foram significativamente diferentes entre as dietas avaliadas pelo nosso estudo. Nessa condição de estímulo, houve diminuição da produção de IFN- γ tanto na suplementação quanto na deficiência de Fe em relação ao nível de secreção obtidos dos esplenócitos da dieta padrão (p 0,009 e p 0,02, respectivamente). Esse mesmo perfil de redução foi observado para o TNF quando comparamos as variações do teor de Fe com a dieta padrão (p <0,0001).

Nas culturas de esplenócitos estimuladas com *M. leprae*, observamos também que diante da suplementação de Fe houve redução na produção de IL-6 (Figura 7 D) e IL-10 (Figura 7 F) em comparação com a dieta padrão (p 0,04 e p 0,03, respectivamente). Além disso, a suplementação com Fe foi associada a menores níveis de produção de IL-10 em comparação com sua restrição diante do estímulo específico com *M. leprae* (p 0,02).

A produção de IFN- γ , TNF e IL-10 pelos esplenócitos estimulados com *ConA* não sofreram influência das diferentes condições de dieta, apenas a produção de IL-6 foi reduzida diante da suplementação de Fe nesse estímulo.

A produção de IL-2 foi baixa em todas as condições de cultura ou dietas, sendo que apenas para as culturas não estimuladas houve diferença estatística (Figura 7 C). Nestas a suplementação de Fe diminuiu a secreção de IL-2 em relação a dieta padrão (p 0,01), assim como em relação a dieta deficiente de Fe (p 0,009).

Em relação aos níveis de secreção de IL-17A (Figura 7 E), na cultura controle os esplenócitos de animais que receberam dieta suplementada com Fe produziram menor nível de IL-17A quando comparado à dieta padrão (p 0,03) e à dieta com restrição de Fe (p 0,009). Apesar dos estímulos com *ConA* e *M. leprae* terem induzido maiores produções dessa citocina em relação a cultura controle não houve diferença estatística entre as diferentes dietas.

A produção de IL-4 ocorreu somente quando os esplenócitos foram estimulados com *ConA* e nenhuma diferença estatística foi detectada entre as diferentes dietas (dados não mostrados).

4.1.2 Avaliação *in vivo*

4.1.2.1 Níveis séricos de ferro

As dietas modificadas em teor de Fe produziram níveis significativamente diferentes nos níveis séricos desse metal em camundongos não infectados ($p < 0,001$), o que valida os efeitos esperados para essas dietas (Figura 8).

Os valores de Fe sérico obtidos com a dieta padrão e dieta deficiente de Fe entre os grupos infectados e não infectados mantiveram-se próximos. Contudo, os camundongos infectados que receberam a dieta suplementada por um período maior que os animais não infectados apresentaram níveis séricos de Fe significativamente reduzidos ($p < 0,02$).

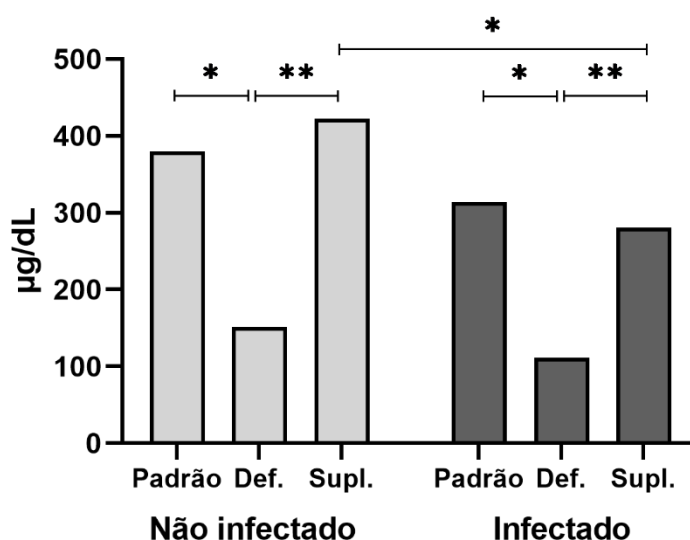


Figura 8 - Níveis séricos de ferro dos camundongos infectados e não infectados após dieta padrão ou com modificação do teor de ferro. Dosagem realizada por colorimetria. Valores expressos em µg/dL. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ representam diferença estatística por estatística por Teste t. Def.: deficiente de ferro, Supl.: suplementado de ferro.

4.1.2.2 Multiplicação de *M. leprae* em modelo murino

Em nosso estudo, a restrição de Fe foi associada com aumento da quantidade de *M. leprae* (Figura 9). Nesse grupo o valor médio de bacilos recuperados foi de $5,99 \times 10^5$, apresentando aumento em relação a suplementação de Fe ($p < 0,009$).

Além disso, observamos que a redução e suplementação de Fe não exibiram qualquer influência significativa sobre o número de bacilos recuperados em relação a dieta padrão.

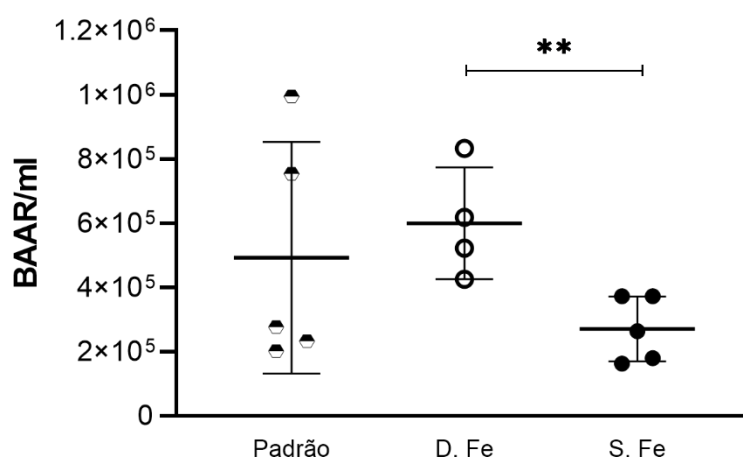


Figura 9 - Quantificação de *M. leprae* por baciloscopia após tratamento com dieta padrão ou modificada de ferro. O número de bacilos contados foram normalizados por mL de suspensão (BAAR/mL). ** $p < 0,01$ representam diferença estatística por Teste t. D. Fe: deficiente de ferro, S. Fe: suplementado de ferro.

4.1.2.3 Expressão gênica

Os mediadores imunológicos e do metabolismo do Fe aqui avaliados não apresentaram expressão diferencial entre as dietas restritivas e suplementadas de Fe (Figura 10).

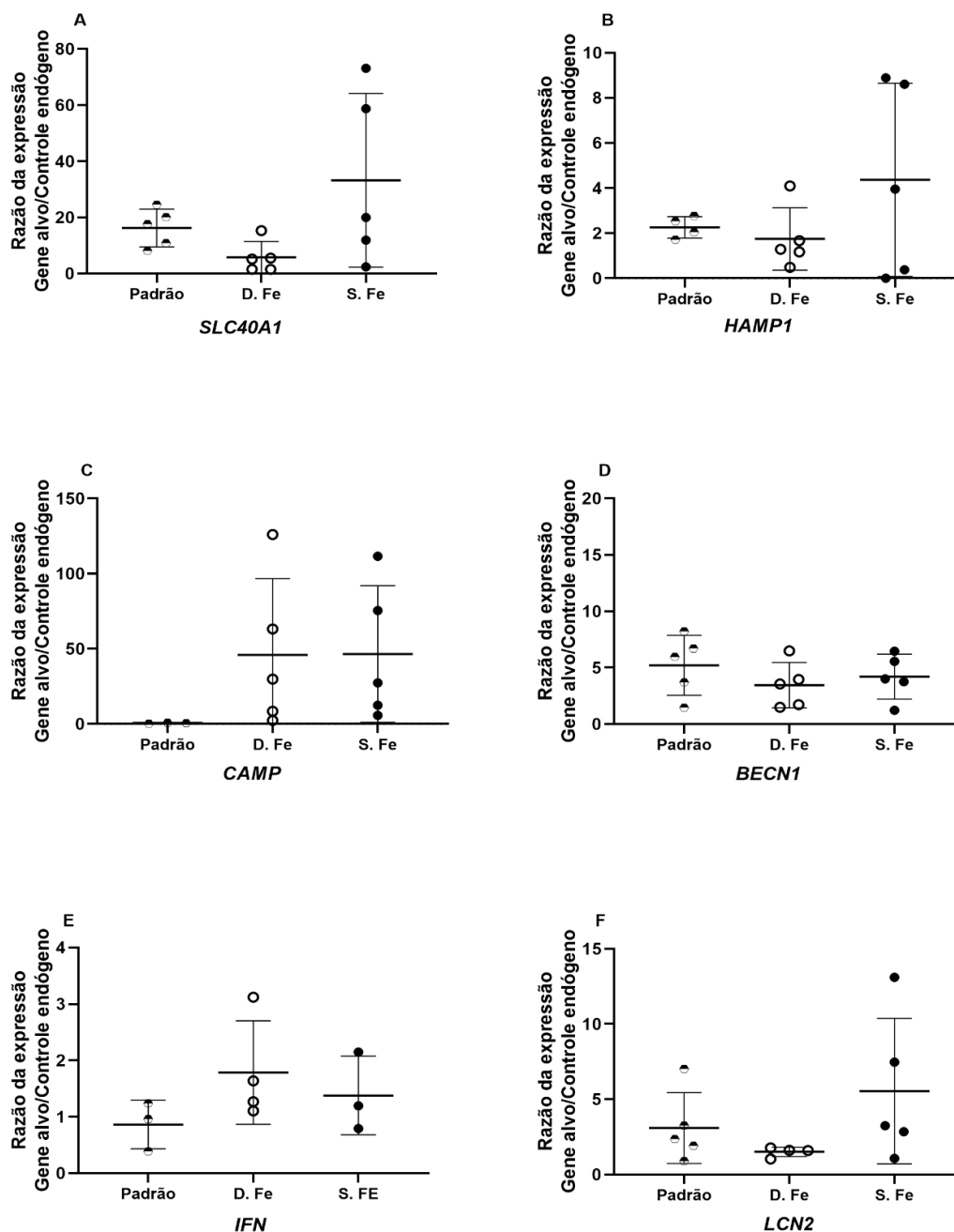


Figura 10 - Expressão gênica relativa em coxim plantar de camundongos com dietas modificadas de ferro. Expressão relativa calculada por método da curva padrão relativa usando como controle endógeno o gene da β -actina/ACTB. D. Fe: deficiente de ferro, S. Fe: suplementado de ferro

4.1.2.4 Expressão *in situ* por imuno-histoquímica

Na avaliação *in situ* dos mediadores do metabolismo do Fe e imunológicos, durante infecção por *M. leprae* verificamos que a suplementação de Fe elevou a expressão proteica de catelicidina em relação à dieta deficiente de Fe (p 0,033) (Figura 11 A). A análise estatística foi realizada após processo de digitalização e

desconvolução dos cortes microscópicos de cada condição experimental (Figura 12 A-D).

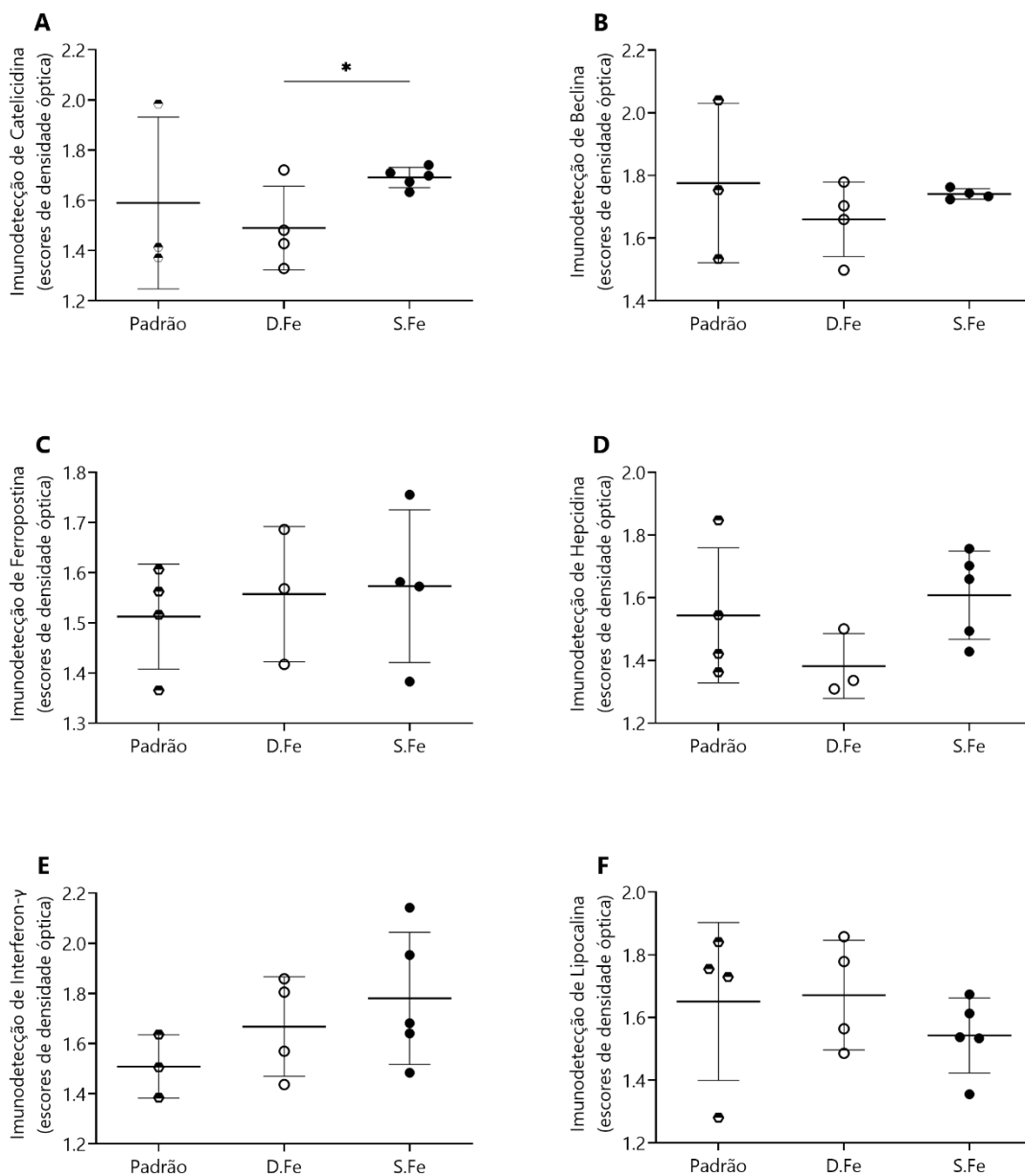


Figura 11 - Imunodeteção de mediadores do ferro e imunológicos em camundongos infectados por *M. leprae* e tratados com dietas modificadas de ferro. Resultados obtidos de coxins plantares de camundongos BALB/c submetidos variações de dieta: padrão, deficiente ou suplementada de ferro, e infectados com *M. leprae* pela técnica de Shepard. Dados imunohistoquímicos expressos por escores de densidade óptica, calculados no programa ImageJ 1.53a (NIH, USA). Valores de $p \leq 0,05$ (*) representam diferenças estatísticas. Análise estatística por teste t não pareado. D.Fe: deficiente de ferro, S.Fe: suplementado de ferro

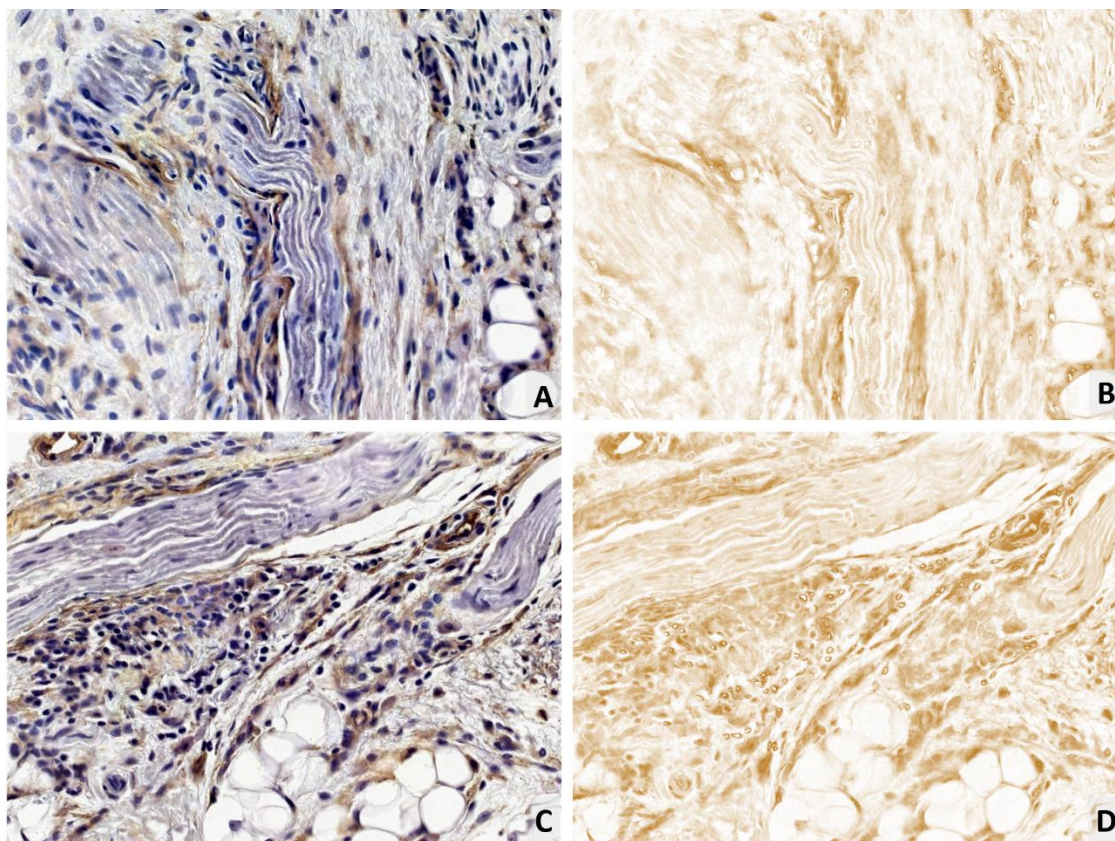


Figura 12 - Fotomicrografia da expressão proteica de catelicidina em camundongos infectados com *M. leprae* com diferentes condições dietéticas de ferro. Reação imunohistoquímica para o anticorpo anti-Cathelicidin (Abcam 207758), em coxins plantares de camundongos BALB/c infectados com *M. leprae*. Animais submetidos à dieta com deficiência (A, B) ou suplementação (C, D) de ferro. Cortes microscópicos marcados por diaminobenzidina (Liquid DAB+, Dako Agilent, USA) e contracolorados com Hematoxilina de Harris (A-C). A avaliação dos escores de densidade óptica foram conduzidas nas imagens desconvolúdas de DAB em cada espécime (B-D), no programa ImageJ 1.53a (NIH, USA). Imagens representativas de 3-5 animais por condição experimental. Aumento: 400 x

4.2 Avaliação dos efeitos das dietas modificadas em teor de vitamina D

4.2.1 Avaliação *in vitro*

4.2.1.1 Cultura de macrófagos peritoneais

4.2.1.1.1 Produção de IL-10, IL-6 e TNF

A Figura 13 mostra a inibição na secreção de IL-6, TNF e IL-10 pelos macrófagos peritoneais dos camundongos submetidos a suplementação de VTD

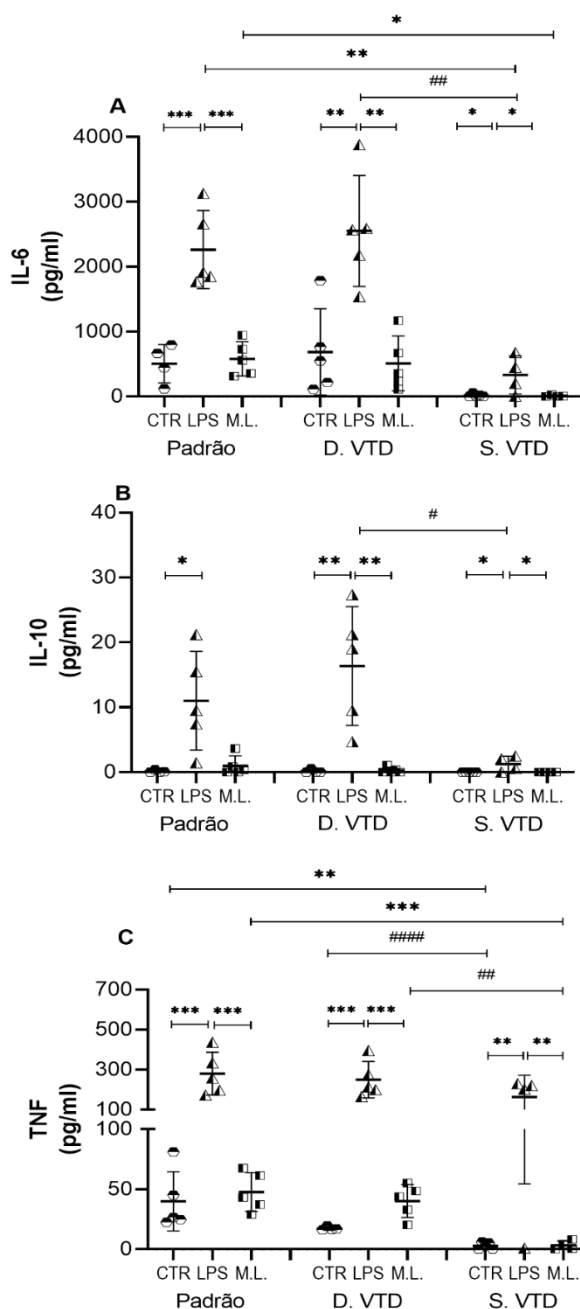


Figura 13 - Produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos com diferentes condições dietéticas de vitamina D e estimulados *in vitro* com *M. leprae*. Os macrófagos peritoneais foram recuperados de camundongos com dieta padrão, deficiente ou suplementada de vitamina D e estimulados com *M. leprae* ou LPS e não estimulados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representam diferença estatística por ANOVA ou Kruskal-Wallis. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; #### $p < 0,0001$ representam diferença estatística por Teste t ou Mann-Whitney. D. VTD: deficiente de vitamina D, S. VTD: suplementado de vitamina D, M.L. *Mycobacterium leprae*, CTR: controle, LPS: lipopolissacarídeo

Com relação a IL-6 (Figura 13 A), pudemos observar que no estímulo com *M. leprae* a suplementação de VTD diminuiu significativamente a secreção desta citocina em comparação com a dieta padrão ($p = 0,02$). Esse mesmo perfil foi observado para o

estímulo com LPS em comparação com as dietas deficiente de VTD (p 0,001) e padrão (p 0,001).

No mesmo sentido, a produção de TNF nos macrófagos estimulados com *M. leprae* (Figura 13 C) foi menor na condição de suplementação de VTD em comparação com a dieta padrão (p 0,0007) e deficiente de VTD (p < 0,001).

A produção de IL-10 pelos macrófagos foi detectada apenas nas culturas estimuladas com LPS (Figura 13 B), onde a suplementação de VTD também exibiu efeito redutor na produção dessa citocina (p 0,01) em relação à restrição.

4.2.2 Cultura de esplenócitos

4.2.2.1.1 Ensaio de proliferação celular

A modificação da dieta de VTD influenciou a resposta proliferativa dos esplenócitos *in vitro* apenas quando estimulados por ConA (Figura 14). Nessa condição, a deficiência de VTD induziu uma resposta proliferativa menor dos esplenócitos quando comparada à dieta suplementada de VTD (p 0,0009) e à dieta padrão (p 0,01).

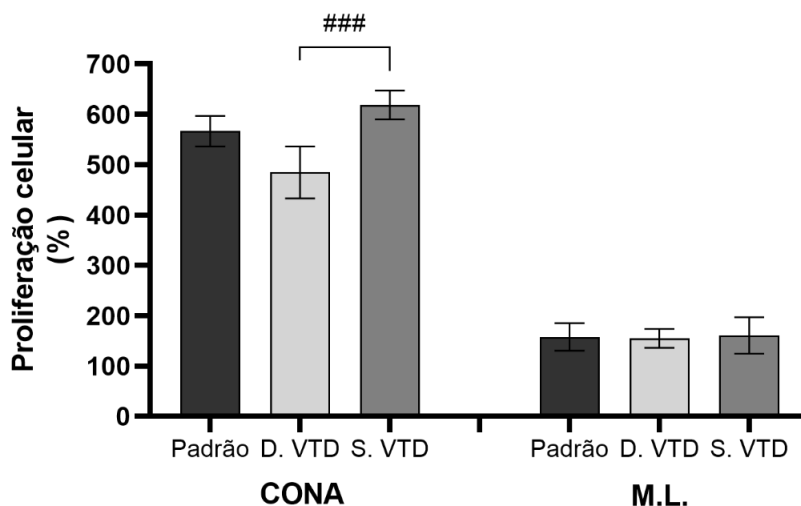


Figura 14 - Proliferação de esplenócitos obtidos de camundongos com dieta modificada de vitamina D ou padrão. Esplenócitos estimulados *in vitro* com ConA e antígeno sonicado de *M. leprae* por 72 horas. A porcentagem de proliferação para cada dieta foi calculada assumindo a média da absorbância dos esplenócitos sem estímulo como 100% de viabilidade celular. ### p <0,0001 representa diferença estatística por Teste t. D. VTD: deficiente de vitamina D; S. VTD: suplementado de vitamina D., M.L.: antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae*; CONA: concanavalina A

4.2.2.1.2 Produção de citocinas

A produção de citocinas pelos esplenócitos submetidos a condição de suplementação ou restrição de VTD *in vivo* quando estimulados por ConA ou *M. leprae* *in vitro* apresentaram diminuição na produção das citocinas avaliadas em nosso estudo (Figura 15).

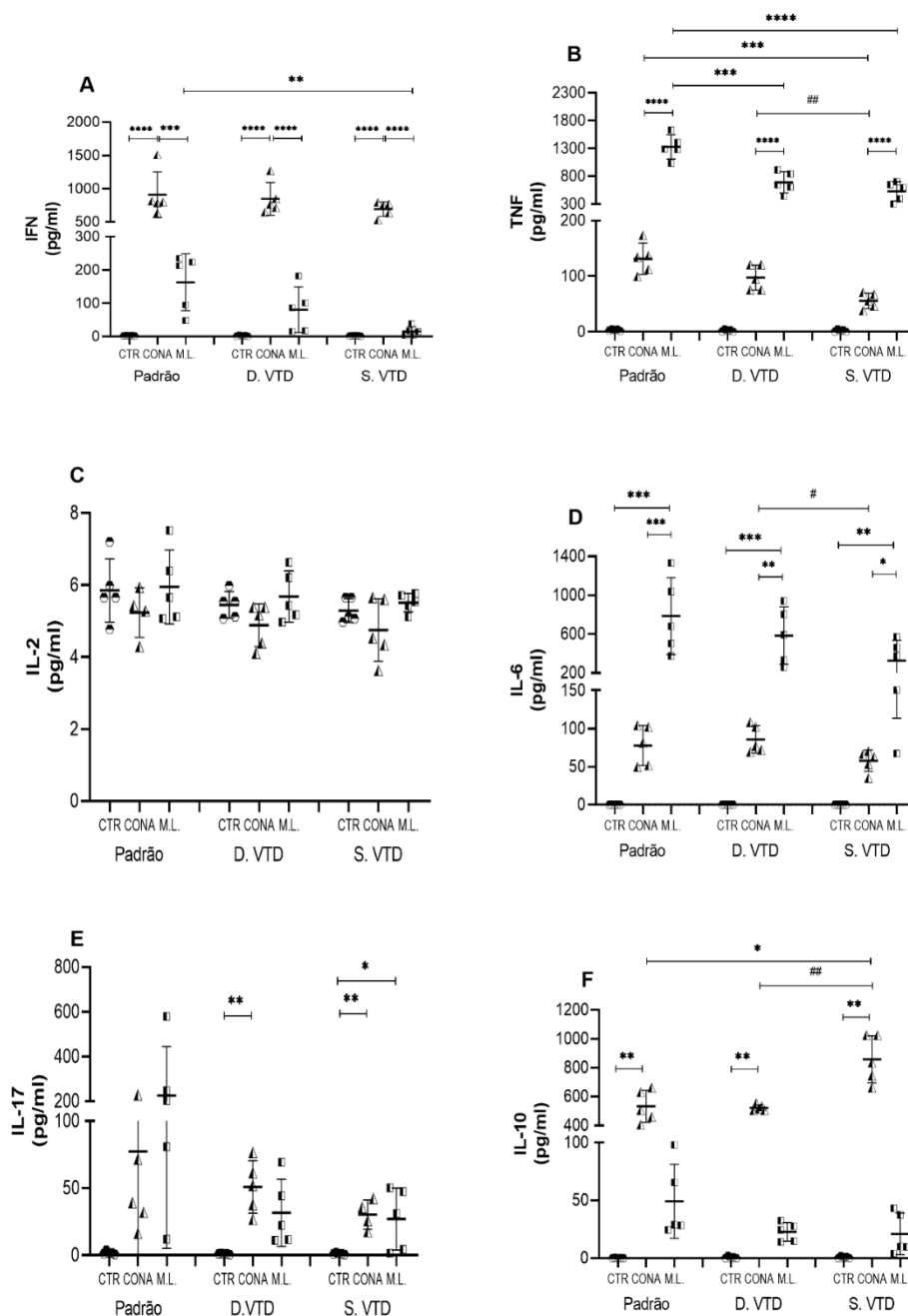


Figura 15 - Produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com diferentes condições dietéticas de vitamina D e estimulados *in vitro* com antígenos sonicated de *M. leprae*. Os esplenócitos foram recuperados de camundongos com dieta padrão, deficiente ou suplementada de vitamina D. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ representam diferença estatística por ANOVA ou Kruskal-Wallis. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ representam diferença estatística por Teste t ou Mann-Whitney. D. Fe: deficiente de ferro, S. Fe: suplementado de ferro, M.L. antígeno sonicated de *Mycobacterium leprae*, CTR: controle, CONA: concanavalina A

Em comparação com a dieta padrão a suplementação de VTD diminuiu significativamente a produção de IFN- γ (Figura 15 A) e TNF (Figura 15 B) nas culturas de esplenócitos estimuladas com antígeno sonicado de *M. leprae* (p 0,006 e p <0,0001, respectivamente). Para o TNF essa redução em relação a dieta padrão também foi observada para deficiência (p 0,0004).

Os níveis de secreção de IL-10 para o estímulo com *M. leprae* foram reduzidos de forma significativa em relação a *ConA* em todas as dietas (Figura 15 F).

Os esplenócitos estimulados com *M. leprae* apresentaram maior produção de IL-6 em comparação ao nível de produção dessa citocina quando estimulados com *ConA* (Figura 15 D). Essa redução foi observada na dieta padrão (p 0,001), deficiente (p 0,001) e suplementada de VTD (p 0,01).

Não foram observadas diferenças na produção de IL-17A para o estímulo com *M. leprae* (Figura 15 E).

As produções de IL-2 pelos esplenócitos foram baixas em todas as condições de cultura e não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 15 C).

4.2.3 Avaliação *in vivo*

4.2.3.1 Níveis séricos de vitamina D

Não foram detectados níveis de 25(OH)D nos grupos experimentais com dieta padrão e deficiente de VTD. A dosagem sérica de uma amostra testada de animal não infectado que recebeu suplementação de VTD foi de 18,3 ng/mL. Para 4 animais infectados que receberam essa dieta a média da dosagem sérica foi $3,6 \pm 2,65$ ng/mL.

4.2.3.2 Multiplicação de *M. leprae* em modelo murino

As dietas com redução ou suplementação de VTD não exibiram qualquer influência significativa sobre o número de bacilos recuperados em relação a dieta padrão (Figura 16). Também não encontramos diferença para esse parâmetro entre as dietas suplementada e deficiente de VTD.

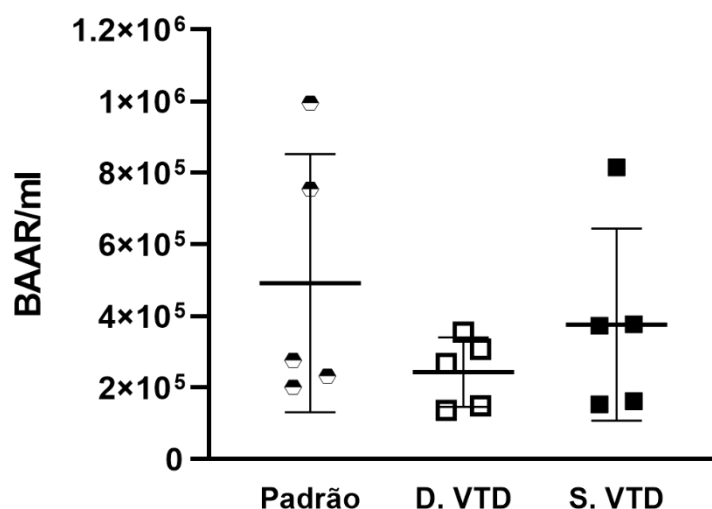


Figura 16 - Quantificação de *M. leprae* por baciloscopia após tratamento com dieta padrão ou modificada de vitamina D. O número de bacilos contados foram normalizados por mL de suspensão (BAAR/mL). D. VTD: deficiente de vitamina D, S. VTD: suplementado de vitamina D

4.2.3.3 Expressão gênica

Os níveis de mRNA para mediadores do metabolismo do Fe e sistema imunológico foram avaliados nos coxins plantares dos camundongos após infecção com *M. leprae* utilizando a β -actina como gene referência (Figura 17).

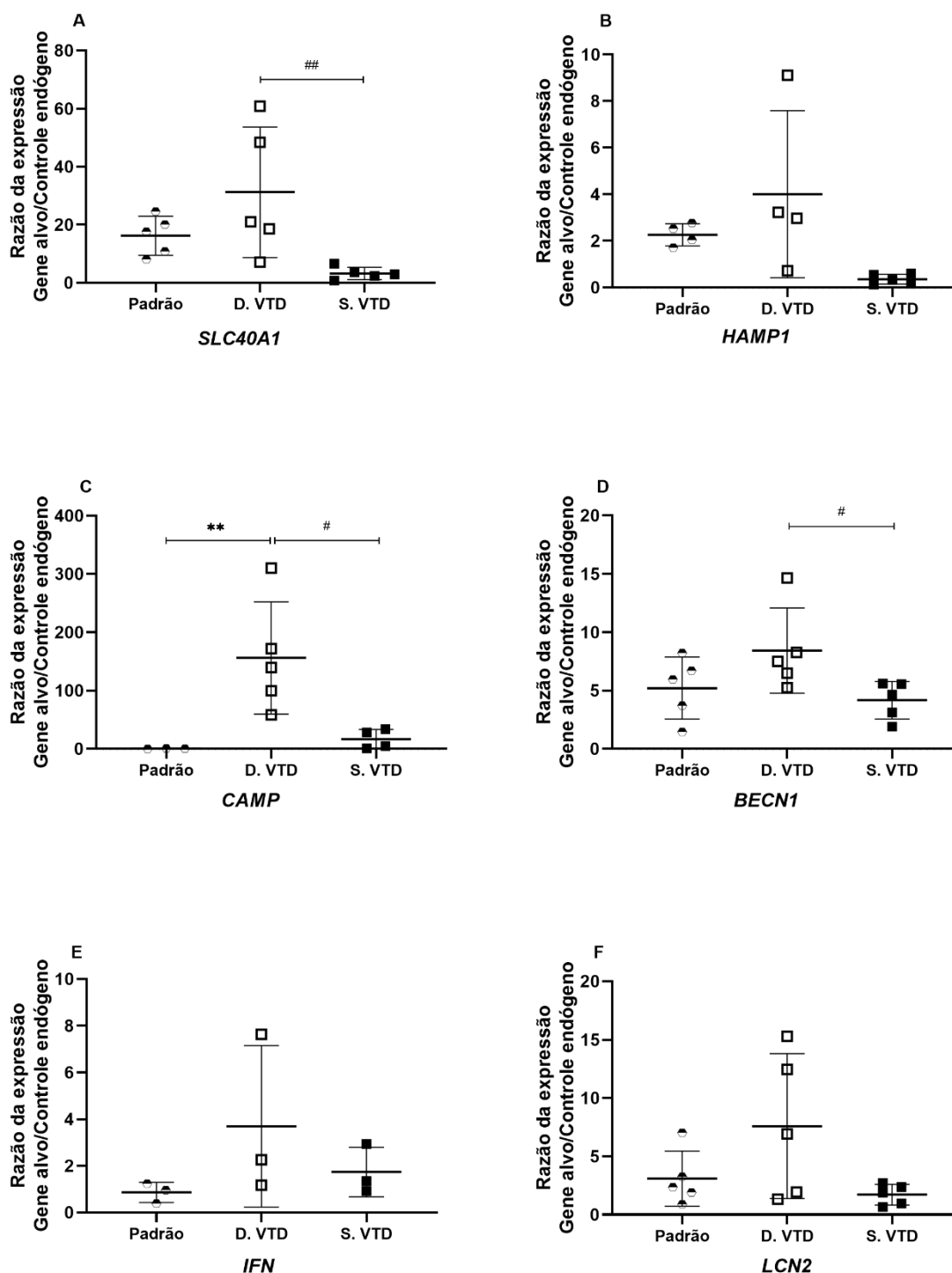


Figura 17 - Expressão gênica relativa em coxim plantar de camundongos com dietas modificadas de vitamina D. Expressão relativa calculada por método da curva padrão relativa usando como controle endógeno o gene da β -actina/ACTB. ** $p < 0,01$ representa diferença estatística por ANOVA. # $p < 0,05$; ## $p < 0,05$ representam diferença estatística por Teste t. D. VTD: deficiente de vitamina D, S. VTD: suplementado de vitamina D

Na expressão gênica dos mediadores do metabolismo do Fe observamos que a expressão do gene *SLC40A1* (Figura 17 A) foi reduzida com a suplementação de VTD em relação a dieta com restrição ($p 0,02$).

A suplementação de VTD, embora não significativa, também refletiu em tendência de menor expressão de *HAMP1* em relação à sua restrição (p 0,05) (Figura 17 B).

De forma similar para os parâmetros do metabolismo da VTD, os genes *CAMP* (Figura 17 C) e *BECN1* (Figura 17 D) foram significativamente menos expressos na condição de suplementação quando comparados à deficiência dessa vitamina (p 0,02 e p 0,04, respectivamente). Para a expressão de *CAMP* a redução também foi observada para a dieta padrão em relação à deficiência (p 0,01).

Não foram observadas expressões diferenciais de *IFNG* (Figura 17 E) ou *LCN2* (Figura 17 F) induzidos pela VTD.

4.2.3.4 Expressão *in situ* por imuno-histoquímica

A Figura 18 mostra a expressão proteica *in situ* dos mediadores do metabolismo do Fe e dos mediadores imunológicos no coxim plantar dos camundongos infectados com *M. leprae*. Em relação a VTD, verificamos uma redução significativa de catelicidina no grupo suplementado de VTD, comparado ao grupo deficiente (p 0,007) (Figura 18 A). A análise estatística foi realizada após processo de digitalização e desconvolução dos cortes microscópicos de cada condição experimental (Figura 19 A-D).

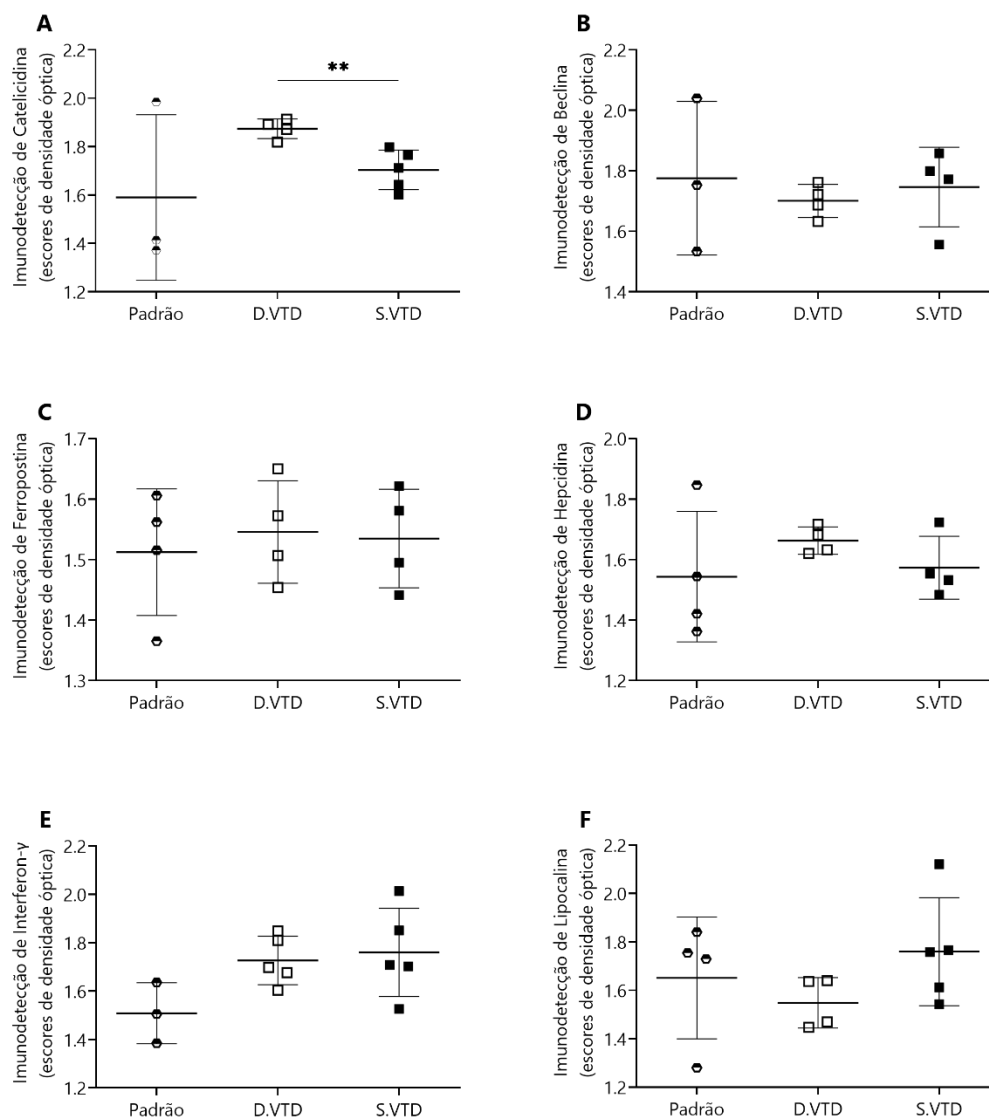


Figura 18 - Imunodeteção de mediadores do ferro e imunológicos em camundongos infectados por *M. leprae* e tratados com dietas modificadas com vitamina D. Resultados obtidos de coxins plantares de camundongos BALB/c submetidos variações de dieta: padrão, deficiente ou suplementada de vitamina D, e infectados com *M. leprae* pela técnica de Shepard. Dados imuno-histoquímicos expressos por escores de densidade óptica, calculados no programa ImageJ 1.53a (NIH, USA). Valores de $p \leq 0,005$ (**) representam diferenças estatísticas. Análise estatística por teste t não pareado. D.VTD: deficiente de vitamina D, S.VTD: suplementado de vitamina D

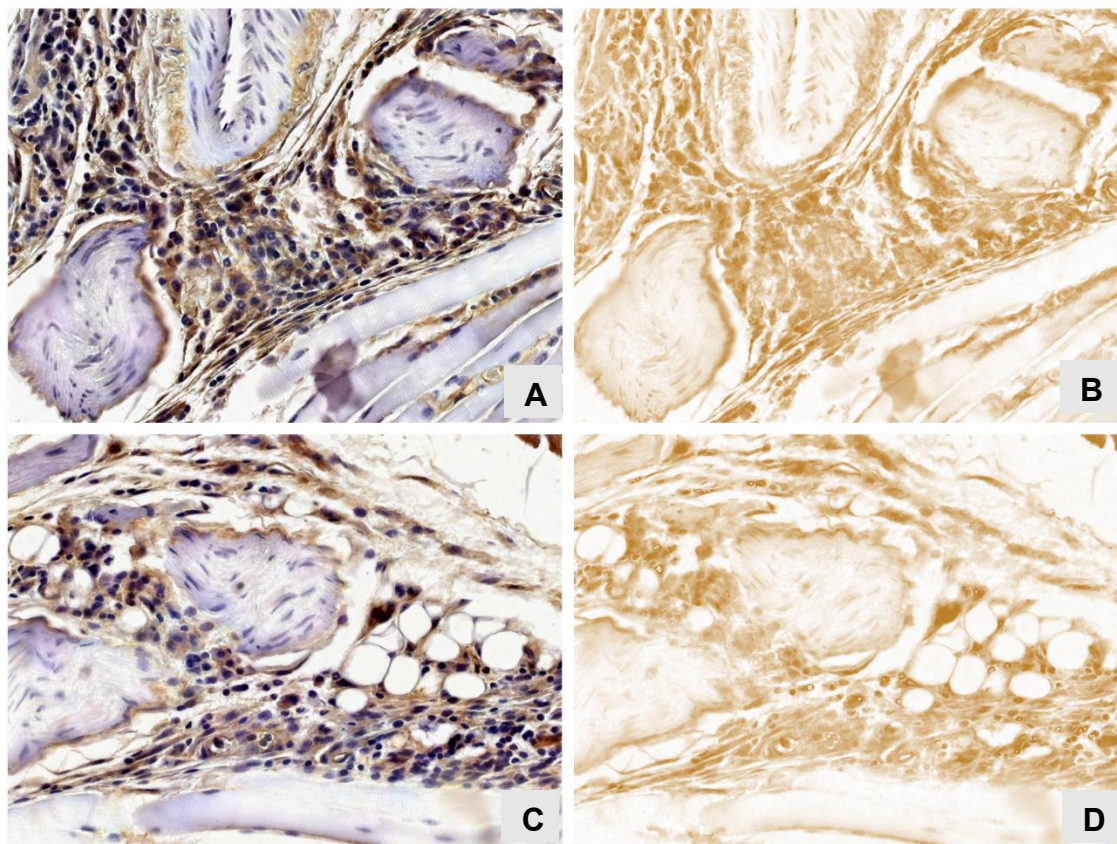


Figura 19 - Fotomicrografia da expressão proteica de catelicidina em camundongos infectados com *M. leprae* com diferentes condições dietéticas de vitamina D. Reação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-Cathelicidin (Abcam 207758), em coxins plantares de camundongos BALB/c infectados com *M. leprae*. Animais submetidos à dieta com deficiência (A, B) ou suplementação (C, D) de vitamina D. Cortes microscópicos marcados por diaminobenzidina (Liquid DAB+, Dako Agilent, USA) e contracolorados com Hematoxilina de Harris (A-C). A avaliação dos escores de densidade óptica foram conduzidas nas imagens desconvoluídas de DAB em cada espécime (B-D), no programa ImageJ 1.53a (NIH, USA). Imagens representativas de 3-5 animais por condição experimental. Aumento: 400 x

4.3 Correlações *in vivo*

Para as diferentes dietas empregadas em nosso estudo testamos as correlações entre a quantificação de *M. leprae* e as expressões gênicas e proteicas *in situ* de todos os mediadores aqui estudados.

4.3.1 Correlação entre multiplicação de *M. leprae* e expressão gênica

Observamos correlações negativas entre os resultados da baciloscopia com os níveis de expressão gênica da *SLC40A1* (p 0,01) para a dieta padrão (Figura 20).

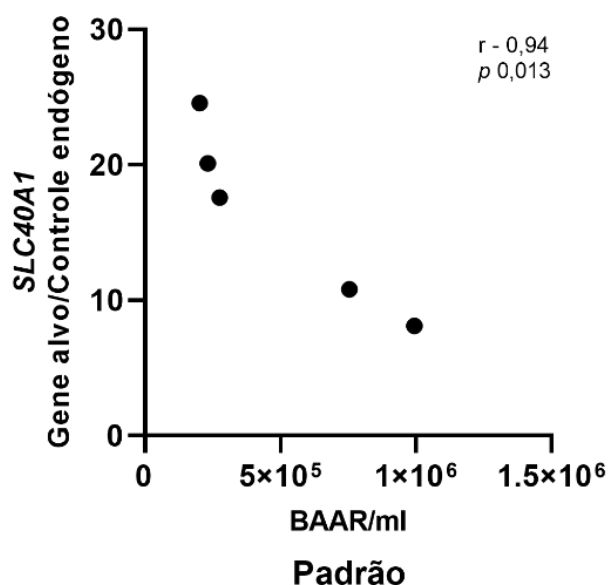


Figura 20 - Correlação entre os resultados de multiplicação de *M. leprae* e a expressão gênica da *SLC40A1*. Correlação de Spearman entre expressão gênica de *SLC40A1* e a baciloscopia de camundongos que receberam da dieta padrão. BAAR/mL: bacilo álcool ácido resistente por mL

4.3.2 Correlação entre multiplicação de *M. leprae* e expressão proteica

As análises de correlação mostraram correlação positiva entre o número de bacilos e a presença de catelicidina no coxim plantar dos camundongos que receberam dieta suplementada de Fe (p 0,03) (Figura 21).

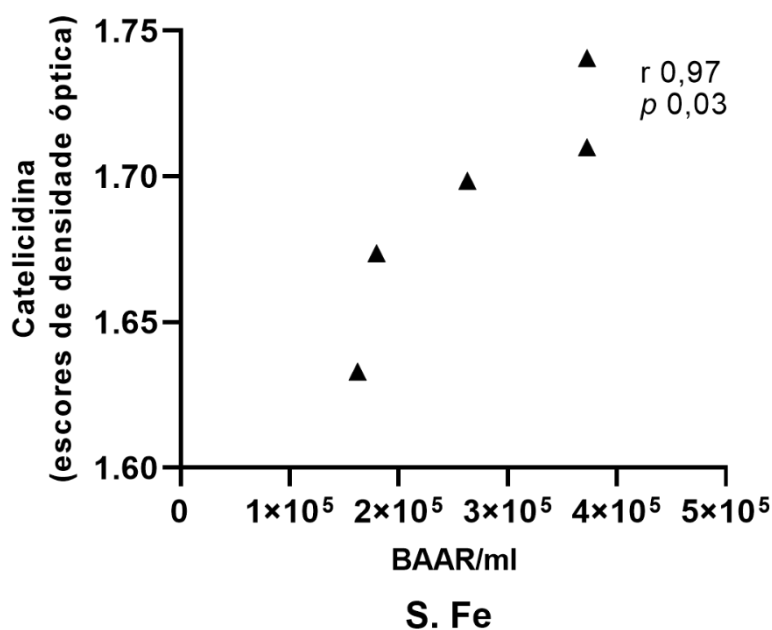


Figura 21 - Correlação entre os resultados de multiplicação de *M. leprae* e a expressão proteica *in situ* de catelicidina. Correlação de Spearman entre expressão proteica de catelicidina IFN- γ e a baciloscopia de camundongos que receberam dieta suplementada de ferro. BAAR/mL: bacilo álcool ácido resistente por mL, Fe: suplementado de Fe

5 DISCUSSÃO

As crescentes associações dos metabolismos do Fe e da VTD com a progressão de doenças, e sobre a resposta imunológica do hospedeiro, mostram a relevância da compreensão dos efeitos que os status de nutrientes têm sobre o desfecho de doenças infecciosas (45,90–92). Importante mencionar que, no contexto das doenças negligenciadas, como a hanseníase, essa compreensão deve tomar maior relevância.

De forma geral, nossos dados *in vitro* mostram que em macrófagos estimulados com *M. leprae* a suplementação com VTD e a restrição de Fe diminuíram as produções das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF. Em esplenócitos, tanto a suplementação quanto a restrição de VTD ou Fe diminuíram a produção de TNF. Ainda nestas células, o IFN- γ foi diminuído na suplementação de VTD, bem como na restrição ou suplementação de Fe. Por fim, a suplementação com Fe também diminuiu as produções das interleucinas 6 e 10.

Os efeitos *in vivo* da suplementação com Fe incluem a diminuição da replicação bacilar e o aumento da catelicidina *in situ*. Já a suplementação com VTD diminuiu as expressões gênicas de *SLC40A1*, *CAMP* e *BECN1* e diminuiu a expressão *in situ* da catelicidina, mas não alterou a multiplicação bacilar.

Os níveis séricos de Fe na condição de suplementação foram significativamente menores nos camundongos infectados, apontando um papel da infecção na hipoferremia. A menor replicação do *M. leprae* observada nessa dieta deve ser consequência de melhor imunidade nutricional decorrente do status de Fe no momento da infecção. Souza et al. (48) encontraram tendência de níveis séricos de Fe inferiores em pacientes MB. Oktaria et al. (93) relacionaram a anemia e a hipoferremia independente da presença de anemia como marcadores de prognóstico para a manifestação clínica da hanseníase. Harrington-Kandt *et al.* (94) não encontraram diferença na quantidade de *M. tuberculosis* em pulmão de camundongos deficientes em Fe e especulam que tal desfecho infeccioso possa ser resultado da alta eficiência dos mecanismos da micobactéria para sequestrar o Fe do hospedeiro.

O aumento da expressão *in situ* de catelicidina na suplementação de Fe suporta a redução da carga bacilar observada neste grupo, uma vez que esta proteína apresenta importante efeito microbicida (72,95,96). Baixos níveis séricos de catelicidina foram reportados em pacientes com hanseníase, sugerindo a importância desta proteína para o controle da replicação bacilar (97).

Nossos dados apontam tendência de maior expressão *in situ* de hepcidina no grupo que recebeu suplementação de Fe em relação a restrição (p 0,05), o que está alinhado a menor multiplicação bacilar observada neste grupo, e ao papel microbicida deste peptídeo (98). Por outro lado, este dado discorda da hipótese de que o aumento intracelular de Fe mediado pela hepcidina favoreça a multiplicação bacilar (48). Souza et al. (48) descreveram o quadro de anemia de inflamação em pacientes com hanseníase, com diminuições nos parâmetros hematológicos, aumento dos níveis séricos de ferritina, bem como níveis elevados de hepcidina na urina e a correlação positiva entre a expressão de hepcidina e o índice baciloscópio. Nosso estudo não avaliou parâmetros, como a ferritina, que permitam identificar anemia de inflamação. Nesse contexto, há que se considerar ainda que o modelo murino desenvolvido por Shepard (21) na década de 60 apresenta lesões localizadas, e, portanto, limitações como modelo experimental da doença quando consideramos o envolvimento sistêmico em humanos. Assim, não podemos descartar a hipótese de que o efeito microbicida da hepcidina na lesão prevaleceu em relação ao efeito deste peptídeo no quadro de anemia de doença crônica.

Encontramos uma correlação negativa entre a expressão gênica da ferroportina (*SLC40A1*) e o índice baciloscópio no grupo da dieta padrão ($r = -1$; p 0,01). Essa correlação também foi demonstrada por Souza et al. (48) em pacientes com hanseníase, com menor expressão de ferroportina em lesões MB. Johnson et al. (99) também demonstraram que a super expressão da ferroportina em macrófagos murinos foi acompanhada por inibição do crescimento intracelular de *M. tuberculosis* durante os estágios iniciais da infecção.

A maior produção de IL-6 e TNF em macrófagos de camundongos sob condição de suplementação de Fe corrobora com a menor replicação bacilar observada *in vivo* para esta dieta, uma vez que estas citocinas possuem papel pró-inflamatório restringindo o crescimento bacilar. Por outro lado, os baixos níveis de Fe alcançados pela dieta com restrição em camundongos infectados prejudicaram de forma significativa a resposta precoce dos macrófagos na infecção. Esse efeito da suplementação já foi descrito em estudos experimentais em malária (100).

A IL-10 é outra citocina com ação na regulação do Fe na inflamação atuando positivamente na indução de ferritina e no armazenamento de Fe nos macrófagos (90,101). Nossos experimentos *in vitro* demonstram menor secreção desta citocina pelos esplenócitos recuperados da dieta com suplementação de Fe estimulados com

M. leprae. Na hanseníase a IL-10 está associada a uma reposta de células T regulatórias no polo VV que contribui para a multiplicação do *M. leprae* (90,102). Assim, a menor produção de IL-10 pelos esplenócitos está alinhada aos dados observados para a menor replicação bacilar nesta dieta, bem como para a doença.

Em nosso estudo observamos que, tanto a suplementação quanto a deficiência de Fe resultaram na diminuição da produção de IFN- γ e TNF dos esplenócitos em relação a dieta padrão. A diminuição destas citocinas na restrição de Fe está de acordo com a maior replicação bacilar, bem como com as respostas dos macrófagos observadas para esta dieta. No entanto, as reduções destas citocinas observadas para a dieta suplementada foram inesperadas. Apesar da suplementação com Fe não ter produzido níveis séricos mais altos em relação a dieta padrão, o estoque do Fe na forma de ferritina não foi avaliado. Assim, é permitido supor que um aumento de Fe observado na suplementação tenha causado efeitos supressores sobre estas citocinas, como já descrito na literatura (103–105). A resposta prévia efetiva dos macrófagos pode explicar a menor carga bacilar observada na suplementação.

Nossos dados mostram que os macrófagos recuperados da dieta suplementada de VTD e estimulados com *M. leprae* exibiram níveis menores das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 em relação a restrição deste nutriente, apontando um efeito inibitório mediado pela suplementação na função inata dos macrófagos. Korf et al. (106) observaram que o pré-condicionamento de macrófagos com a forma ativa da VTD afeta o perfil inflamatório de macrófagos e interfere na produção de citocinas e quimiocinas. Os macrófagos peritoneais murinos foram pré-tratados *in vitro* com 1,25(OH)D por 48 horas antes da indução da resposta inflamatória com LPS resultando na redução dos mediadores inflamatórios IL-12, TNF- α e óxido nítrico sintase (iNOS) e na baixa expressão de mRNA de quimiocinas recrutadoras de células T. Zhang et al. (107) também observaram inibição da produção de IL-6 e TNF- α sobre monócitos humanos pré-tratados com 1,25(OH)D e 25(OH)D por 24 horas seguido de estimulação com LPS. Harishankar et al. (108) relataram o efeito de inibição sobre as citocinas IL-1 α , TNF- α , TNF- β , IL-17 e IL-23 mediado por 1,25(OH)D na presença de antígeno filtrado de *M. tuberculosis* em cultura de células mononucleares do sangue periférico de controles saudáveis e de pacientes com tuberculose pulmonar. Os autores discutem que diferentes mecanismos inibitórios podem estar envolvidos na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias pela 1,25(OH)D, como receptores Toll-like, e aumento da produção de IL-10 com

consequente diminuição da expressão de citocinas Th1 e Th17 (108). Os resultados aqui obtidos confirmam por meio de suplementação em dieta esses dados obtidos *in vitro*.

A IL-10 é uma citocina fortemente associada a tolerância imunológica e a VTD é um regulador positivo de sua produção (109). A maior produção de IL-10 na cultura de esplenócitos estimulados com *conA* após suplementação com VTD valida o caráter anti-inflamatório dessa vitamina neste estudo. No mesmo sentido, Yang et al. (110) observaram em seus experimentos que a suplementação com VTD *in vivo* refletiu no aumento da produção de IL-10 e redução de IFN- γ por linfócitos esplênicos murinos cultivados *in vitro* e estimulados com tuberculina.

Na imunidade adaptativa a VTD é um metabólito que não exerce efeito sobre linfócitos T virgens, mas exibe ações distintas nas subpopulações diferenciadas de células T. A forma ativa da VTD pode suprimir a produção de IFN- γ e IL-2 em Th1, IL-4 em Th2 e IL17A em Th17, além de regular positivamente a diferenciação de Tregs que mediam a supressão da atividade de macrófagos e produzem IL-10 e TGF- β (111,112). Essa modulação parece corresponder com os nossos resultados, uma vez que os esplenócitos recuperados da dieta com alta concentração de VTD exibiram menor produção de IFN- γ .

O efeito mais notável da VTD é sobre a imunidade inata, onde desempenha uma ação pró-inflamatória pela ativação de macrófagos via ligação direta da 25(OH)D ao VDR. Contudo, o efeito da VTD sobre os componentes da imunidade adaptativa modula negativamente a inflamação restringindo a ativação de linfócitos Th1 e estimulando a polarização de linfócitos Th2 e Tregs e suas citocinas (70,110). Assim, o efeito imunomodulador da VTD se estende para além da regulação de macrófagos, mediando a supressão de respostas inflamatórias excessivas consideradas prejudiciais ao organismo atuando também na balança de citocinas pró e anti-inflamatórias durante uma resposta ativa e aguda (108). Uma variedade de efeitos pró e anti-inflamatórios foram relatados para a VTD e, em especial, os estudos relacionados à inflamação e autoimunidade demonstram a atividade anti-inflamatória da VTD mediada, principalmente, pela sua forma ativa (1,25(OH)D) que reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias (111,113). Essa correlação negativa entre marcadores inflamatórios e VTD tem sido observada em pacientes com trauma agudo (114).

Diferentemente de outros estudos, não avaliamos a resposta inflamatória das células sob condições de suplementação e deficiência *in vitro* controlados por estímulos exógenos com precursores de VTD ou ativação dos VDRs com citocinas, mas sim a produção de citocinas das células imunes provenientes de animais em condições de restrição ou suplementação de VTD. Essa diferença no desenho experimental pode resultar em desfechos distintos e conflitantes acerca do papel da nutrição da VTD na hanseníase.

A hepcidina é regulada positivamente por sinais pró-inflamatórios, em particular pela IL-6 (115). Nossos dados *in vitro* mostraram menor produção de IL-6 por macrófagos oriundos da dieta suplementada em VTD. De forma alinhada, nossos dados *in vivo* apontam uma tendência para menor expressão de *HAMP* (p 0,05) nos camundongos com essa dieta. A supressão de hepcidina associada a suplementação de VTD tem sido sugerida por alguns estudos com diferentes condições (83,116–118). No entanto, a diminuição concomitante da expressão de *SLC40A1* na suplementação, bem como as não alterações das expressões *in situ* de hepcidina e ferroportina, podem sugerir que do ponto de vista funcional a expressão gênica de *HAMP* não teve efeito nessa dieta. O efeito da VTD e do VDR sobre a transcrição do gene *SLC40A1* não está descrito na literatura.

A expressão do gene *CAMP* e de catelicidina foram menores diante da suplementação de VTD (119). Em humanos, o gene *CAMP* é um alvo direto do VDR sendo regulado positivamente pela VTD. Em infecções a ativação deste receptor coordena sinais da imunidade inata para a produção de catelicidina por várias células, como queratinócitos, células epiteliais e macrófagos. Todavia, em camundongos a região promotora do gene *CAMP* não apresenta o VDRE, diminuindo o efeito positivo da suplementação com VTD sobre esta proteína. Assim, o efeito observado da restrição de VTD sobre a catelicidina na infecção pelo *M. leprae* deve ter sido indireto. A produção de catelicidina estimulada por patógenos, ativação de TLR e citocinas são exemplos de mecanismos independentes de VTD descritos na literatura (96,120).

A suplementação com VTD diminuiu a expressão de *BECN1* em nosso estudo. A beclina-1 é uma proteína autofágica de mamíferos envolvida no processo de morte celular e supressão tumoral e, assim como a catelicidina, a VTD pode estimular sua síntese em quadros infecciosos (95). Estudos em miocardite mostram que o tratamento com a forma ativa da VTD reduz a expressão da beclina-1 em camundongos e melhoram a disfunção da autofagia (121). Contrariamente, Wu et al.

(122) investigaram o efeito da VTD na infecção de *M. tuberculosis* em células THP-1 e observaram que redução significativa da expressão gênica e proteica relacionadas a autofagia e, após o tratamento com VTD, observaram aumento da expressão desses marcadores, incluindo a beclina-1. Uma correlação positiva entre as expressões de catelicidina e beclina-1 tem sido descrita, de forma que a redução de catelicidina observada na suplementação de VTD pode explicar o efeito sobre a expressão de *BECN1* (95,123,124).

A baixa taxa de detecção da VTD nas amostras de soro foi um fator limitante do estudo. Embora não exista um modelo validado sobre o nível adequado de vitamina D3 que pode ser utilizada nas formulações das rações murinas para induzir estados de deficiência ou suplementação de VTD, é válido supor que a suplementação adotada aumentou os níveis da VTD sérica uma vez que apenas para esta dieta os níveis foram detectados em todas as amostras testadas (125).

Nossos resultados demonstram que os status de Fe e VTD interferem na interação entre o hospedeiro e *M. leprae* e, conseqüentemente, apresentam potencial para interferir na progressão da hanseníase. Assim, os dados aqui obtidos colocam em evidência o impacto dos aspectos nutricionais sobre essa doença negligenciada, que afeta de forma importante as camadas mais pobres da população.

6 CONCLUSÕES

A restrição dietética de Fe tem um efeito anti-inflamatório em macrófagos estimulados *in vitro* com *M. leprae*;

A restrição e suplementação de Fe refletiu na menor produção de IL-6 e IL-10 por esplenócitos estimulados *in vitro* com antígenos sonicados de *M. leprae*;

Tanto a suplementação quanto a restrição de Fe refletiram na menor produção *in vitro* de TNF e IFN- γ por esplenócitos estimulados *in vitro* com antígenos sonicados de *M. leprae*;

A suplementação com Fe não aumentou significativamente os níveis séricos deste oligoelemento em animais infectados como para os animais não infectados;

A dieta com restrição em Fe favoreceu a multiplicação do *M. leprae* em modelo experimental de Shepard;

A expressão *in situ* de catelicidina foi maior na suplementação de Fe em camundongos infectados com *M. leprae*;

A expressão *in situ* de catelicidina e o índice baciloscópio apresentaram correlação positiva na dieta com suplementação de Fe em modelo experimental de Shepard;

A suplementação dietética de VTD tem um efeito anti-inflamatório em macrófagos estimulados *in vitro* com *M. leprae*;

A suplementação com VTD diminuiu a produção de IFN- γ por esplenócitos estimulados com antígeno sonificado de *M. leprae*;

Tanto a suplementação quanto a restrição de VTD refletiram na menor produção *in vitro* de TNF por esplenócitos estimulados *in vitro* com antígenos sonicados de *M. leprae*;

As modificações do teor de VTD das dietas não exibiram qualquer influência na multiplicação do *M. leprae* em modelo experimental de Shepard;

A restrição de VTD aumentou *in vivo* a expressão dos genes *SLC40A1*, *CAMP* e *BECN1* em camundongos infectados com *M. leprae*;

A expressão *in situ* de catelicidina foi maior na condição deficiente de VTD em camundongos infectados com *M. leprae*.

7 REFERÊNCIAS

1. Mi Z, Liu H, Zhang F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Front Immunol*. 16 de abril de 2020;11:567.
2. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. Vol. 33, *Clinics in Dermatology*. Elsevier Inc.; 2015. p. 26–37.
3. Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, Dacso MM, Rao PN, Stryjewska BM, et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. Vol. 83, *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mosby Inc.; 2020. p. 1–14.
4. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* [Internet]. 1966;34(3):255–73. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5950347>
5. World Health Organization. Guide to eliminate leprosy as a public health problem [Internet]. Disponível em: www.who.int
6. Brasil. Ministério da Saúde. Guia prático sobre a hanseníase. 2017.
7. Vieira MCA, Nery JS, Paixão ES, Freitas de Andrade KV, Oliveira Penna G, Teixeira MG. Leprosy in children under 15 years of age in Brazil: A systematic review of the literature. *PLoS Negl Trop Dis*. outubro de 2018;12(10):e0006788.
8. Eichelmann K, González SEG. Leprosy . An Update : Definition , Pathogenesis , Classification , Diagnosis , and Treatment. *Actas Dermosifiliog*. 2013;104(7):554–63.
9. White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):80–94.
10. Lastória JC, de Abreu MAMM. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):205–18.
11. Ebenezer GJ, Scollard DM. Treatment and Evaluation Advances in Leprosy Neuropathy. Vol. 18, *Neurotherapeutics*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 2337–50.
12. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy.
13. Alemu Belachew W, Naafs B. Position statement: LEPROSY: Diagnosis, treatment and follow-up. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1º de julho de 2019;33(7):1205–13.
14. Situation de la lèpre (maladie de Hansen) dans le monde, 2021: vers l'interruption de la transmission [Internet]. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>;

15. Avanzi C, Singh P, Truman RW, Suffys PN. Molecular epidemiology of leprosy: An update. Vol. 86, *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V.; 2020.
16. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. dezembro de 2008;130(6):856–64.
17. Han XY, Sizer KC, Velarde-Félix JS, Frias-Castro LO, Vargas-Ocampo F. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. *Int J Dermatol*. agosto de 2012;51(8):952–9.
18. Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae*'s evolution and environmental adaptation. Vol. 197, *Acta Tropica*. Elsevier B.V.; 2019.
19. Cole ST. The genome of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. março de 1994;62(1):122–5.
20. Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. Vol. 13, *Virulence*. Taylor and Francis Ltd.; 2022. p. 1985–2011.
21. Shepard CC. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. *J Exp Med* [Internet]. 1º de setembro de 1960;112(3):445–54. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867175>
22. Miyamoto Y, Mukai T, Matsuoka M, Kai M, Maeda Y, Makino M. Profiling of Intracellular Metabolites: An Approach to Understanding the Characteristic Physiology of *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis*. 1º de agosto de 2016;10(8).
23. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Vol. 19, *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. p. 338–81.
24. Cabral N, de Figueiredo V, Gandini M, de Souza CF, Medeiros RA, Lery LMS, et al. Modulation of the Response to *Mycobacterium leprae* and Pathogenesis of Leprosy. Vol. 13, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
25. de Souza VNB, Iyer AM, Lammas DA, Naafs B, Das PK. Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. *Clin Dermatol*. 1º de janeiro de 2016;34(1):82–95.

26. Froes LAR, Sotto MN, Trindade MAB. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. Vol. 97, *Anais Brasileiros de Dermatologia*. Elsevier Espana S.L.U; 2022. p. 338–47.
27. Govers C, Calder PC, Savelkoul HFJ, Albers R, van Neerven RJJ. Ingestion, Immunity, and Infection: Nutrition and Viral Respiratory Tract Infections. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
28. Gombart AF, Pierre A, Maggini S. A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*. 1º de janeiro de 2020;12(1).
29. Shao T, Verma HK, Pande B, Costanzo V, Ye W, Cai Y, et al. Physical Activity and Nutritional Influence on Immune Function: An Important Strategy to Improve Immunity and Health Status. Vol. 12, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
30. Kelliher JL, Brazel EB, Radin JN, Joya ES, Solórzano PKP, Neville SL, et al. Disruption of phosphate homeostasis sensitizes staphylococcus aureus to nutritional immunity. *Infect Immun*. 1º de junho de 2020;88(6).
31. Healy C, Munoz-Wolf N, Strydom J, Faherty L, Williams NC, Kenny S, et al. Nutritional immunity: the impact of metals on lung immune cells and the airway microbiome during chronic respiratory disease. Vol. 22, *Respiratory Research*. BioMed Central Ltd; 2021.
32. Kehl-Fie TE, Skaar EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. Vol. 14, *Current Opinion in Chemical Biology*. 2010. p. 218–24.
33. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 15 de fevereiro de 2008;319(5865):962–5.
34. Bartholomew M. James Lind's Treatise of the Scurvy (1753). *Postgrad Med J*. novembro de 2002;78(925):695–6.
35. Maggini S, Pierre A, Calder PC. Immune function and micronutrient requirements change over the life course. Vol. 10, *Nutrients*. MDPI AG; 2018.
36. Oliveira ALG de, Chaves AT, Menezes CAS, Guimarães NS, Bueno LL, Fujiwara RT, et al. Vitamin D receptor expression and hepcidin levels in the protection or severity of leprosy: a systematic review. *Microbes Infect*. 2017;19(6):311–22.

37. Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. Vol. 1866, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V.; 2019.
38. Venkataramani V. Iron Homeostasis and Metabolism: Two Sides of a Coin. Em: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer; 2021. p. 25–40.
39. Chifman J, Laubenbacher R, Torti S V. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2014;844:201–25.
40. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2014.
41. Ancy N, Ndrews CA. *DISORDERS OF IRON METABOLISM*. 1999.
42. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
43. Wang CY, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. Vol. 133, *Blood*. American Society of Hematology; 2019. p. 18–29.
44. Guida C, Altamura S, Klein FA, Galy B, Boutros M, Ulmer AJ, et al. A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. *Blood*. 2 de abril de 2015;125(14):2265–75.
45. Martins AC, Almeida JI, Lima IS, Kapitão AS, Gozzelino R. Iron Metabolism and the Inflammatory Response. *IUBMB Life*. 1º de junho de 2017;69(6):442–50.
46. Suchdev PS, Williams AM, Mei Z, Flores-Ayala R, Pasricha SR, Rogers LM, et al. Assessment of iron status in settings of inflammation: challenges and potential approaches. *Am J Clin Nutr [Internet]*. 2017;106:1626–59. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn>.
47. Michels K, Nemeth E, Ganz T, Mehrad B. Hecpidin and Host Defense against Infectious Diseases. Vol. 11, *PLoS Pathogens*. Public Library of Science; 2015.
48. Souza VNB de, Tatiana Salles de Souza Malaspina, Ana Paula Campanelli, Cássio Ghidella, Somei Ura, Dirceu Dalpino, et al. Increased hepcidin expression in multibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:183–9.
49. Scott CR, Lehmann CD, Lehmann CD. Iron should be restricted in acute infection.
50. Ratledge C. Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull [Internet]*. dezembro de 2007;28(4 Suppl):S515-23. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297890>

51. Barton JC, Acton RT. Hepcidin, iron, and bacterial infection. Em: Vitamins and Hormones. Academic Press Inc.; 2019. p. 223–42.
52. Li W, He J, Xie L, Chen T, Xie J. Comparative genomic insights into the biosynthesis and regulation of mycobacterial siderophores. Vol. 31, Cellular Physiology and Biochemistry. S. Karger AG; 2013. p. 1–13.
53. Dhungana S, Miller MJ, Dong L, Ratledge C, Crumbliss AL. Iron chelation properties of an extracellular siderophore exochelin mn. J Am Chem Soc. 25 de junho de 2003;125(25):7654–63.
54. Chao A, Sieminski PJ, Owens CP, Goulding CW. Iron Acquisition in Mycobacterium tuberculosis. Vol. 119, Chemical Reviews. American Chemical Society; 2019. p. 1193–220.
55. Patel K, Butala S, Khan T, Suvarna V, Sherje A, Dravyakar B. Mycobacterial siderophore: A review on chemistry and biology of siderophore and its potential as a target for tuberculosis. Vol. 157, European Journal of Medicinal Chemistry. Elsevier Masson SAS; 2018. p. 783–90.
56. Bazid HAS, Shoeib MA, Shoeib MM, Sharaf REA, Mosatafa MI, Abd El Gayed EM. Serum lipocalin-2 levels are decreased in patients with leprosy. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 8 de dezembro de 2022;0:1–5.
57. Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. 2017; Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816->
58. Bazid HAS, Shoeib MA, Shoeib MM, Sharaf REA, Mosatafa MI, Abd El Gayed EM. Serum lipocalin-2 levels are decreased in patients with leprosy. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 8 de dezembro de 2022;0:1–5.
59. Gomez MA, Li S, Tremblay ML, Olivier M. NRAMP-1 expression modulates protein-tyrosine phosphatase activity in macrophages: Impact on host cell signaling and functions. J Biol Chem. 2007;282(50):36190–8.
60. Brochado MJF, Gatti MFC, Zago MA, Roselino AM. Association of the solute carrier family 11 member 1 gene polymorphisms with susceptibility to leprosy in a Brazilian sample. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(2):101–5.
61. Pereira-Suárez AL, Alvarado-Navarro A, Barrietos-García JG, Estrada-Chávez C, Muñoz-Valle JF, Fafutis-Morris M. Differential expression of solute carrier family 11a member 1 and inducible nitric oxide synthase 2 in skin biopsies from leprosy patients. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2015;81(6):594–9.

62. Gangaidzo IT, Moyo VM, Mvundura E, Aggrey G, Murphree NL, Khumalo H, et al. Association of Pulmonary Tuberculosis with Increased Dietary Iron. *J Infect Dis.* 2001;184(7):936–9.
63. Lounis N, Truffot-Pernot C, Grosset J, Gordeuk VR, Boelaert JR. Iron and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Virol.* 2001;20(3):123–6.
64. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol.* 2019; 60(3): 237–44.
65. Sîrbe C, Rednic S, Grama A, Pop TL. An Update on the Effects of Vitamin D on the Immune System and Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(17): 9784.
66. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients.* 2013;5: 2502–21.
67. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: Modulator of the immune system. *Cur Opin Pharmacol.* 2010; 10(4): 482–96.
68. Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska K, et al. IFN- γ - and TNF-Independent Vitamin D-Inducible Human Suppression of Mycobacteria: The Role of Cathelicidin LL-37. *J Immunol.* 2007;178(11):7190–8.
69. Philip T. Liu, Steffen Stenger, Huiying Li, Linda Wenzel, Belinda H. Tan, Stephan R. Krutzik, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science (1979).* 2006;311(5768):1768–70.
70. Holick MF, Mazzei L, García Menéndez S, Martín Giménez VM, Al Anouti F, Manucha W. Genomic or Non-Genomic? A Question about the Pleiotropic Roles of Vitamin D in Inflammatory-Based Diseases. *Nutrients.* 2023;15(3):767.
71. Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids.* 2013; 78: 127–36.
72. Grossi de Oliveira AL, Chaves AT, Cardoso MS, Pinheiro GRG, Antunes DE, Grossi MA de F, et al. Reduced vitamin D receptor (VDR) and cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene expression contribute to the maintenance of inflammatory immune response in leprosy patients. *Microbes Infect.* 2022;24(6–7).
73. Hewison M. Vitamin D and immune function: An overview. *Proc Nutri Soc.* 2012;71(1):50–61.

74. Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart F, et al. Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol.* 2009;182(7):4289–95.
75. Liu PT. Toll-Like Receptor Triggering of. *Science* (1979). 2006;311:1770.
76. Chesney RW. Vitamin D and the Magic Mountain: The Anti-Infectious Role of the Vitamin. *J Pediat.* 2010;156(5):698–703.
77. Azevedo MDCS, Rosa PS, Soares CT, Fachin LRV, Baptista IMFD, Woods WJ, et al. Analysis of immune response markers in Jorge Lobo's disease lesions suggests the occurrence of mixed T helper responses with the dominance of regulatory T cell activity. *PLoS One.* 2015;10(12):1–17.
78. Mandal D, Reja AHH, Biswas N, Bhattacharyya P, Patra PK, Bhattacharya B. Vitamin D receptor expression levels determine the severity and complexity of disease progression among leprosy reaction patients. *New Microbes New Infect.* 2015;6:35–9.
79. Singh I, Lavania M, Pathak VK, Ahuja M, Turankar RP, Singh V, et al. VDR polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(11):e0006823.
80. Luong KVQ, Nguyen LTH. Role of the vitamin D in leprosy. *Am J Med Sci.* 2012.; 343(6): 471–82.
81. Araújo TG, Oliveira GP, Oliveira F de M, Neves AF, Mota STS, Goulart IMB, et al. A novel vitamin D receptor polymorphism associated with leprosy. *J Dermatol Sci.* 2018; 89: 301–4.
82. Silva CA, Fernandes DCRO, Braga ACO, Cavalcante GC, Sortica VA, Hutz MH, et al. Investigation of genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* (VDR and IL10 genes) in a population with a high level of substructure in the Brazilian Amazon region. *Int J Infect Dis.* 2020;98:447–53.
83. Bacchetta J, Zaritsky JJ, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Zavala K, et al. Suppression of iron-regulatory hepcidin by vitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(3):564–72.
84. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939–51.
85. Trombone APF, Pedrini SCB, Diório SM, Belone A de FF, Fachin LRV, do Nascimento DC, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain

- management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp*. 2014;(85):1–7.
86. Shepard CC, McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1968;36(1):78–82.
 87. Nogueira MRS, Latini ACP, Nogueira MES. The involvement of endothelial mediators in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(10):635–41.
 88. Ahmed S, Khan S, Qureshi MA, Bukhari U, Anis M, Mughal MN. Expressional variations of Kaiso: an association with pathological characteristics and field cancerization of OSCC. *BMC Cancer*. 2022;22(1):990.
 89. Seyed Jafari SM, Hunger RE. IHC Optical Density Score: A New Practical Method for Quantitative Immunohistochemistry Image Analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(1):e12–3.
 90. de Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BJ, da Paixão de Oliveira JA, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes Infect*. 2017;19(11):505–14.
 91. Kim EW, Teles RMB, Haile S, Liu PT, Modlin RL. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2 de julho de 2018;12(7).
 92. Fabri M, Stenger S, Shin DM, Yuk JM, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN- γ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med*. 2011;3(104).
 93. Oktaria S, Anfasa F, Menaldi SL, Bramono K, Nijsten TEC, Thio HB. Serum Interleukin 6 Level and Nutrition Status as Potential Predictors of Clinical Leprosy Development among Household Contacts in Endemic Areas. *Open Forum Infect Dis*. 2022;9(3).
 94. Harrington-Kandt R, Stylianou E, Eddowes LA, Lim PJ, Stockdale L, Pinpathomrat N, et al. Hepcidin deficiency and iron deficiency do not alter tuberculosis susceptibility in a murine *M. tb* infection model. *PLoS One*. 2018;13(1).
 95. Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Yang CS, Jin HS, Kim KK, et al. Vitamin D3 Induces Autophagy in Human Monocytes/Macrophages via Cathelicidin. *Cell Host Microbe*. 2009;6(3):231–43.

96. Santos JC, Silva-Gomes S, Silva JP, Gama M, Rosa G, Gallo RL, et al. Endogenous cathelicidin production limits inflammation and protective immunity to *Mycobacterium avium* in mice. *Immun Inflamm Dis*. 2014;2(1):1–12.
97. Matzner M, Al Samie AR, Winkler HM, Nemeth J, Grasnek A, Indra A, et al. Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. *Acta Trop*. 2011;117(1):56–9.
98. Verga Falzacappa MV, Muckenthaler MU. Hepcidin: Iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene*. 2005; 364: 37–44.
99. Johnson EE, Sandgren A, Cherayil BJ, Murray M, Wessling-Resnick M. Role of ferroportin in macrophage-mediated immunity. *Infect Immun*. 2010;78(12):5099–106.
100. Azcárate IG, Sánchez-Jaut S, Marín-García P, Linares M, Pérez-Benavente S, García-Sánchez M, et al. Iron supplementation in mouse expands cellular innate defences in spleen and defers lethal malaria infection. . *Biochim Biophys Acta Molr Basis Dis*. 2017;1863(12):3049–59.
101. Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol*. 2014; 5:152.
102. Azevedo M de CS, Marques H, Binelli LS, Malange MSV, Devides AC, Fachin LRV, et al. B lymphocytes deficiency results in altered immune response and increased susceptibility to *Mycobacterium leprae* in a murine leprosy model. *Cytokine*. 2023;165: 156184.
103. Nienaber A, Baumgartner J, Dolman RC, Ozturk M, Zandberg L, Hayford FEA, et al. Omega-3 Fatty Acid and Iron Supplementation Alone, but Not in Combination, Lower Inflammation and Anemia of Infection in *Mycobacterium tuberculosis-Infected Mice*. *Nutrients*. 2020;12(9): 2897.
104. Pu Y, Guo B, Liu D, Xiong H, Wang Y, Du H. Iron Supplementation Attenuates the Inflammatory Status of Anemic Piglets by Regulating Hepcidin. *Biol Trace Elem Res*. 2015;167(1):28–35.
105. Moon S, Kim M, Kim Y, Lee S. Supplementation with High or Low Iron Reduces Colitis Severity in an AOM/DSS Mouse Model. *Nutrients*. 2022;14(10): 2033.
106. Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T, Robert S, Miani M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology*. 2012;217(12):1292–300.

107. Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, et al. Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Proinflammatory Cytokine Production by Targeting MAPK Phosphatase-1. *J Immunol*. 2012;188(5):2127–35.
108. Harishankar M, Afsal K, Banurekha V V., Meenakshi N, Selvaraj P. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 downregulates pro-inflammatory cytokine response in pulmonary tuberculosis. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):148–52.
109. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients*. 2015;7(4):3011–21.
110. Yang HF, Zhang ZH, Chang ZQ, Tang KL, Lin DZ, Xu JZ. Vitamin D deficiency affects the immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Clin Exp Med*. 2013;13(4):265–70.
111. Colotta F, Jansson B, Bonelli F. Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun*. 2017; 85: 78–97.
112. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive Actions of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃: Preferential Inhibition of Th1 Functions. *J Nutr*. 1995;125(6):1704S-1708S.
113. Bishop E, Ismailova A, Dimeloe S, Hewison M, White JH. Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. *JBMR Plus*. 2020; 5(1):e10405.
114. Apple CG, Miller ES, Kannan KB, Stortz JA, Cox M, Loftus TJ, et al. Vitamin D status is associated with hepcidin and hemoglobin concentrations in patients with severe traumatic injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2020;89(6):1124–30.
115. Wacka E, Wawrzyniak-Gramacka E, Tylutka A, Morawin B, Gutowicz M, Zembron-Lacny A. The Role of Inflammation in Age-Associated Changes in Red Blood System. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10): 8944.
116. Walker AC, Harry JG. A survey of diarrhoeal disease in malnourished aboriginal children. *Med J Aust*. 1972;1(18):904–11.
117. Smith EM, Alvarez JA, Kearns MD, Hao L, Sloan JH, Konrad RJ, et al. High-dose vitamin D₃ reduces circulating hepcidin concentrations: A pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy adults. *Clin Nutr*. 2017;36(4):980–5.
118. Moran-Lev H, Galai T, Yerushalmy-Feler A, Weisman Y, Anafy A, Deutsch V, et al. Vitamin D Decreases Hepcidin and Inflammatory Markers in Newly

- Diagnosed Inflammatory Bowel Disease Paediatric Patients: A Prospective Study. *J Crohns Colitis*. 2019;13(10):1287–91.
119. Chung C, Silwal P, Kim I, Modlin RL, Jo EK. Vitamin D-cathelicidin axis: At the crossroads between protective immunity and pathological inflammation during infection. *Immune Netw*. 2020;20(2): e12.
 120. Höpfinger A, Karrasch T, Schäffler A, Schmid A. Regulation of *CAMP* (cathelicidin antimicrobial peptide) expression in adipocytes by TLR 2 and 4. *Innate Immun*. 2021;27(2):184–91.
 121. Hu F, Yan L, Lu S, Ma W, Wang Y, Wei Y, et al. Effects of 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on Experimental Autoimmune Myocarditis in Mice. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(6):2219–29.
 122. Wu Y, Lin X, Song F, Xue D, Wang Y. Vitamin D3 promotes autophagy in THP-1 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Exp Ther Med*. 2022;23(3):240.
 123. Afsal K, Selvaraj P. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of mannose receptor, DC-SIGN and autophagy genes in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;99:1–10.
 124. Kim MS, Baek AR, Lee JH, Jang AS, Kim DJ, Chin SS, et al. IL-37 Attenuates Lung Fibrosis by Inducing Autophagy and Regulating TGF- β 1 Production in Mice. *J Immunol*. 2019;203(8):2265–75.
 125. Mallya SM, Corrado KR, Saria EA, Yuan F ning F, Tran HQ, Saucier K, et al. Modeling vitamin D insufficiency and moderate deficiency in adult mice via dietary cholecalciferol restriction. *Endocr Res*. 2016;41(4):290–9.