



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

Jônatas Perico

Avaliação do efeito do maltolato de gálio na replicação do
Mycobacterium leprae

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carla Pereira Latini
Coorientador: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento

Botucatu
2023

Jônatas Perico

Avaliação do efeito do maltolato de gálio na replicação do
Mycobacterium leprae

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carla Pereira Latini
Coorientador: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento

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

Perico, Jônatas.

Avaliação do efeito do maltolato de gálio na replicação
do *Mycobacterium leprae* / Jônatas Perico. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Carla Pereira Latini

Coorientador: Dejair Caitano do Nascimento

Capes: 40101096

1. Ferro. 2. Gálio. 3. Hanseníase. 4. *Mycobacterium leprae*.

Palavras-chave: Experimental; Ferro; Gálio; Hanseníase;
Mycobacterium leprae.

Jônatas Perico

Avaliação do efeito do maltolato de gálio na replicação do
Mycobacterium leprae

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Carla Pereira Latini

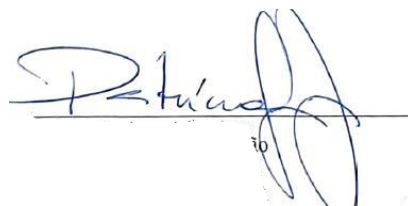
Coorientador: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento

Comissão examinadora



Prof^a. Dr^a. Ana Carla Pereira Latini

Instituto Lauro de Souza Lima



Prof^a. Dr^a. Patricia Sammarco Rosa

Instituto Lauro de Souza Lima



Prof^a. Dr^a. Ana Elisa Fusaro Bortoloto

Instituto Lauro de Souza Lima

Botucatu, 26 de junho de 2023.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, **Valeria** e **Marcelo Perico**, por todo amor, apoio e companheirismo dados por todos esses anos. Meu agradecimento a vocês é eterno. Sem vocês nada disso seria possível. Me tornei o que sou hoje por me espelhar em vocês: na grosseria do meu pai e na chatice da minha mãe, rs.

À minha avó **Edna Lança Dias**, por ter me acompanhado desde pequeno com seu amor incondicional.

Aos meus tios **Carlos** e **Luis Dias** por todo companheirismo e amor.

Aos meus avós **Durvalina (“Durva”)** e **José (“Zezinho”) Perico** e às minhas tias **Patricia** e **Silvana Perico** por estarem ao meu lado em momentos especiais e fazerem tudo parecer mais leve e fácil.

À minha querida amiga Bárbara Amorim (**“Babi”**), por ter me incentivado em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins, e por me ensinar sobre ciência e sobre a vida científica.

À minha orientadora, **Ana Carla Pereira Latini**. Se hoje tenho essa bagagem foi por seu ensino! Tudo que sei sobre biologia molecular, genética e hanseníase foi graças à sua expertise. Sou grato por ter me dado essa chance. Obrigado pelos conselhos, risadas e broncas. Vem muito mais por aí!

À **Bruna Martins**, companheira de laboratório, grupo de pesquisa, experimentos infinitos e de vida. Sem você, o cabelo fofo e seus conhecimentos de matemática a trajetória teria sido mais difícil e chata. Obrigado por toda a ajuda em passar “pomada no ratão”, fez toda a diferença neste trabalho.

À **Daniele Bertoluci** por todo o companheirismo, amizade, risadas, choros, desesperos e por transmitir todo seu conhecimento em hanseníase e

hanseníase experimental. Você é fundamental para nosso desenvolvimento e pelo desenvolvimento das pesquisas.

À minha querida amiga **Mariane Casalenovo**. Tudo seria mais chato e difícil sem você. Sua companhia é incrível. Obrigado por sempre estar ao lado de todos e nos fazer rir. Tenho orgulho de quanto seu coração é imenso e de quanto você se dedica em ajudar pessoas e animais.

À **Graziela Gonçalves**, amiga e companheira. Sempre disposta a ajudar, mesmo criticando quando tenho crises de negatividade, rs. Conte sempre comigo.

À **Izilda Andrade**. Izi! Você não sabe o quanto aprendi com vocês nesses anos! Vou sentir sua falta após aposentadoria. Você é incrível!

À **Priscila Ballalai** por cuidar tão bem de nós pós-graduandos e pela companhia diária, risadas, broncas e apoio técnico.

Às minhas amigas **Gabriela Babelge**, **Nathalia Cham** e **Izabela Ramos** por estarem sempre ao meu lado, pelos conselhos, parcerias, risadas e todo apoio que me ofereceram e continuam oferecendo durante todos esses anos. Vocês sabem o quanto são importante em minha vida e nessa trajetória.

Aos meus amigos: **Lucas Bernardes**, **Aline Rocha**, **Felipe Moratto**, **Lolla Vaiola**, **Diego Monteiro**, **Mariana Papassoni**, **Mariana Hafiz**, **Rodrigo Narukawa**, **Mayara Bamonte** e **Julio Marrero** por me aturarem, me ouvirem, me apoiarem e não desistirem de mim, mesmo nos meus dias mais caóticos.

Aos demais pesquisadores envolvidos neste projeto: **Suzana Madeira**, **Dejair Caitano do Nascimento**, **Andrea Belone** e **Patricia Sammarco Rosa**. Vocês fizeram a diferença e viabilizaram este projeto. Obrigado por todo apoio científico.

Aos meus colegas do **Instituto Lauro de Souza Lima**: **Silas Toledo Piza**, **Amanda Finardi**, **Gabriel Fioroni**, **Nathan Oliveira**, **Bruna Bortolomai**, **Lavinia Batista**, **Raissa Rotelli** e **Mônica Tassa**, meu muito obrigado por toda companhia e risadas.

À **Equipe Técnica de Microbiologia** e à **Equipe Técnica de Patologia** pelo apoio técnico prestado para esta pesquisa.

À **“Equipe COVID”** (**Ana Carla Pereira Latini**, **Andrea Belone**, **Priscila Ballalai**, **Fabiana Covolo**, **Fabiana Bertonha**, **Gislaine Querino**, **Cassia Pinke** e **Beatriz Sartori**) com quem estive participando dos diagnósticos e pesquisa desde antes de oficialmente começar este Mestrado. Aprendi demais com vocês, dividir esse momento difícil com vocês gerou muito aprendizado!

Ao **Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais**, em especial à **Tatiane Pineiz** que, por muitas vezes, resolveu problemas com todo empenho e dedicação. Sem seu trabalho este trabalho não teria sido finalizado!

À minha melhor amiga **Jéssica Cristina de Oliveira**, que me acompanha desde 2012 e nunca deixou de se fazer presente em minha vida. Mesmo longe, há tanto tempo ser nos vermos, seguimos firmes!

E à **Equipe do L’oppen Café Bar** por terem me aturado mesmo nos dias mais surtados e me ensinado tudo que sei sobre esta área. Obrigado **Michele** e **Lorena** por terem dado esta oportunidade a mim, mesmo sem bagagem nenhuma, em trabalhar com vocês! Sou grato por tudo que me ensinaram.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, granulomatosa, dermatoneurológica, de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*. A introdução da poliquimioterapia, associação de dapsona, rifampicina e clofazimina pela OMS, em 1981, resultou na cura de milhões de indivíduos infectados pelo *M. leprae*. Entretanto, mesmo com a efetividade da poliquimioterapia, os dados epidemiológicos de 143 países reportaram 140.594 casos novos de hanseníase em 2021, um aumento de mais de 10% comparado a 2020. No Brasil, no mesmo ano, foram notificados 22.426 casos novos da doença. Problemas decorrentes da terapia e as dificuldades por síntese de novos agentes estão entre os fatores são contribuintes para a dificuldade no controle da infecção. Dados da literatura demonstram a importância da homeostasia do ferro para a replicação bacilar e instalação da doença, o que a coloca como uma via candidata para alvos farmacológicos. Neste contexto, compostos com gálio, um metal trivalente que funciona como análogo do ferro bloqueando vias metabólicas dependentes deste metal, apresentam potencial para uso no controle desta infecção. Este estudo teve como objetivo principal a avaliação do efeito da administração tópica e oral de maltolato de gálio sobre a replicação do *M. leprae* em modelo murino e em modelo *in vitro* com células IDE8 derivadas de carrapatos *Ixodes scapularis*. Camundongos da linhagem BALB/c foram inoculados com 5×10^3 bacilos e após 60 dias tratados por três meses com administração oral de 150mg/kg/dia de maltolato de gálio ou 1mg/kg/semana de rifampicina ou 150mg/kg/dia de maltolato de gálio associado a 1mg/kg/semana de rifampicina; ou administração tópica de creme com maltolato de gálio 0,5% (Gallixa, CA, USA) ou Aquaphor® (Eucerin). Os animais foram avaliados quanto ao índice baciloscópico, por análise em microscopia ótica, e à viabilidade bacilar, determinada por qPCR da região gênica 16S para cDNA e gDNA, nos seguintes tempos: imediatamente e após 90 e 180 dias após o término do tratamento. Os dados de baciloscopia demonstram que o maltolato de gálio foi capaz de conter a replicação bacilar após 90 dias de tratamento quando comparado ao grupo infectado sem nenhum tratamento (p-valor=0,0358), o que não se manteve após 180 dias. Embora sem significância estatística, os dados da viabilidade

molecular mostraram que o perfil observado no grupo controle diferiu daquele dos grupos tratados, mostrando modificação do tempo da curva de crescimento associada aos tratamentos. No modelo *in vitro* a adição de maltolato de gálio reduziu a quantidade de bacilos na cultura celular quando comparado a cultura controle (p-valor= 0,0007). Nossos resultados demonstram um potencial efeito bacteriostático do maltolato de gálio sobre a replicação do *M. leprae*, fundamentando maiores investigações acerca do uso de compostos de gálio em hanseníase.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious, contagious, granulomatous, dermatoneurological disease of chronic evolution, caused by *Mycobacterium leprae*. The introduction of multidrug therapy, a combination of dapsone, rifampicin and clofazimine by the WHO in 1981, resulted in the cure of millions of individuals infected with *M. leprae*. However, even with the evolution of multidrug therapy, epidemiological data from 143 countries reported 140,594 new cases of leprosy in 2021, an increase of more than 10% compared to 2020. In Brazil, in the same year, 22,426 new cases of the disease were reported. Problems resulting from therapy and difficulties in synthesizing new agents are among the factors that contribute to the difficulty in controlling the infection. Literature data demonstrate the importance of iron homeostasis for bacillary replication and disease onset, which places it as a candidate pathway for pharmacological targets. In this context, compounds with gallium, a trivalent metal that works as an iron analogue blocking metabolic pathways dependent on this metal, have potential for use in controlling this infection. The main objective of this study was to evaluate the effect of topical and oral administration of galium maltolate on the replication of *M. leprae* in a murine model and in an in vitro model with IDE8 cells derived from *Ixodes scapularis* ticks. BALB/c mice were inoculated with 5×10^3 bacilli and after 60 days treated for three months with oral administration of 150mg/kg/day of gallium maltolate or 1mg/kg/week of rifampicin or 150mg/kg/day of gallium maltolate associated with 1mg/kg/week of rifampicin; or topical administration of 0.5% gallium maltolate cream (Gallixa, CA, USA) or Aquaphor® (Eucerin). The animals were evaluated for bacilloscopic index, by light microscopy analysis, and for bacillary viability, determined by qPCR of the 16S gene region for cDNA and gDNA, at the following times: immediately and after 90 and 180 days after the end of treatment. Bacilloscopy data demonstrate that gallium maltolate was able to contain bacillary replication after 90 days of treatment when compared to the infected group without any treatment (p -value=0.0358), which was not maintained after 180 days. Although without statistical significance, the molecular viability data observed that the profile observed in the control group differed from those of the treated groups, showing the time of the growth curve associated with the

treatments. In the in vitro model, the addition of gallium maltolate showed the amount of bacilli in the cell culture when compared to the control culture (p-value= 0.0007). Our results demonstrate a potential bacteriostatic effect of gallium maltolate on *M. leprae* replication, supporting further investigations into the use of gallium compounds in leprosy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Linha do tempo representando o desenho do estudo	28
Figura 2. Representação gráfica do experimento da primeira eutanásia (D150) com a distribuição dos 27 animais por grupo	33
Figura 3. Comparação dos dados de baciloscopia entre os grupos tratados e o grupo controle na primeira eutanásia (D150) por teste ANOVA com limite de significância de valor de p -valor $< 0,05$	35
Figura 4. Gráficos das comparações dos dados de baciloscopia entre os tratamentos na primeira eutanásia (D150)	36
Figura 5. Gráficos da comparação dos dados de viabilidade molecular obtidos pela normalização do N0 da reação de amplificação por qPCR para cDNA de 16S pelo N0 do respectivo gDNA para a primeira eutanásia (D150)	37
Figura 6. Representação gráfica do experimento da segunda eutanásia (D240) com a distribuição dos 26 animais por grupo	38
Figura 7. Comparação dos dados de baciloscopia entre os grupos tratados e o grupo controle na segunda eutanásia (D240) por teste ANOVA com limite de significância de valor de p -valor $< 0,05$	40
Figura 8. Gráficos das comparações dos dados de baciloscopia entre os tratamentos na segunda eutanásia (D240)	41
Figura 9. Gráficos da comparação dos dados de viabilidade molecular obtidos pela normalização do N0 da reação de amplificação por qPCR para cDNA de 16S pelo N0 do respectivo gDNA para a segunda eutanásia (D240)	42
Figura 10. Representação gráfica do experimento da terceira eutanásia (D330) com a distribuição dos 23 animais por grupo	43
Figura 11. Comparação dos dados de baciloscopia entre os grupos tratados e o grupo controle na terceira eutanásia (D330) por teste ANOVA com limite de significância de valor de p -valor $< 0,05$	45
Figura 12. Gráficos das comparações dos dados de baciloscopia entre os tratamentos na terceira eutanásia (D330).....	46
Figura 13. Gráficos da comparação dos dados de viabilidade molecular obtidos pela normalização do N0 da reação de amplificação por qPCR para cDNA de 16S pelo N0 do respectivo gDNA para a terceira eutanásia (D330)	47
Figura 14. Representação gráfica das médias de baciloscopia para os 3 tempos de	

tratamento (D150, D240 e D330) para os seis grupos avaliados	49
Figura 15. Representação gráfica das médias da viabilidade bacilar para os 3 tempos de tratamento (D150, D240 e D330) para os seis grupos avaliados	49
Figura 16. Comparação entre as concentrações de bacilo por volume de cultura celular em células infectadas com as cepas Thai 53 ou cepa portadora do SNP tipo 4, submetidas (+ Gálio) ou não (- Gálio) a adição de 50ug/mL de maltolato de gálio	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de baciloscopia a cada 20 campos e total de bacilos por pata para os 27 animais avaliados na primeira eutanásia (D150)	34
Tabela 2. Dados de baciloscopia a cada 20 campos e total de bacilos por pata para os 26 animais avaliados na segunda eutanásia (D240)	39
Tabela 3. Dados de baciloscopia a cada 20 campos e total de bacilos por pata para os 23 animais avaliados na terceira eutanásia (D330)	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

M. leprae – *Mycobacterium leprae*

et al. – colaboradores

PQT – poliquimioterapia

OMS – Organização Mundial da Saúde

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Folp1 – gene que confere resistência à dapsona

RpoB – gene que confere resistência à rifampicina

GyrA – gene que confere resistência à clofazimina

RLEP – região repetitiva específica do genoma do *M. leprae*

DNA – ácido desoxirribonucleico

Th1 – células T-helper do tipo 1

Th2 – células T-helper do tipo 2

PQT-U – poliquimioterapia única

PABA – ácido para-amino benzoico

RNA – ácido ribonucleico

DDS – dapsona

RFP – rifampicina

CFZ – clofazimina

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

SLC40A1 – ferroportina

GaM – maltolato de gálio

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

A. baumannii – *Acinetobacter baumannii*

Ga⁺³ – gálio trivalente

Fe⁺³ – ferro trivalente

IDE8 – células provenientes de carrapatos

mg/kg – miligramas por quilos

clearance – tempo de eliminação do bacilo da amostra após sua morte

ppm – partes por milhão

ad libitum – sem restrições

μL – microlitro

mL - mililitros

mg/mL – miligramas por mililitros

SNP – *single nucleotide polymorphism* – substituição de um nucleotídeo por outro

rpm – rotações por minuto

M-MLV – *Moloney Murine Leukemia Virus* – Vírus da Leucemia Murina de Moloney

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

gDNA – ácido desoxirribonucleico genômico

μg – micrograma

MOI – multiplicidade de infecção

MIC – concentração inibitória mínima

IL-1β – interleucina 1 beta

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

TNF – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Hanseníase: aspectos gerais e epidemiologia.....	18
1.2. Aspectos clínicos e tratamento.....	19
1.3. Metabolismo do ferro na hanseníase.....	22
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Desenho do Estudo:.....	27
3.2. Métodos:.....	28
3.2.1. Obtenção do inóculo e infecção de camundongos com <i>M. leprae</i>	28
3.2.2. Processamento das patas dos camundongos.....	29
3.2.3. Análise de multiplicação bacilar	29
3.2.4. Determinação molecular da viabilidade do <i>M. leprae</i>	30
3.2.5. Modelo <i>in vitro</i>	31
3.2.6. Análise dos resultados	32
3.2.7. Comitê de Ética no Uso de Animais	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Eutanásia 1 – D150	33
4.2. Eutanásia 2 – D240	38
4.3. Eutanásia 3 – D330	43
4.4. Modelo <i>in vitro</i>	50
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase: aspectos gerais e epidemiologia

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, granulomatosa, de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen. Este bacilo possui forte tropismo pelas células de Schwann, das fibras nervosas mielinizadas periféricas(Khanolkar, 1952). Tais lesões são responsáveis pelas manifestações clínicas da hanseníase como áreas hipocrômicas, anestésicas, hipohidrose, ferimentos, úlceras plantares, mãos em garra, pé caído e lagofthalmia(Shetty *et al.* 1988).

Uma das principais características do *M. leprae* é o não crescimento nos meios de cultura artificiais, sendo possível sua manutenção apenas com uso de modelos *in vivo*. O tempo prolongado de replicação e o custo elevado para manutenção dos modelos experimentais é um desafio para o estudo dessa doença (Shepard, 1971).

O diagnóstico e o tratamento precoce são fundamentais na redução do dano neural, dor e incapacidades físicas dos indivíduos acometidos por essa doença, constituindo um desafio para os serviços de saúde no atendimento aos pacientes(Talhari, Neves. 1997); (OMS, 1982); (OMS, 2017). Tal desafio tem sido enfrentado de forma mais efetiva desde o início da década de 1980 com a introdução da poliquimioterapia (PQT) pela Organização Mundial da Saúde (OMS), resultando na cura de milhões de indivíduos infectados pelo *M. leprae* e mudando significativamente o cenário mundial da hanseníase (OMS, 1982). Contudo, mesmo com os avanços no tratamento, os dados epidemiológicos de 143 países, em 2021, reportaram 140.594 casos novos da doença. Esse número representa um aumento de 10.2% em relação à 2020, quando provavelmente os registros foram severamente afetados pela pandemia do COVID-19. O Brasil registrou 18.318 novos casos da doença em 2021 e 17.979 em 2020, o que sugere uma demanda ainda reprimida para o diagnóstico dos casos que surgiram durante o período mais grave da pandemia(OMS, 2022).

Atualmente, a biologia molecular contribui com o diagnóstico da hanseníase e

da resistência medicamentosa por métodos que fornecem resultados de forma mais rápida, como o qPCR e o sequenciamento. Ensaio moleculares para detecção de mutações que conferem resistência às drogas são preconizados e tem como objetivo principal a redução do tempo de diagnóstico. Convencionalmente são investigados os genes *Folp1*, *RpoB* e *GyrA*, responsáveis pela resistência à dapsona, rifampicina e clofazimina. No entanto, estes marcadores explicam número reduzido dos casos investigados com suspeita de resistência, o que demanda pela ampliação do número de alvos investigados (Andrade *et al.* 2022). O padrão ouro para o diagnóstico de resistência medicamentosa segue sendo o modelo experimental murino, que consiste na inoculação de suspensão obtida da biópsia do paciente em patas de camundongos BALB/c juntamente com a administração oral das drogas da PQT (Adams, 2021; Shepard, 1969). O resultado é obtido aproximadamente 6 meses após a inoculação e informa se o microrganismo presente no paciente possui ou não fenótipos de resistência à rifampicina e/ou dapsona (Shepard, 1969). Já o método de diagnóstico utilizando modelo experimental murino prevê a inoculação da suspensão gerada no processamento da biópsia de pele do paciente nos coxins plantares traseiros de camundongos nude atímicos (athymic nude, nu/nu – Foxn1^{nu}). O tempo para a avaliação de crescimento ou não também é de aproximadamente 6 meses (Welch *et al.* 1980).

Para o diagnóstico molecular da hanseníase é utilizado ensaio de qPCR com primers específicos para a região repetitiva específica do genoma do *M. leprae* (RLEP), que é altamente sensível. O resultado positivo consiste na amplificação das amostras de DNA extraídas da biópsia do paciente até 34 ciclos de reação. O resultado negativo do qPCR é considerado quando a amostra ultrapassa o ciclo 34 sem atingir o limite de detecção de fluorescência (Manta *et al.* 2022).

1.2. Aspectos clínicos e tratamento

A classificação clínica da hanseníase obedece a um espectro definido por Ridley e Jopling (1966), baseado na clínica, histologia, baciloscopia e resposta à reação de Mitsuda. Nessa classificação a hanseníase indeterminada é a fase inicial da doença, ainda sem progressão para uma das formas do espectro e que pode

evoluir para a cura espontânea. O polo tuberculoide é caracterizado pela menor carga bacilar decorrente de presença de resposta imune celular do tipo Th1, compreendendo pacientes com poucas lesões com perda de sensibilidade, sem pelos e com descamação. O polo oposto virchowiano é a forma disseminada da doença, com muitas lesões e capaz de comprometer órgãos, o que decorre da maior carga bacilar devido a presença de resposta imune humoral (Th2) ineficiente contra o bacilo intracelular. Entre os polos estão as formas intermediárias do espectro, denominadas dimorfo-tuberculoide, dimorfo-dimorfo e dimorfo-virchowiano, caracterizadas pela proximidade com um dos polos e pela instabilidade devido à resposta imune do hospedeiro.

Existe ainda uma classificação operacional da hanseníase, empregada para fins de tratamento, e definida pela OMS baseada no número de lesões. Esta inclui a forma paucibacilar com até cinco lesões e a multibacilar com mais do que cinco lesões (OMS, 2017).

A evolução da hanseníase, responsável pelas sequelas incapacitantes associadas à doença, inclui dois principais tipos de reações: reação tipo 1 ou reação reversa, reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico, além dos episódios recorrentes de neurite (Ebenezer, Scollard. 2021).

A reação do tipo 1 é característica de inflamação aguda ou subaguda de nervos e pele mediada pelo aumento da imunidade celular, e pode ocorrer desde o momento do diagnóstico até a cura, provocando neurite, redução ou perda da capacidade motora e parestesia. Os fatores de risco que podem influenciar em seu desenvolvimento ainda não são muito bem esclarecidos e seu tratamento envolve a associação de corticoides com a PQT (Walker, Lockwood. 2008).

A reação do tipo 2 tem como característica o aparecimento de nódulos que podem vir a gerar úlceras e sintomas sistêmicos como febre e dores no corpo. Apesar de ser considerada como uma desordem imunomediada, não é muito bem compreendida. O diagnóstico é clínico, com auxílio da histopatologia, e o tratamento realizado, geralmente, com talidomida. Entretanto, a talidomida possui diversas contraindicações e reações, incluindo altas chances de desenvolvimento de trombozes e embolia pulmonar, além do importante efeito teratogênico (Chavez-Alvarez *et al.* 2020)

Existe ainda o fenômeno de Lúcio que é um tipo de reação hansênica rara caracterizada por ser dolorosa, com eritemas e lesões irregulares e com úlceras acompanhadas por necrose (OMS, 2004). Há presença sintomas sistêmicos como febre, anemia e hepatoesplenomegalia. Esta forma é tratada com o uso da PQT e corticoides (Tajalli, Wambier. 2021).

A administração das drogas era, usualmente, feita a partir da associação de dapsona e rifampicina para pacientes paucibacilares devido à carga bacilar reduzida e dapsona, rifampicina e clofazimina para multibacilares, portadores de cargas bacilares mais altas. Esta estratégia contribuiu significativamente para a redução da seleção de cepas de *M. leprae* resistentes aos componentes da PQT (OMS, 2004). No entanto, a partir de julho de 2021, a PQT passou a ser única para pacientes paucibacilares e multibacilares, denominando-se PQT-U (poliquimioterapia única) (MINISTERIO DA SAUDE, 2021). Desde então, o tratamento padrão para pacientes de hanseníase é a associação de dapsona, rifampicina e clofazimina.

As bases farmacológicas da PQT decorrem dos alvos de ação de cada componente da PQT. A dapsona é um agente bacteriostático, análogo estrutural do ácido para-amino benzoico (PABA), que inibe competitivamente a enzima diidropteroato, resultando no bloqueio da síntese de ácido fólico, um metabólito imprescindível para síntese de DNA, RNA e proteínas em microrganismos (Kulkarni *et al.* 1983). A rifampicina é um antimicrobiano macrocíclico, do grupo das rifamicinas, com ação bactericida (Waters *et al.* 1966; Pearson *et al.* 1970). A ação bactericida desta droga decorre da complexação com a RNA-polimerase DNA dependente, bloqueando a síntese de RNA (Hartman *et al.* 1967; Umezawa *et al.* 1968). A clofazimina é um corante riminofenazínico usado no tratamento da hanseníase desde os anos 1960, com elevadas propriedades lipofílicas que facilitam sua penetração nos macrófagos infectados pelo *M. leprae*. O mecanismo de ação da clofazimina ainda não é bem explicado, mas as hipóteses mais relevantes sugerem que esta droga tenha capacidade de intercalar-se no DNA bacteriano, além de gerar ânions superóxido e peróxido de hidrogênio que danificam o DNA (Martindale, 2023). Diante do exposto denota-se que o folato, o RNA mensageiro e o DNA bacteriano, constituem os principais alvos de ação da DDS, RFP e CFZ, respectivamente.

Considerável parte dos casos de hanseníase evoluem com ocorrência de recidiva, insuficiência terapêutica ou falência terapêutica. No último boletim epidemiológico da OMS, os indicadores mostram que o Brasil é o país com maior número de recidivas registrado em 2021, sendo 1212 pacientes. Além disso, o número de pacientes que necessita de retratamento, independentemente do motivo, é de 3586, colocando o Brasil na segunda posição de índice de retratamentos, atrás apenas da Índia (OMS, 2022). A recidiva se dá quando o paciente recebe alta médica após o tratamento, mas volta a apresentar sintomas e sinais da hanseníase após 5 anos. A insuficiência terapêutica é constatada quando o tratamento é inadequado, seja por negligência do paciente ao tomar a medicação, seja pela classificação clínica equivocada. A falência terapêutica ocorre quando o paciente diagnosticado com hanseníase não apresenta melhora clínica após o tratamento correto por 6 ou 12 meses, que é estendido por 24 meses e, mesmo após, apresenta bacilos e doença ativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Esse cenário fundamenta a necessidade de descoberta de novas drogas para o tratamento da hanseníase.

1.3. Metabolismo do ferro na hanseníase

Na busca de novos alvos farmacológicos contra o *M. leprae* as vias relacionadas à homeostasia de metais de transição como manganês, cobre, zinco, e em especial o ferro, que é essencial para a replicação bacilar na infecção de macrófagos pelo *M. leprae*, são fortes candidatas (Pinheiro *et al.* 2018).

Há evidências consistentes do envolvimento do metabolismo do ferro com a hanseníase, com aumento da hepcidina e receptor de transferrina, e diminuição de ferroportina nas formas clínicas de maior carga bacilar (Souza *et al.* 2012). Esses dados apontam que a manutenção do ferro intracelular seja um mecanismo de grande relevância para a replicação bacilar. No mesmo sentido, é descrito aumento do ferro em macrófagos de pacientes multibacilares, assim como aumento do receptor de transferrina e diminuição da expressão de ferroportina, fatores que favorecem a sobrevivência e a replicação do *M. leprae* (Barbosa *et al.* 2017).

O status do ferro em doenças infecciosas tem sido bastante investigado em tuberculose, mostrando que o ferro influencia na ocorrência e na progressão da

doença, e que seu excesso aumenta a proliferação do *M. tuberculosis* (Gangaidzo et al, 2001). Lounis et al. (2001) também demonstraram aumento significativo da multiplicação do *M. tuberculosis* em camundongos BALB/c que receberam dieta suplementada com ferro (hidroxila férrica).

A competição pelo ferro decorre da capacidade dos microrganismos de captação do ferro do hospedeiro. Para tanto, estes secretam sideróforos, que são quelantes de ferro de alta afinidade e captadores de ferro do meio, o que confirma a importância da aquisição de ferro para patogenicidade das micobactérias. O principal sideróforo secretado pelas micobactérias é a micobactina, molécula intracelular de natureza hidrofóbica que atua retendo o ferro dentro do envelope celular. Por outro lado, o hospedeiro produz a lipocalina-2 que tem a função de sequestrar o sideróforo ligado ao ferro. A expressão destas proteínas está ainda envolvida com mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Grande produção de bacterioferritina, que tem função de estocagem deste metal, tem sido detectada em cepas de *M. tuberculosis* resistentes a aminoglicosídeos (Matzanke, 1996).

Outra evidência relevante do papel do ferro na infecção por micobactérias vem do transportador Nramp-1. Esta proteína é análoga à codificada pelo gene Bcg de camundongos, associada com a resistência à infecção murina por micobactérias. Encontra-se expresso nos fagossomos dos macrófagos e é responsável por regular a concentração de metais divalentes no fagossomo, interferindo com a replicação da bactéria (Frehel et al. 2002). Após a fagocitose, o Nramp-1 é recrutado para a membrana fagossômica, onde funciona como uma bomba de efluxo mediando o transporte de metais, como ferro e manganês, do fagossomo para o citoplasma. Essa proteína macrofágica foi relacionada à imunidade porque a mutação de seu gene confere suscetibilidade para infecção por patógenos intracelulares como *Mycobacterium*, *Salmonella* e *Leishmania*. O mecanismo pelo qual o Nramp-1 afeta a atividade antimicrobiana dos macrófagos permanece incerto, e foi proposto que os homólogos de *NRAMP* bacterianos e de mamíferos podem competir pelos mesmos substratos no microambiente do fagossoma (Abel et al. 1998). A importância desta proteína para a hanseníase é ainda reforçada pela associação de polimorfismos deste gene como risco de hanseníase em diversas populações, e pela maior expressão desta em lesões de pacientes virchowianos (Lagrange, 1996).

Dados ainda não publicados de um projeto desenvolvido pelo nosso grupo mostraram a importância de vias relacionadas à homeostasia de metais de transição como ferro, cobre, manganês e zinco, na infecção de macrófagos pelo *M. leprae*. Em análise de transcriptoma, transportadores de metais, como SLC40A1 (ferroportina), mostraram ser expressos diferencialmente na infecção. Esses dados fundamentaram a nossa busca por agentes quimioterápicos que possuem essas vias como alvos. Nesse contexto, foi estabelecida parceria com os detentores da patente do uso farmacêutico do maltolato de gálio (GaM) (Patente: US20100286263A1) para investigar o efeito da droga sobre o *M. leprae* em modelos *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente, o gálio na forma de maltolato, apresenta ação antibacteriana contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *A. baumannii* (Hijazi et al. 2018).

A via do metabolismo do ferro pode ser bloqueada pelo uso do gálio (Ga^{+3}), um metal trivalente, descoberto em 1875, que possui efeito antiproliferativo por bloquear a replicação do DNA de células tumorais (Jakupec, 2004). O gálio se liga à transferrina e é transportado até o fagossomo, onde é captado pelo receptor de transferrina. Essa é a via pela qual as micobactérias captam ferro do hospedeiro. O gálio por sua vez não pode ser reduzido e, quando incorporado no sítio de ligação do Fe^{+3} , inativa os processos de redução e oxidação dependentes de Fe^{+3} (Bernstein, 1998; Giacani et al. 2019). Assim, o gálio funciona como um análogo do ferro, privando microrganismos desse metal essencial.

Para verificar a função bactericida e/ou bacteriostática do maltolato de gálio sobre o *M. leprae*, ensaios de viabilidade por métodos moleculares são necessários, uma vez que a baciloscopia não possui esse alcance. Nesse contexto, é importante mencionar a busca por marcadores que sejam capazes de expressar a viabilidade e que não dependam de modelos murinos. Atualmente, o marcador mais utilizado para ensaios de viabilidade do *M. leprae* é a região do gene ribossomal 16S, que codifica uma parte do ribossomo e é capaz de identificar bacilos viáveis nas amostras (Kurabachew, 1998).

Diante do cenário em questão, o interesse pelo maltolato de gálio surge na perspectiva de estabelecer um novo composto capaz de bloquear as vias do metabolismo do ferro na infecção causada pelo *M. leprae*. A possibilidade de efetividade desta molécula na infecção por *M. leprae* será um ganho considerável para

a terapia da hanseníase, sobretudo em um momento que há grandes dificuldades por síntese de novos agentes antimicrobianos, somado a crescente ocorrência de problemas relacionados à terapia da hanseníase que pode ameaçar o controle da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar o efeito do maltolato de gálio sobre o *Mycobacterium leprae*.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o efeito da administração oral do maltolato de gálio sobre a replicação do *M. leprae* em modelo experimental de Shepard;
- Investigar o efeito da administração tópica do maltolato de gálio sobre a replicação do *M. leprae* em modelo experimental de Shepard;
- Investigar o efeito da associação entre o maltolato de gálio e a rifampicina sobre a replicação do *M. leprae* em modelo experimental de Shepard;
- Investigar o efeito *in vitro* do maltolato de gálio na replicação do *M. leprae* em cultura de células IDE8 provenientes de carrapatos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho do Estudo:

Foram utilizados 90 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, com 6 a 7 semanas de idade, provenientes do biotério do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo. Os animais foram inoculados com 5×10^3 bacilos em ambos os coxins plantares traseiros, segundo a técnica de Shepard, seguindo protocolo descrito em Laboratory Techniques for Leprosy (WHO 1986).

O maltolato de gálio foi gentilmente cedido para estes experimentos pelo Dr. Lawrence Richard Bernstein, detentor de patentes relacionadas ao uso farmacêutico do maltolato de gálio e colaborador deste projeto.

Os animais foram divididos em grupos de $n=5$ da seguinte forma:

- Controle inoculado e não tratado;
- Administração oral por gavagem 150mg/kg/dia de maltolato gálio;
- Administração oral por gavagem de 1mg/kg/semana de rifampicina;
- Administração oral por gavagem 150mg/kg/dia de maltolato gálio associado a 1mg/kg/semana de rifampicina;
- Administração tópica duas vezes ao dia de creme com maltolato de galio 0,5% (Gallixa, CA, USA);
- Administração tópica duas vezes ao dia de Aquaphor® (Eucerin).

Os tratamentos foram iniciados após 60 dias da infecção, e feitos por três meses (90 dias), cinco dias por semana.

A eutanásia dos animais foi realizada em três tempos diferentes, no seguinte plano:

- Eutanásia 1 → Imediatamente após o término do tratamento (150 dias);
- Eutanásia 2 → 90 dias após o término do tratamento (240 dias);
- Eutanásia 3 → 180 dias após o término do tratamento (330 dias).

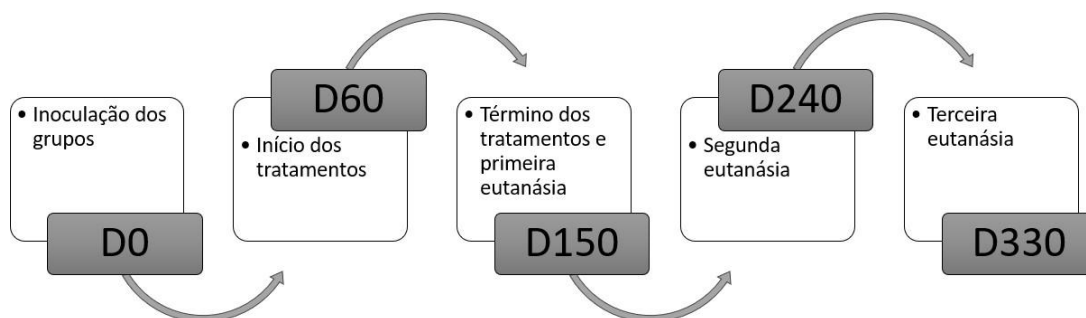


Figura 1. Linha do tempo representando o desenho do estudo. Fonte: elaborado pelo autor

Os períodos de eutanásia foram planejados tendo em vista a avaliação de um possível *clearance* bacilar, isto é, a eliminação do bacilo da pata do camundongo após sua morte.

Durante todo o período do estudo todos os grupos receberam ração peletizada com quantidade controlada de ferro em 25ppm (Envigo) e água *ad libitum*. A redução de ferro na composição da ração foi feita a fim de limitar a oferta deste metal possibilitando a competição entre o gálio e o ferro. As rações sem restrição de ferro contêm cerca de 180ppm do metal em sua composição.

A administração oral do maltolato de gálio foi feita por gavagem com 300μL de suspensão contendo 15mg/mL de maltolato de gálio em carboximetilcelulose a 1%.

A administração oral da rifampicina foi feita por gavagem com 250 μL de solução contendo 0,12 mg/mL de rifampicina (Sigma).

A administração tópica de maltolato de gálio 0,5% (Gallixa, CA, USA) e Aquaphor® (Eucerin) foi feita com o auxílio de uma seringa na quantidade de 0,2mL por pata. O uso do Aquaphor® funcionou como controle, uma vez que a base da preparação tópica comercial de maltolato de gálio apresenta composição similar ao Aquaphor®.

3.2. Métodos:

3.2.1. Obtenção do inóculo e infecção de camundongos com *M. leprae*

Os bacilos para infecção dos camundongos foram obtidos de coxins plantares de camundongos nude atímicos (athymic nude, nu/nu – Foxn1^{nu}), previamente infectados com a cepa Thai 53 de *M. leprae*, conforme descrito por Trombone *et al.* (2014). Em seguida, para ajuste do inóculo foi realizada a contagem dos bacilos na suspensão obtida pela coloração de Ziehl-Neelsen a frio.

Os bacilos utilizados para infecção do modelo *in vitro* foram obtidos da mesma forma. Para este experimento, além da cepa Thai 53, também foi utilizada bacilos de cepa portadora do SNP tipo 4, conforme descrito por Monot *et al.* 2005, com perfil de resistência à rifampicina e dapsona.

Os camundongos BALB/c com 40 dias de idade foram inoculados por via intradérmica com 5×10^3 bacilos por coxim plantar traseiro esquerdo e direito conforme descrito por Shepard (1960).

3.2.2. Processamento das patas dos camundongos

Os animais eutanasiados tiveram seus coxins plantares traseiros excisados e processados conforme descrito por Trombone *et al.* 2014, da seguinte forma: um coxim foi excisado e armazenado em solução de formaldeído 10% para análise histopatológica e o outro processado em homogeneizador de tecidos Ultra Turrax T10 (IKA) em cloreto de sódio 0,9%. A suspensão obtida (1000 µL) foi utilizada para realização de coloração de Ziehl-Neelsen a frio para a baciloscopia, considerando a contagem de 20 campos por esfregaço, totalizando 60 campos. O restante desta suspensão foi centrifugado em 13.000rpm, por 30 minutos e o pellet armazenado em 1mL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen), em ultrafreezer a -80°C para posterior extração de RNA e DNA.

3.2.3. Análise de multiplicação bacilar

Para a contagem dos bacilos, 10 µL das suspensões obtidas e 5 µL de solução fenol-soro foram depositados e espalhados em uma lâmina de microscopia previamente marcada com três círculos de 1 centímetro cada. Após

a secagem, os esfregaços foram fixados pelo calor passando-se a lâmina na chama do bico de Bunsen. Em seguida as lâminas foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen a frio da seguinte forma: filtrar fucsina sobre as lâminas e deixar agir por 20 minutos; lavar em água corrente; descorar rapidamente com álcool-ácido; lavar abundantemente em água corrente; filtrar azul de metileno sobre as lâminas e deixar agir por 5 minutos; lavar abundantemente em água corrente e deixar secar.

A contagem dos bacilos foi realizada por microscopia óptica em objetiva de imersão e foram avaliados 20 campos por círculo, totalizando 60 campos contados por amostra.

3.2.4. Determinação molecular da viabilidade do *M. leprae*

O RNA do bacilo foi isolado e purificado a partir da amostra de coxim plantar em TRIzol™ Reagent (Invitrogen), em tubo FastPrep® Lysing Matrix D (MP-Biomedicals) no equipamento FastPrep 24 (MP-Biomedicals) por 3 ciclos de 6,5m/s por 45 segundos, deixando as amostras em gelo por 5 minutos entre os ciclos. Após essa homogeneização, foram acrescentados 200µL de clorofórmio (Merck) e a amostra foi centrifugada a 14000rpm por 15 minutos. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para outro microtubo, onde foi adicionado 500µL de isopropanol (Merck) por amostra, mantendo em temperatura ambiente por 10 minutos em seguida centrifugando a 14000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e em seguida adicionado 500µL de etanol 75% (Merck). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos no vórtex e centrifugadas a 7500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida o *pellet* foi mantido em temperatura ambiente por 10 minutos ou até o etanol evaporar e ressuspendido em 25µL de água ultrapura.

Os RNAs extraídos foram tratados com TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. A quantidade de RNA nas amostras foi avaliada por fluorometria empregando o equipamento Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) e a qualidade avaliada pelo equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Após, 1µg de RNA foi transcrito para cDNA com

uso da enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Merck) conforme protocolo do fabricante.

O DNA do bacilo foi purificado a partir da fase aquosa e da interfase que permanece nos tubos FastPrep® Lysing Matrix D, seguindo protocolo descrito por Adams *et al.* (2022) e avaliado quanto a quantidade pelo Qubit 4 e pureza pelo espectrofotômetro Nanodrop 2000.

A viabilidade dos bacilos nas amostras foi obtida a partir de dados do qPCR para as amostras de cDNA e de gDNA para com primers específicos para sequencias que codificam o RNA ribossômico 16S. Unidades de fluorescência arbitrárias denominadas N0 foram obtidas para cada amplificação de cDNA e gDNA a partir das saídas do software LinRegPCR versão 2021.2 para as análises das reações. O N0 de cada amostra foi então normalizado pela eficiência da respectiva reação, calculada também pelo software LinRegPCR versão 2021.2. Então, o N0 de cada amostra de cDNA foi normalizada pelo N0 do respectivo gDNA. Essa razão é então considerada a quantidade relativa de bacilos viáveis entre os presentes na amostra. Esse protocolo foi adaptado a partir do descrito por Ruijter *et al* (2013).

As reações de qPCR foram realizadas com ensaios SYBR® (Applied Biosystems) em equipamento de PCR em tempo real CFX Opus 96 (BioRad). As sequências dos primers específicos para a região do RNA ribossômico 16S foram obtidas a partir do protocolo descrito por Martinez *et al.* (2009): primer *forward* 5'-GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC-3' e *reverse* 5'-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT-3', em concentração final de 10mM. As reações foram feitas em volume final de 12,5µL, usando 20µg do *template* de cDNA ou gDNA e seguindo o protocolo de ciclagem padrão para ensaios SYBR neste equipamento. Curvas de *melting* foram feitas em todas as reações a fim de controlar para a especificidade da reação.

3.2.5. Modelo *in vitro*

O modelo *in vitro* foi desenvolvido em células IDE8, proveniente de carrapatos *Ixodes scapularis*, conforme descrito por Ferreira *et al.* (2018). As

células foram mantidas em meio L-15B suplementado com 10% de soro fetal bovino e infectadas com a cepa referência Thai 53 e cepa portadora do SNP tipo 4 de *M. leprae*, mantidas pelo Laboratório de Hanseníase Experimental do Instituto Lauro de Souza Lima, na multiplicidade de infecção de 50 bacilos por célula (MOI 50:1). As células foram cultivadas em placas de 24 poços em quantidade de 2×10^5 células/poço, acrescentando lamínulas aos poços para adesão das células.

O maltolato de gálio foi adicionado ao meio de cultura na concentração 50µg/mL.

Simultaneamente foram feitas culturas controles nas mesmas condições sem a adição de maltolato de gálio.

As culturas foram mantidas por 2 meses em estufa de CO₂ e a quantidade de *M. leprae* foi avaliada por baciloscopia em microscopia ótica corando as lamínulas retiradas dos poços com coloração de Ziehl-Neelsen, como já descrito.

Esses experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), no Rio de Janeiro, sob a supervisão do Dr. Flavio Alves Lara.

3.2.6. Análise dos resultados

Testes ANOVA foram utilizados para comparação de três ou mais grupos. Teste-t ou Mann-Whitney foram empregados para comparação entre dois grupos. Os dados foram avaliados quanto a distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os resultados foram analisados no software GraphPad Prism 9®. O limite de significância adotado foi de p-valor < 0,05.

3.2.7. Comitê de Ética no Uso de Animais

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima (CEUA – ILSL) sob registro número 003/19.

4. RESULTADOS

Após 60 dias da inoculação e 90 dias dos tratamentos as eutanásias foram executadas em três tempos experimentais, conforme descrito a seguir:

4.1. Eutanásia 1 – D150

Neste primeiro tempo de experimento, observamos redução estatisticamente significativa dos dados de baciloscopia do grupo tratado com maltolato de gálio oral associado à rifampicina quando comparado ao controle (p-valor= 0,0395) (Figura 3).

Realizamos também as seguintes comparações entre grupos que se relacionam quanto ao tipo de tratamento: Aquaphor e maltolato de gálio tópico (Figura 4A); rifampicina e maltolato de gálio oral associado a rifampicina (Figura 4B); maltolato de gálio oral e sua associação com rifampicina (Figura 4C); GaM 150 e GaM Tópico (Figura 4D) (Figura 4). Em nenhuma destas comparações os dados foram significativos.

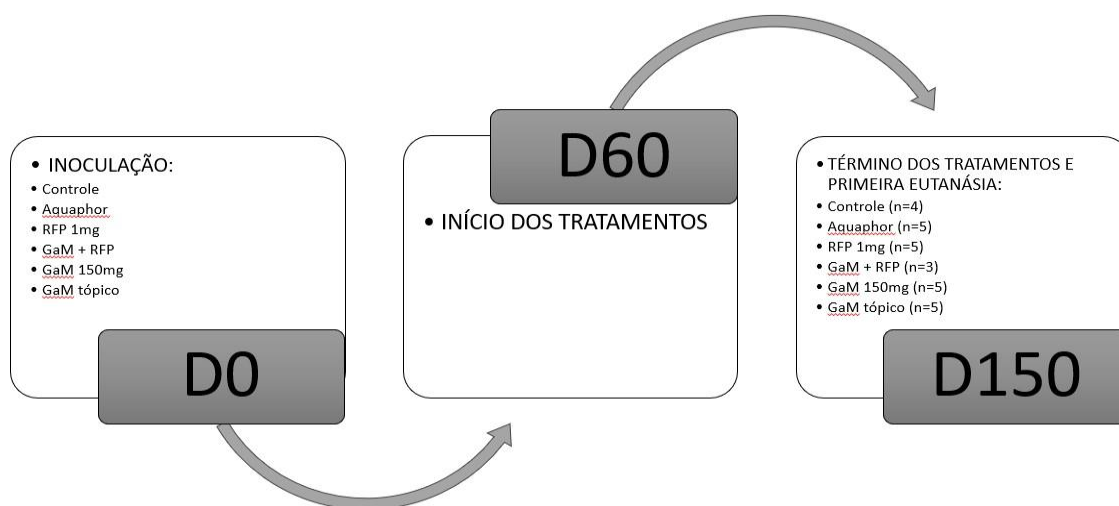


Figura 2. Representação gráfica do experimento da primeira eutanásia (D150) com a distribuição dos 27 animais por grupo. RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

GRUPO	EUTANÁSIA 1			TOTAL
	BAAR/20 campos	BAAR/20 campos	BAAR/20 campos	
CONTROLE	27	29	32	3,86E+05
	15	15	19	2,15E+05
	21	45	29	4,16E+05
	17	33	25	3,29E+05
AQUAPHOR	6	3	10	8,33E+04
	15	9	12	1,58E+05
	19	21	25	2,85E+05
	16	13	15	1,93E+05
	31	3	3	1,62E+05
GaM TÓPICO	10	17	15	1,84E+05
	9	15	12	1,58E+05
	12	32	13	2,50E+05
	3	2	2	3,07E+04
	14	6	11	1,36E+05
GaM 150mg	13	71	17	4,43E+05
	16	15	14	1,97E+05
	23	10	11	1,93E+05
	47	21	35	4,51E+05
	10	14	11	1,53E+05
RIFAMPICINA 1mg	11	28	18	2,50E+05
	33	27	30	3,94E+05
	5	1	5	4,82E+04
	10	11	9	1,31E+05
	4	28	29	2,67E+05
GaM 150mg + RFP 1mg	1	6	3	4,38E+04
	13	14	11	1,67E+05
	9	7	10	1,14E+05

Tabela 1. Dados de baciloscopia a cada 20 campos e total de bacilos por pata para os 27 animais avaliados na primeira eutanásia (D150). BAAR: bacilo álcool-ácido resistente; RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

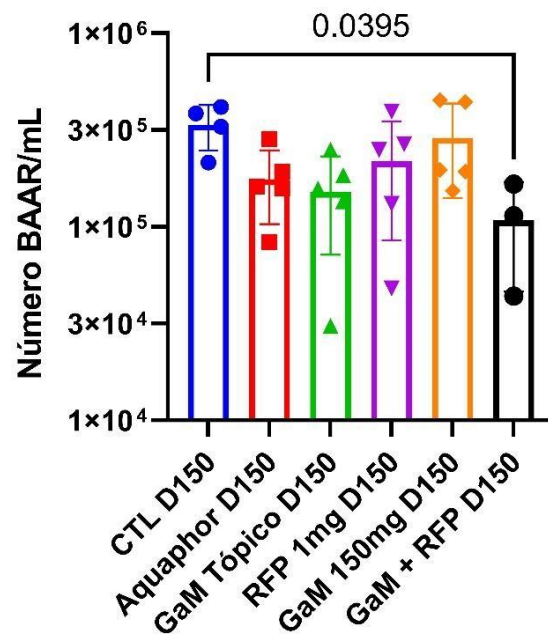


Figura 3. Comparação dos dados de baciloscopia entre os grupos tratados e o grupo controle na primeira eutanásia (D150) por teste ANOVA com limite de significância de valor de p-valor < 0,05. BAAR: bacilo álcool-ácido resistente; CTL: controle; RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio; Fonte: elaborado pelo autor

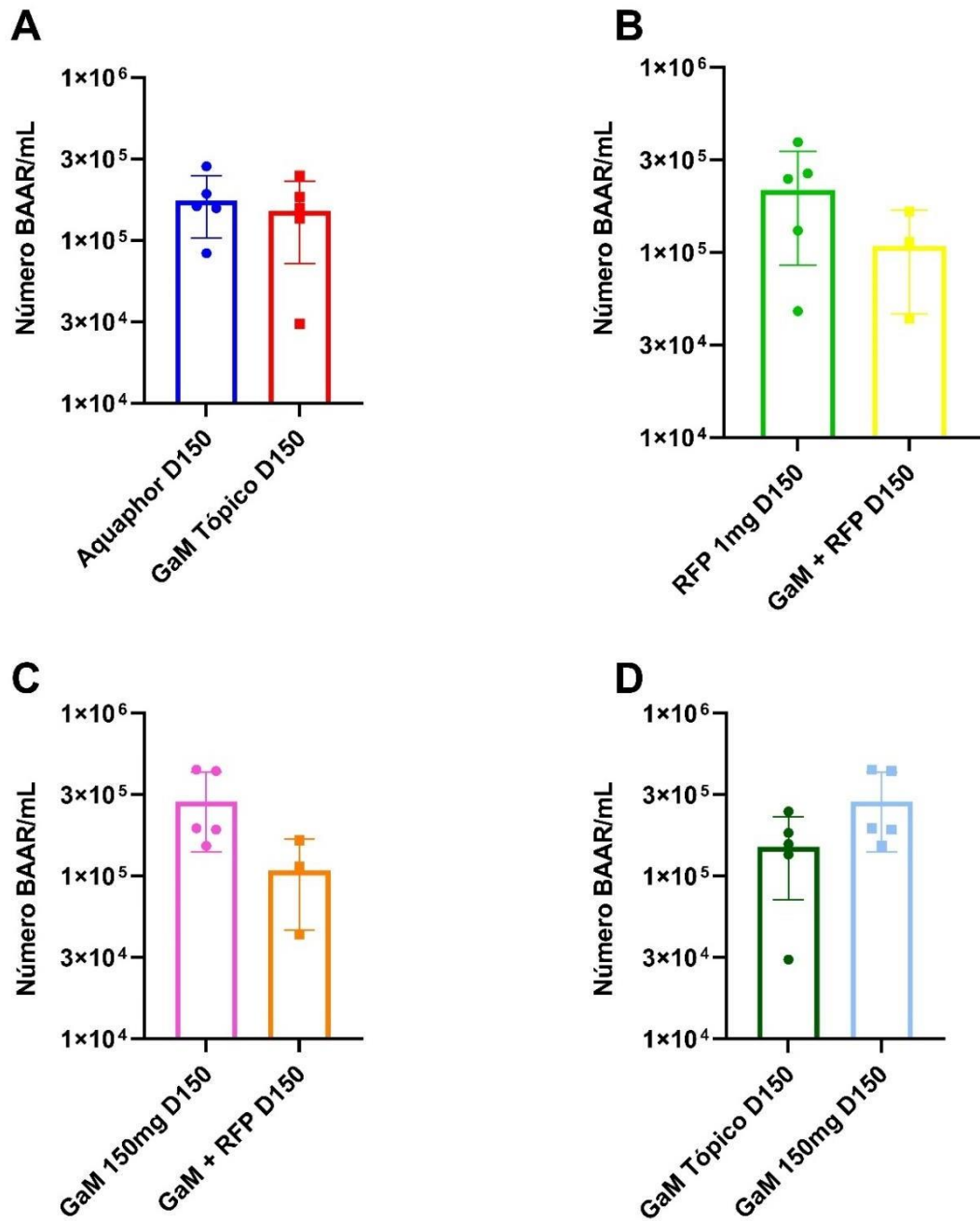


Figura 4. Gráficos das comparações dos dados de baciloscopia entre os tratamentos na primeira eutanásia (D150). Gráfico A: comparação entre o tratamento com Aquaphor (placebo) e GaM tópico. Gráfico B: comparação entre o tratamento com rifampicina 1mg/kg/semana e GaM oral 150mg/kg/dia associado à rifampicina 1mg/kg/semana. Gráfico C: comparação entre o tratamento com GaM oral 150mg/kg/dia e GaM oral 150mg/kg/dia associado à rifampicina 1mg/kg/semana. Gráfico D: comparação entre o tratamento com GaM tópico e GaM oral 150mg/kg/dia. Análises por teste t para amostras paramétricas e teste de Mann-Whitney para amostras não paramétricas, com limite de significância de p-valor < 0,05. BAAR: bacilo álcool-ácido resistente; CTL: controle; RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

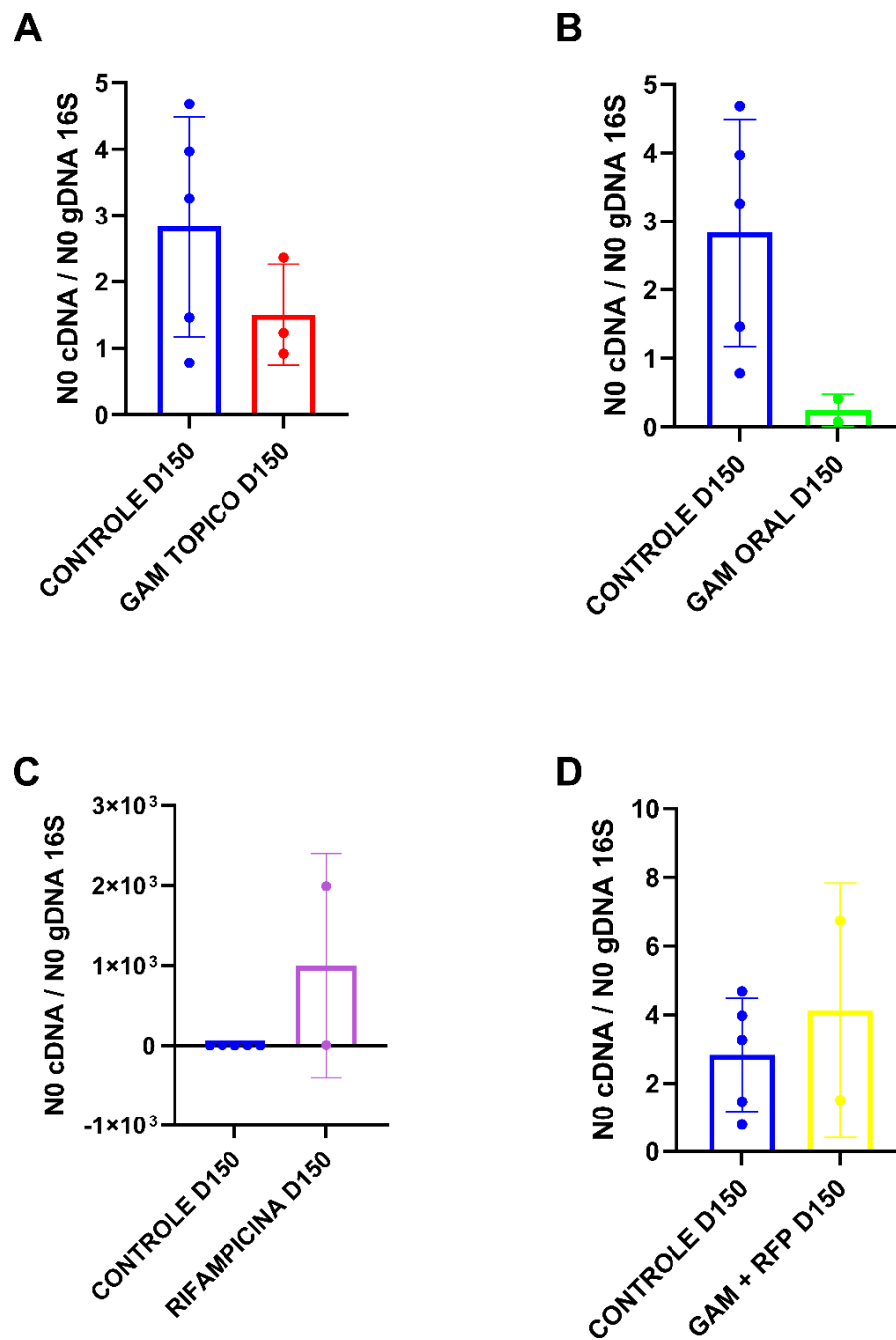


Figura 5. Gráficos da comparação dos dados de viabilidade molecular obtidos pela normalização do N0 da reação de amplificação por qPCR para cDNA de 16S pelo N0 do respectivo gDNA para a primeira eutanásia (D150). A: Comparação de viabilidade entre GaM Tópico e Controle; B: Comparação de viabilidade entre GaM Oral e Controle; C: Comparação de viabilidade entre Rifampicina e Controle; D: Comparação de viabilidade entre GaM Oral associado a Rifampicina e Controle. RFP: Rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

4.2. Eutanásia 2 – D240

A segunda eutanásia, 90 dias após o término do tratamento, foi realizada com 26 camundongos (Figura 6). Nesse tempo experimental podemos constatar que houve uma redução de bacilos estatisticamente significativa no grupo tratado por gavagem com 150mg de GaM quando comparado ao grupo controle, com p-valor de 0,0358 (Figura 7). Na comparação entre os tipos de tratamento, não existiram diferenças estatísticas (Figura 8).

Em relação à viabilidade molecular, neste tempo notamos que, embora não significativa, há uma redução da viabilidade nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle (Figura 9).

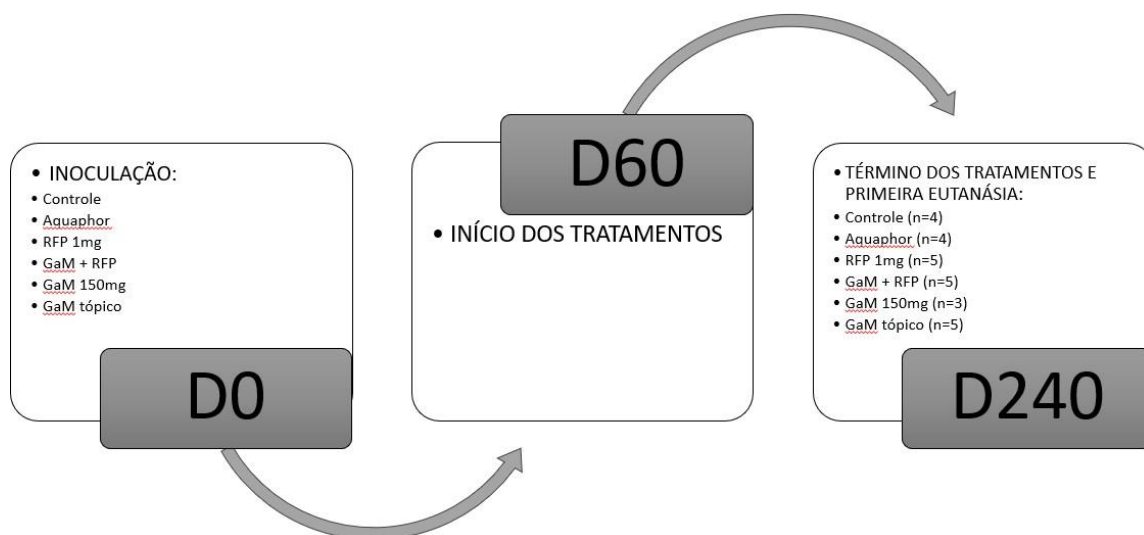


Figura 6. Representação gráfica do experimento da segunda eutanásia (D240) com a distribuição dos 26 animais por grupo. RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

GRUPO	EUTANÁSIA 2			TOTAL
	BAAR/20 campos	BAAR/20 campos	BAAR/20 campos	
CONTROLE	18	15	31	2,81E+05
	5	12	20	1,62E+05
	7	10	4	9,20E+04
	10	7	1	7,89E+04
AQUAPHOR	19	13	17	2,15E+05
	34	19	20	3,20E+05
	37	48	38	5,39E+05
	20	22	13	2,41E+05
GaM TÓPICO	2	5	1	3,51E+04
	11	6	14	1,36E+05
	22	26	39	3,81E+05
	3	8	6	7,45E+04
	16	19	20	2,41E+05
GaM 150mg	5	5	6	7,01E+04
	6	6	7	8,33E+04
	2	5	8	6,57E+04
RIFAMPICINA 1mg	67	60	106	1,02E+06
	40	73	30	6,27E+05
	16	15	22	2,32E+05
	54	27	39	5,26E+05
	13	34	14	2,67E+05
GaM 150mg + RFP 1mg	9	1	1	4,82E+04
	14	3	4	9,20E+04
	14	22	37	3,20E+05
	19	25	19	2,76E+05
	64	47	58	7,41E+05

Tabela 2. Dados de baciloscopia a cada 20 campos e total de bacilos por pata para os 26 animais avaliados na segunda eutanásia (D240). RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

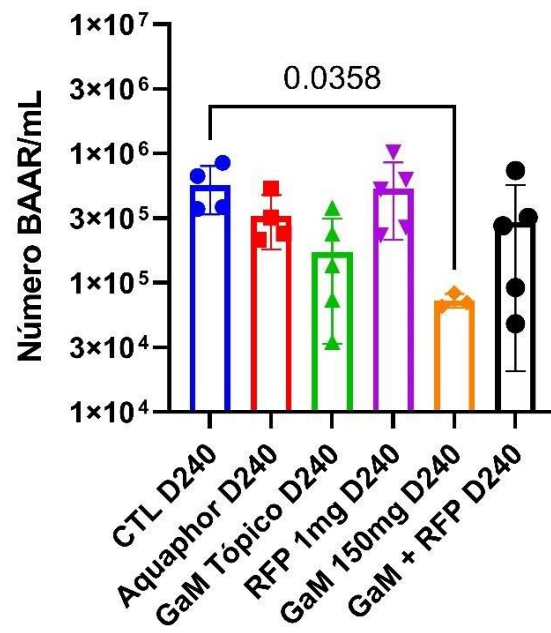


Figura 7. Comparação dos dados de baciloscopia entre os grupos tratados e o grupo controle na segunda eutanásia (D240) por teste ANOVA com limite de significância de valor de p-valor < 0,05. BAAR: bacilo álcool-ácido resistente; CTL: controle; RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio; Fonte: elaborado pelo autor

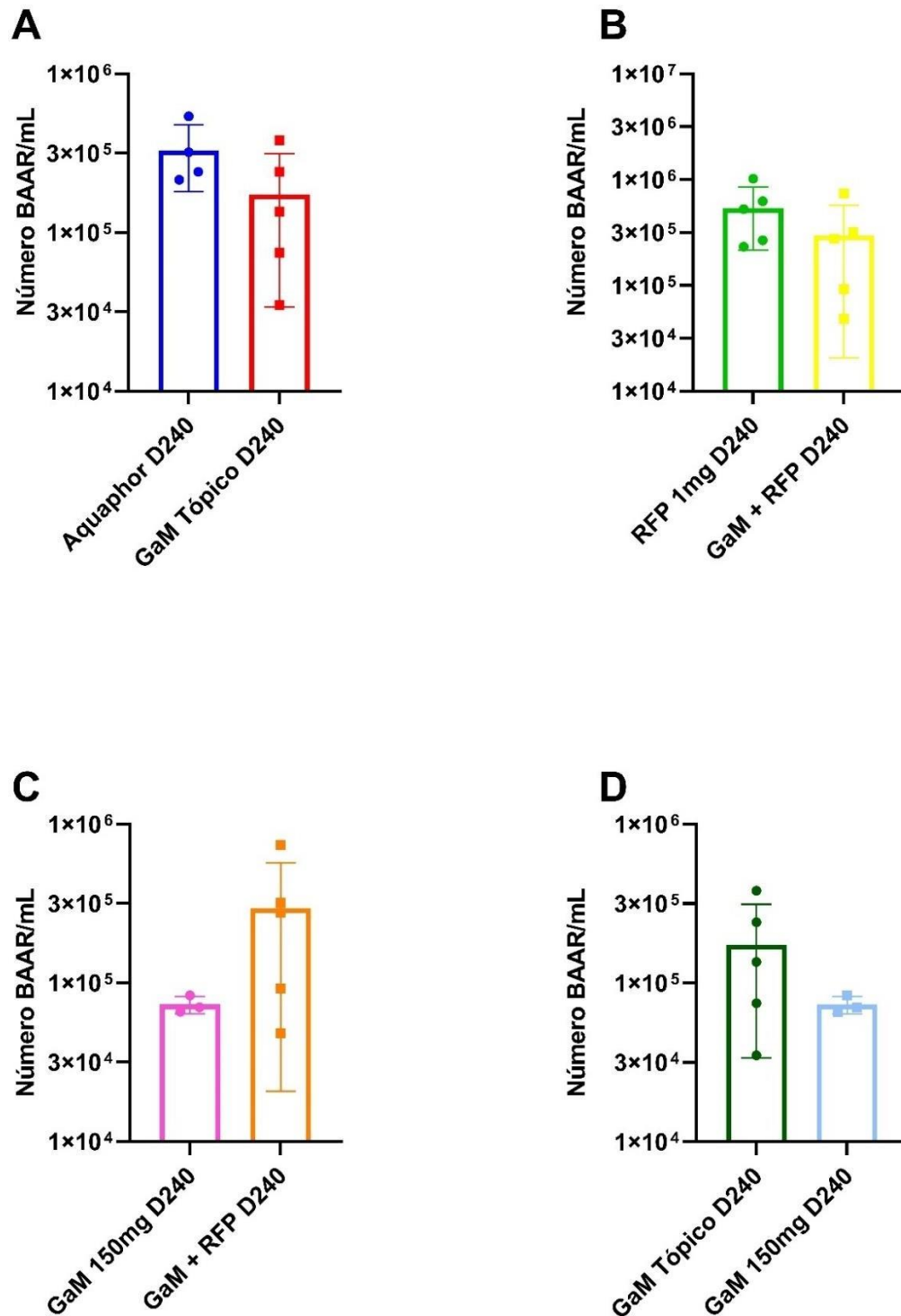


Figura 8. Gráficos das comparações dos dados de baciloscopia entre os tratamentos na segunda eutanásia (D240). Gráfico A: comparação entre o tratamento com Aquaphor (placebo) e GaM tópico. Gráfico B: comparação entre o tratamento de rifampicina 1mg/kg/semana. Gráfico C: comparação entre o tratamento com GaM oral 150mg/kg/dia e GaM oral 150mg/kg/dia associado à rifampicina 1mg/kg/semana. Gráfico D: comparação entre o tratamento com GaM tópico e GaM oral 150mg/kg/dia. Análises por teste T para amostras paramétricas e teste de Mann-Whitney para amostras não paramétricas, com limite de significância de p-valor < 0,05. BAAAR: bacilo álcool-ácido resistente; RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

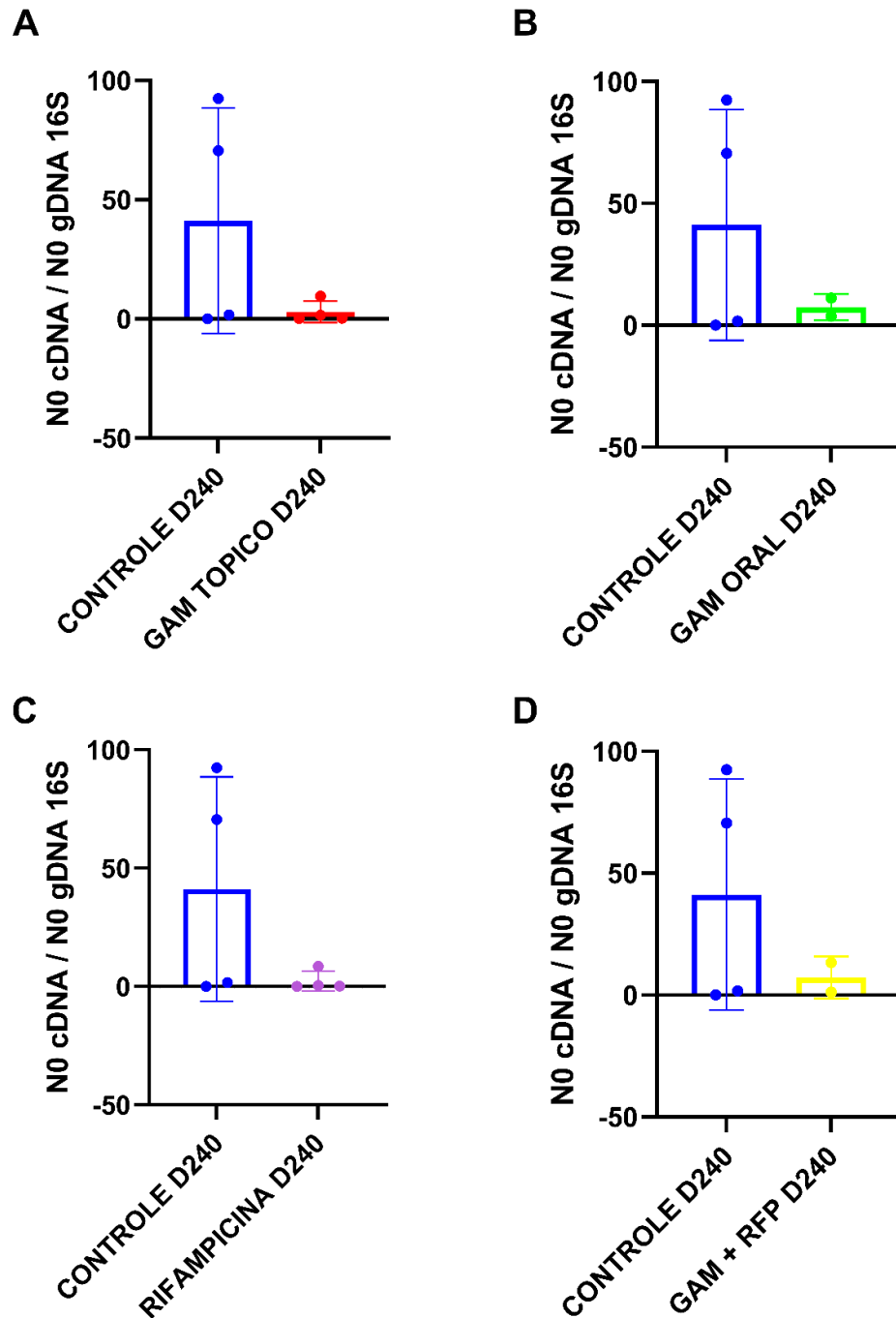


Figura 9. Gráficos da comparação dos dados de viabilidade molecular obtidos pela normalização do N0 da reação de amplificação por qPCR para cDNA de 16S pelo N0 do respectivo gDNA para a segunda eutanásia (D240). A: Comparação de viabilidade entre GaM Tópico e Controle; B: Comparação de viabilidade entre GaM Oral e Controle; C: Comparação de viabilidade entre Rifampicina e Controle; D: Comparação de viabilidade entre GaM Oral associado a Rifampicina e Controle. RFP: Rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

4.3. Eutanásia 3 – D330

Na terceira eutanásia realizamos os experimentos aos 330 dias após o início do protocolo com 23 camundongos (Figura 10). Nos grupos tratados com RFP e GaM + RFP, a carga bacilar foi zerada para boa parte dos animais. Entretanto, quando comparados ao controle, nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 11). Com relação aos grupos relacionados pelo tipo de tratamento, houve diferença estatisticamente significativa entre o maltolato de gálio oral associado com rifampicina e maltolato de gálio oral, com p-valor = 0,0286 (Figura 12C).

Neste tempo, os dados de viabilidade molecular mostram que, embora sem significância estatística, os grupos tratados voltam a ter níveis de bacilos viáveis maiores quando comparados ao grupo controle (Figura 13).

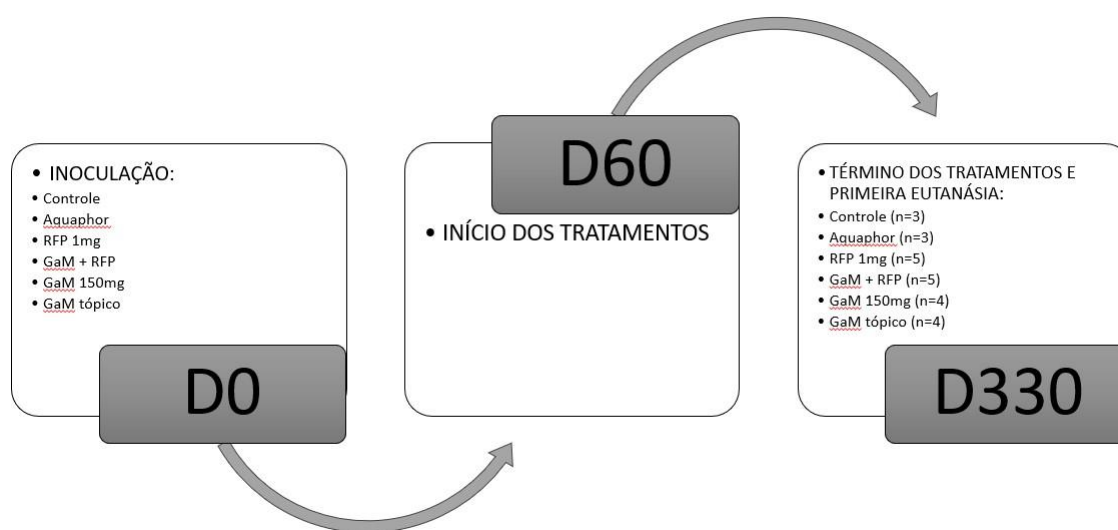


Figura 10. Representação gráfica do experimento da terceira eutanásia (D330) com a distribuição dos 23 animais por grupo. RFP: Rifampicina; GaM: Maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

GRUPO	EUTANÁSIA 3			TOTAL
	BAAR/20 campos	BAAR/20 campos	BAAR/20 campos	
CONTROLE	16	30	56	4,47E+05
	16	15	34	2,85E+05
	33	31	24	3,86E+05
AQUAPHOR	0	0	3	1,31E+04
	12	11	14	1,62E+05
	14	26	103	6,27E+05
GaM TÓPICO	58	107	79	1,07E+06
	4	6	6	7,01E+04
	18	14	82	5,00E+05
	1	3	10	6,14E+04
GaM 150mg	24	22	18	2,81E+05
	23	48	34	4,60E+05
	2	0	9	4,82E+04
	46	42	30	5,17E+05
RIFAMPICINA 1mg	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	1,31E+04
	0	0	0	0,00E+00
	0	0	0	0,00E+00
	0	0	0	0,00E+00
GaM 150mg + RFP 1mg	0	0	1	4,38E+03
	0	0	2	8,77E+03
	0	0	0	0,00E+00
	0	0	0	0,00E+00

Tabela 3. Dados de baciloscopia a cada 20 campos e total de bacilos por pata para os 23 animais avaliados na terceira eutanásia (D330). RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

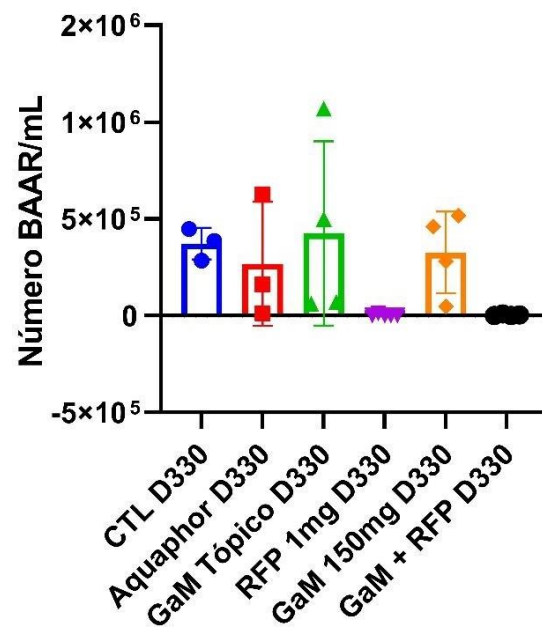


Figura 11. Comparação dos dados de baciloscopia entre os grupos tratados e o grupo controle na terceira eutanásia (D330) por teste ANOVA com limite de significância de valor de p-valor < 0,05. BAAR: bacilo álcool-ácido resistente; CTL: controle; RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

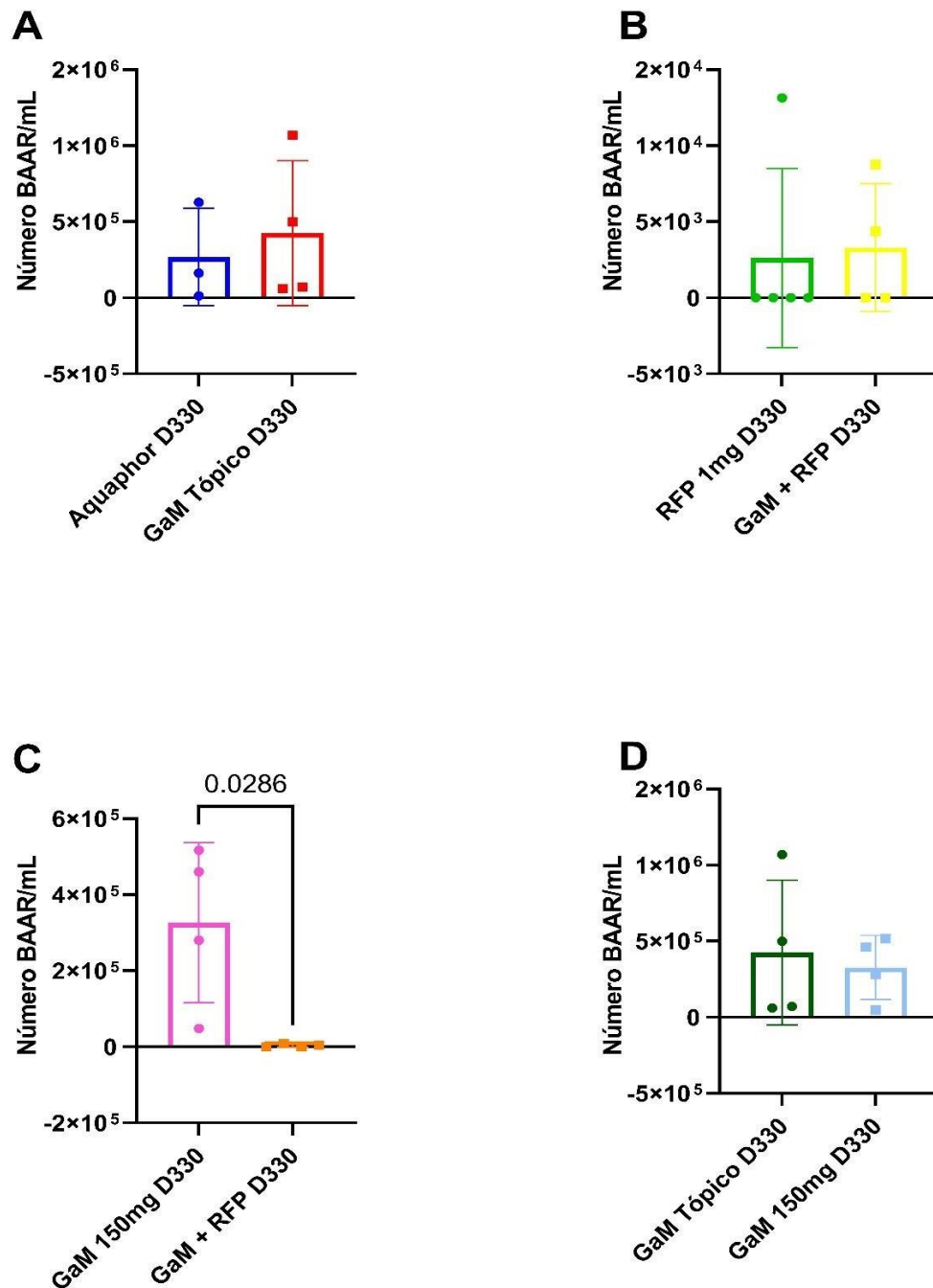


Figura 12. Gráficos das comparações dos dados de baciloscopia entre os tratamentos na terceira eutanásia (D330). Gráfico A: comparação entre o tratamento com Aquaphor (placebo) e GaM tópico. Gráfico B: comparação entre o tratamento de rifampicina 1mg/kg/semama e GaM oral 150mg/kg/dia associado à rifampicina 1mg/kg/semama. Gráfico C: comparação entre o tratamento com GaM oral 150mg/kg/dia e GaM oral 150mg/kg/dia associado à rifampicina 1mg/kg/semama. Gráfico D: comparação entre o tratamento com GaM tópico e GaM oral 150mg/kg/dia. Análises por teste T para amostras paramétricas e teste de Mann-Whitney para amostras não paramétricas com limite de significância de p-valor < 0,05. BAAR: bacilo álcool-ácido resistente; RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

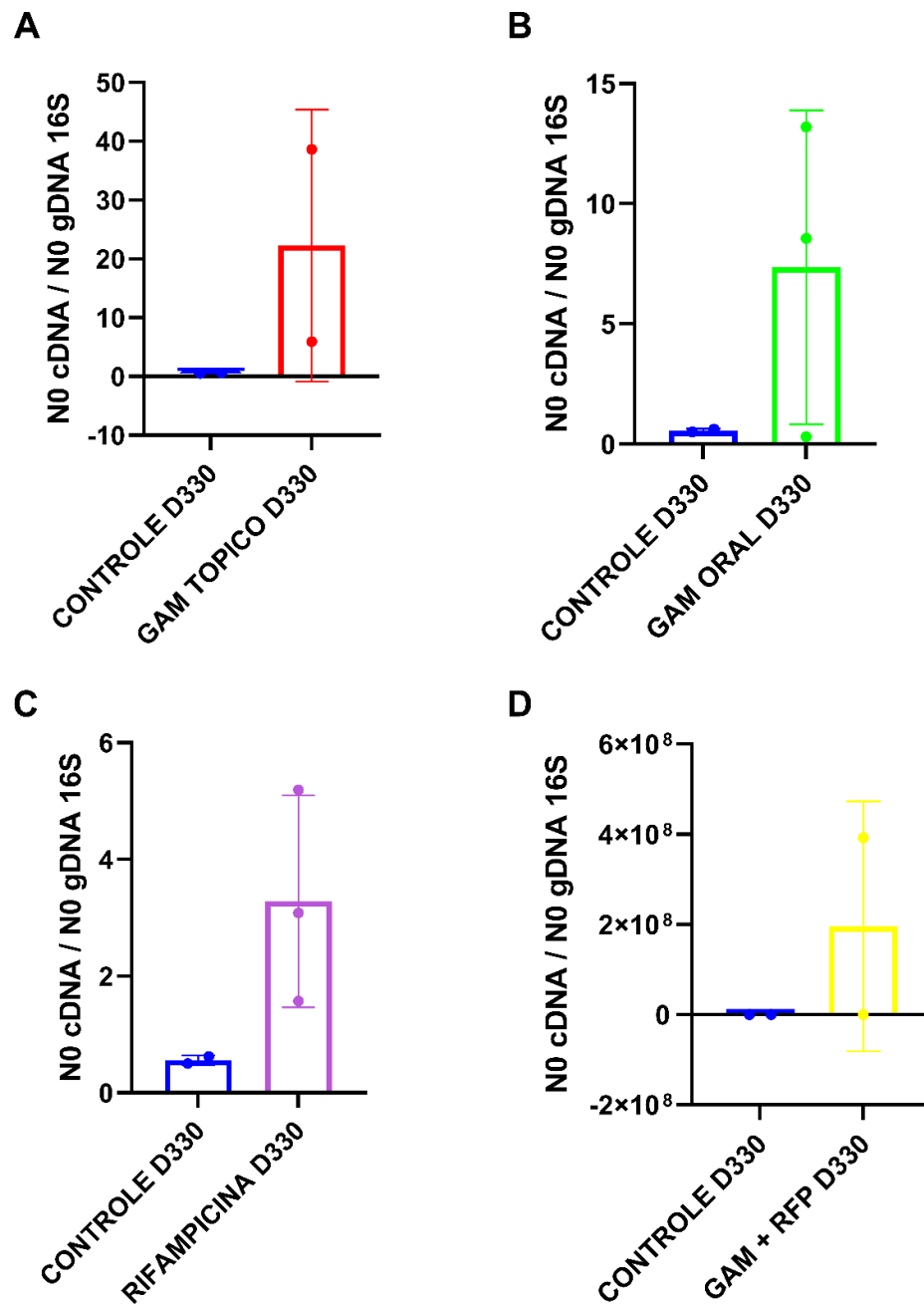


Figura 13. Gráficos da comparação dos dados de viabilidade molecular obtidos pela normalização do N0 da reação de amplificação por qPCR para cDNA de 16S pelo N0 do respectivo gDNA para a terceira eutanásia (D330). A: Comparação de viabilidade entre GaM Tópico e Controle; B: Comparação de viabilidade entre GaM Oral e Controle; C: Comparação de viabilidade entre Rifampicina e Controle; D: Comparação de viabilidade entre GaM Oral associado a Rifampicina e Controle. RFP: Rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

As médias da baciloscopia e da viabilidade molecular dos diferentes tempos para cada grupo estão representadas nas figuras 14 e 15, respectivamente, a fim de possibilitar uma melhor visualização do comportamento desses dados no decorrer do experimento para cada um dos tratamentos.

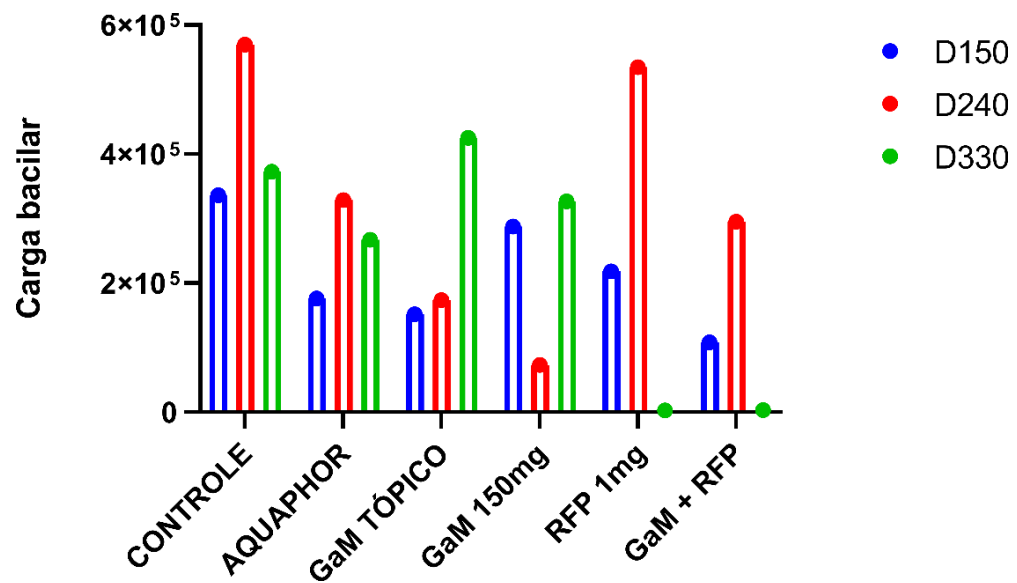


Figura 14. Representação gráfica das médias de baciloscopia para os 3 tempos de tratamento (D150, D240 e D330) para os seis grupos avaliados (controle, Aquaphor, GaM tópico, GaM 150, RFP e GaM + RFP). RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

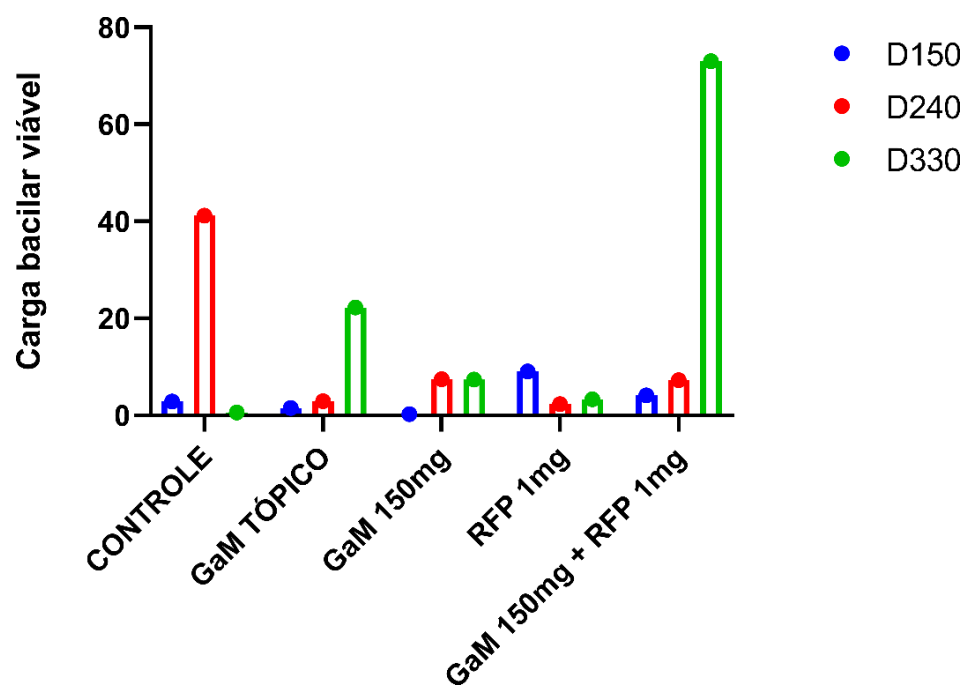


Figura 15. Representação gráfica das médias da viabilidade bacilar para os 3 tempos de tratamento (D150, D240 e D330) para os seis grupos avaliados (controle, GaM tópico, GaM 150, RFP e GaM + RFP). RFP: rifampicina; GaM: maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

4.4. Modelo *in vitro*

No modelo *in vitro* com células IDE8 com a cepa referência Thai 53, a adição de 50µg/mL de maltolato de gálio reduziu significativamente a carga bacilar p -valor = 0,0007 (Figura 16). Para a cepa portadora do SNP tipo 4, embora a adição de GaM também tenha reduzido a quantidade de bacilos após 2 meses, esta não foi significativa ($p = 0,09$) (Figura 16).

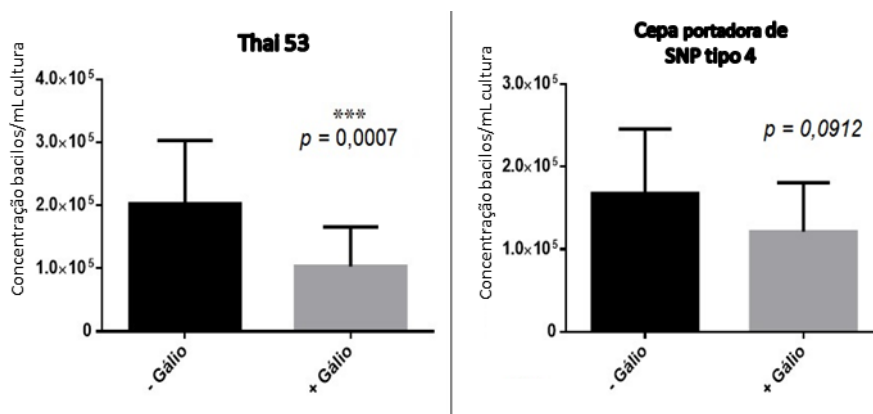


Figura 16. Comparação entre as concentrações de bacilo por volume de cultura celular em células infectadas com as cepas Thai 53 ou cepa portadora do SNP tipo 4, submetidas (+ Gálio) ou não (- Gálio) a adição de 50ug/mL de maltolato de gálio. Fonte: elaborado pelo autor

5. DISCUSSÃO

A investigação de novas drogas em hanseníase constitui em desafio dada às limitações técnicas para investigação da viabilidade do *M. leprae*. A técnica desenvolvida por Charles Shepard é até os dias de hoje o padrão ouro para esta investigação, no entanto, esta está limitada à quantificação bacilar sem dados precisos sobre a viabilidade do microrganismo. Shepard a partir dos seus estudos descreve que camundongos imunocompetentes inoculados com 5×10^3 bacilos apresentam recuperação de 2×10^5 a 2×10^6 microrganismos após 150 a 200 dias (Shepard, 1971). Partindo dessa premissa, e baseado na redução estatisticamente significativa da baciloscopia para o tratamento com maltolato de gálio oral na segunda eutanásia, é razoável supor o efeito bacteriostático desse composto, quando administrado oralmente, sobre o *M. leprae*. Para este tempo, apenas no grupo que recebeu este tratamento todos os animais apresentaram quantidade de bacilos abaixo do valor limite de replicação de 2×10^5 bacilos.

A significativa redução do número de bacilos observada em nosso modelo *in vitro* para a cepa Thai 53 reforça os dados obtidos *in vivo* sobre o papel do maltolato de gálio na replicação do *M. leprae*. Para a cepa portadora do SNP tipo 4, resistente à dapsona e rifampicina, apesar de observarmos uma redução no número de bacilos na cultura tratada, esta não foi significativa. Este resultado pode sugerir que a mudança do genótipo promove maior resistência bacteriana também contra este composto.

Para a avaliação da replicação do *M. leprae* nas diferentes condições estudadas utilizamos a baciloscopia, considerada padrão ouro na hanseníase. Entretanto, esta técnica é limitada a quantificação bacilar, uma vez que o tempo para a eliminação do bacilo após a sua morte (*clearance* bacilar) não permite uma avaliação fidedigna da sua viabilidade por meio desta técnica. Assim, a fim de melhor compreender o efeito do maltolato de galio sobre o *M. leprae*, utilizamos um ensaio molecular utilizando regiões genômicas específicas para o RNA ribossômico 16S do bacilo, adaptado de Williams *et al.* (2009), a partir da técnica descrita e adaptada de Ruijter *et al.* (2009). O gene 16S foi descrito como expresso em altas quantidades quando o *M. leprae* está em fase de crescimento

em camundongos atímicos, sendo bastante utilizado em protocolos de quantificação de viabilidade molecular do bacilo (Cox *et al.*, 1991). Os dados de viabilidade molecular aqui obtidos para o grupo controle demonstram que a maior viabilidade foi atingida na segunda eutanásia, o que está de acordo com o esperado considerando o tempo da curva de crescimento descrita para este microrganismo (Shepard, 1971). Curiosamente, este perfil não foi observado para nenhum dos grupos tratados, o que denota uma mudança na curva de crescimento do bacilo associada aos tratamentos feitos. Na segunda eutanásia todos os grupos aparecem com viabilidade inferior à do controle indicando atraso na replicação bacilar, que parece ser retomado na terceira eutanásia, onde todos os grupos tratados ultrapassam os valores de viabilidade do controle.

O gálio é um metal trivalente que compartilha propriedades com o ferro e tem capacidade de competir com este pela ligação com as suas proteínas carreadoras, como a transferrina, diminuindo assim o ferro biodisponível para as células. Como diversas células e microrganismos necessitam de ferro para manter sua homeostasia, a redução do ferro biodisponível pode causar morte celular (Chitambar, 2016). O ferro é elemento fundamental para o desenvolvimento bacteriano (Cole *et al.* 1998). As micobactérias secretam sideróforos, denominados micobactinas, com finalidade de sequestrar o ferro em uma competição com o hospedeiro. Matzanke *et al.* (1996) descreveram que, quando a micobactéria se encontra em um ambiente com quantidades suficientes em ferro, este é acumulado na sua proteína de estoque bacterioferritina (Andrews *et al.* 2003). No nosso estudo, a dieta oferecida aos animais com redução de ferro em sua composição (25ppm), quando comparada à ração tradicionalmente utilizada para camundongos (180ppm), é uma forma de controlar a quantidade de ferro disponível no organismo do animal viabilizando a investigação dos efeitos da competição entre gálio e ferro.

Giacani *et al.* 2019 investigaram o efeito do uso tópico do maltolato de gálio sobre a lesão causada pelo *Treponema spp.* em modelo experimental com coelhos. Os achados demonstraram um efeito bactericida com redução das lesões, e sugeriram que o uso tópico associado ao tratamento padrão com azitromicina acelera o *clearance* bacteriano. Nossos resultados em relação aos

animais que receberam tratamento com maltolato de gálio tópico mostram estabilidade na infecção até a segunda eutanásia, com manutenção da carga bacilar em níveis inferiores a 2×10^5 na maioria dos animais.

Após 6 meses de inoculação e com 5 meses de tratamento com esta mesma dose de rifampicina (1mg/kg/semana), Lobato *et al.* (2014) encontraram cargas bacilares semelhantes às que encontramos na segunda eutanásia. A rifampicina é altamente eficaz contra o *M. leprae* e outras micobactérias, como o *M. tuberculosis*, e sua concentração inibitória mínima (MIC) varia de 0,1 µg/mL a 0,2 µg/mL (Blanchard, 1996). Shepard (1973) descreve que, em modelos experimentais, a dose recomendada para tratamento da hanseníase é de 10 a 40 mg/kg, podendo uma dose única ser eficiente para combater o *M. leprae* enquanto, em humanos, a dose diária é de 600mg/dia. Considerando a premissa de Sheppard (1971), nossos dados sugerem que o maltolato de gálio apresentou efeito superior a esta subdose de rifampicina até o tempo da segunda eutanásia. Curiosamente, na terceira eutanásia, mesmo em subdose, a rifampicina foi capaz de zerar a carga bacilar em todos os animais, enquanto no grupo tratado com maltolato de gálio oral observamos a retomada da replicação bacilar para a maioria dos animais.

O efeito do maltolato de gálio já foi investigado em diversos estudos com outros microrganismos (Fecteau *et al.* (2014); Hijazi *et al.* (2018); Bernstein (2020); Sampieri *et al.* (2014); Giacani *et al.* (2019); Chua *et al.* (2006); Chitambar (2018).). Fecteau *et al.* (2014) investigaram a atividade do gálio na forma de maltolato e nitrato sobre o *Mycobacterium avium* e encontraram inibição dose-dependente. Os dados deste estudo indicaram ainda que este efeito foi mais eficaz com o maltolato quando comparado ao nitrato de gálio, corroborando com nossos dados.

Hijazi *et al.* (2018) avaliaram o potencial bactericida do maltolato de gálio contra patógenos ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Foram testadas 24 cepas diferentes, em 3 diferentes meios de cultura, sendo dois deles com redução de ferro em sua composição. Todos os microrganismos foram resistentes ao maltolato de gálio, independentemente dos

meios e de suas cepas. O maltolato de gálio também foi submetido a testes para avaliação de potencial viricida sobre o SARS-CoV-2. A cultura de célula utilizada para infecção viral, e previamente tratada com o composto em estudo, apresentou 50% de inibição da replicação viral (Bernstein, 2020). Sampieri *et al.* (2014) investigaram o efeito do maltolato de gálio sobre *Lawsonia intracellularis*, bactéria intracelular obrigatória, causadora de lesões do trato gastrointestinal em animais. O efeito do maltolato de gálio foi comparado ao fármaco padrão usado neste tipo de lesão e, interessante, os dois apresentaram a mesma eficácia. Os resultados acima compilados chamam a atenção pelo fato de que o efeito dos compostos de gálio parece ser potencializado em microrganismos intracelulares.

Como o ferro é fator essencial para a replicação e diferenciação de todas as células, a sua substituição pelo gálio acarreta prejuízo para a função celular (Zhang *et al.* 2022). Assim, além do potencial antibacteriano, os compostos de gálio são explorados quanto ao potencial anti-tumoral e anti-inflamatório. Suspeita-se que o maltolato de gálio esteja envolvido com a desregulação de células T inflamatórias e macrófagos, com possível interferência das metaloproteinases (Wu *et al.* 2015). Compostos derivados de gálio também têm demonstrado potencial anti-inflamatório por modular a produção de óxido nítrico e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF. Além disso, diversos compostos de ferro possuem capacidade pró-inflamatória, o que confirma o potencial anti-inflamatório dos compostos de gálio (Chitambar, 2016). O caráter granulomatoso da hanseníase pressupõe a ocorrência de um infiltrado de células inflamatórias para combater o agente causador. Nesse contexto, o efeito dos compostos de gálio modulando a inflamação, aliado ao efeito bacteriostático aqui observado, deve ser mais bem avaliado.

Estudos indicam ainda possível efeito dos compostos de gálio no tratamento do câncer, como no carcinoma hepatocelular, visto que o gálio é um metal de baixa toxicidade, evitando efeitos de seu acúmulo no fígado (Chua *et al.* 2006). Além disso, seu efeito inibidor sobre o desenvolvimento de glioblastomas, o mais comum tumor maligno de cérebro, foi constatado em modelos *in vitro*, e testado *in vivo* em ratos com o tumor já estabelecido,

mostrando a eficácia do maltolato de gálio no retardo do desenvolvimento deste tipo de câncer (Chitambar *et al.* 2018).

Nosso estudo é pioneiro na avaliação do efeito da administração oral do maltolato de gálio em modelo experimental de doenças infecciosas. Nossos resultados demonstraram que o uso do maltolato de gálio controla a infecção por tempo determinado, mas não foi capaz de eliminar o bacilo, sendo assim uma droga com potencial bacteriostático sobre a replicação do *M. leprae*. Importante salientar a necessidade da avaliação do efeito anti-inflamatório do uso tópico do maltolato de gálio sobre lesões de hanseníase como uma ação adjuvante deste composto, bem como de outros compostos de gálio. Por fim, os dados aqui obtidos reforçam a importância das vias da homeostasia do ferro como alvos terapêuticos para uso em doenças infecciosas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluirmos que:

- a administração oral do maltolato de gálio na dose avaliada apresentou efeito bacteriostático sobre a replicação do *M. leprae* em modelo experimental de Shepard;
- a administração tópica do maltolato de gálio sobre a replicação do *M. leprae* em modelo experimental de Shepard apresentou efeito sobre o crescimento deste microrganismo similar ao observado para a administração oral;
- a adição de maltolato de gálio reduziu a infecção com *M. leprae* em cultura de células IDE8 provenientes de carrapatos.

7. REFERÊNCIAS

- Abel L, Sánchez FO, Oberti J *et al.* Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998; 177(1):133-145.
- Adams LB. Susceptibility and resistance in leprosy: Studies in the mouse model. *Immunol Rev.* 2021;301(1): 157-174.
- Barbosa MGM, Prata RBS, Andrade PR *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase and Iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes and Infection.* 2017;19(11):505-514.
- Bernstein LR, Zhang L. Gallium maltolate has in vitro antiviral activity Against SARS-CoV-2 and is a potential treatment for COVID-19. *Antivir Chem Chemoter.* 2020.
- Bernstein, L.R. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50:665–682.
- Chavez-Alvarez S, Herz-Ruelas M, Ocampo-Candiani J, Gomez-Flores M. Type 2 leprosy reaction resembling Sweet syndrome: Review of new and published cases. *Australas J Dermatol.* 2020;61(2):234-237.
- Chitambar CR. Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(8):2044-53.
- Chitambar CR. Gallium Complexes as Anticancer Drugs. *Met Ions Life Sci.* 2018;18.
- Chua MS, Bernstein LR, Li R, So SKS. Gallium maltolate is a promising chemotherapeutic agent for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2006;26(3A):1739-43.
- Collins JH, Lenz SM, Ray NA, Balagon MF, Hagge DA, Lahiri R, Adams LB. A Sensitive and Quantitative Assay to Enumerate and Measure *Mycobacterium leprae* Viability in Clinical and Experimental Specimens. *Curr Protoc.* 2022;2(2).
- Cox RA, Kempell K, Fairclough L, Colston MJ. The 16S ribosomal RNA of *Mycobacterium leprae* contains a unique sequence which can be used for identification by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol.* 1991 Nov;35(5):284-90.
- Davis GL, Ray NA, Lahiri R, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Williams DL, Adams LB. Molecular assays for determining *Mycobacterium leprae* viability in tissues of experimentally infected mice. *PloS Negl Trop Dis.* 2013;7(8).

Ebenezer GJ, Scollard DM. Treatment and Evaluation Advances in Leprosy Neuropathy. *Neurotherapeutics*. 2021;18(4):2337-2350.

Fecteau ME, Aceto HW, Bernstein LR, Sweeney RW. Comparison of the antimicrobial activities of gallium nitrate and gallium maltolate Against *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in vitro. 2014;202(1):195-7.

Ferreira JDS, Souza Oliveira DA, Santos JP, Ribeiro CCDU, Baêta BA, Teixeira RC, Neumann ADS, Rosa PS, Pessolani MCV, Moraes MO, Bechara GH, de Oliveira PL, Sorgine MHF, Suffys PN, Fontes ANB, Bell-Sakyi L, Fonseca AH, Lara FA. Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. 2018;12(12).

Frehel C, Canonne-Hergaux F, Gros P *et al.* Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of *Mycobacterium avium* –containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages. *Cell Microbiol*. 2002; 4(8): 541-546.

Gangaidzo IT, Moyo VM, Mvundura E *et al.* Association of Pulmonary Tuberculosis with Increased Dietary Iron. *J Infect Dis*. 2001;184(7):936–9.

Giacani L. *et al.* Topical treatment with gallium maltolate reduces *Treponema pallidum* subsp. *Pertenue* burden in primary experimental lesions in a rabbit model of yaws. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Jan 2;13(1).

Hartmann, G., Honikel, K. O., Knusel, F., and Niesch, J. (1967). *Biochimica et Biophysica Acta*, 145, 843.

Hijazi S, Visaggio D, Pirolo M, Frangipani E, Bernstein L, Visca P. Antimicrobial Activity of Gallium Compounds on ESKAPE Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; Sep 10;8:316.

Jakupec MA, Keppler BK. Gallium in cancer treatment. *Curr Top Med Chem*. 2004;4(15):1575-83.

Katoch K, Natrajan M, Yadav VS, Bhatia AS. Response of leprosy patients with single lesions to MDT. *Acta Leprol* 1995; 9:133-13.

Khanolkar VR. Studies in the histology of early lesions in leprosy. *Lepr India* 1952; 24: 62- 77.

Kulkarni VM, Seydel JK. Inhibitory activity and mode of action of diaminodiphenylsulfone in cell-free folate-synthesizing systems prepared from *Mycobacterium lufu* and *Mycobacterium leprae*. A compadrios. *Chemotherapy*. 1983;29(1):58-67.

Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1998 May;36(5):1352-5.

Lagrange PH, Abel L. The genetic susceptibility to leprosy in humans. *Acta Leprol.* 1996;10(1):11-27.

Lobato LS, Rosa PS, Ferreira Jda S, Neumann Ada S, da Silva MG, do Nascimento DC, Soares CT, Pedrini SC, Oliveira DS, Monteiro CP, Pereira GM, Ribeiro-Alves M, Hacker MA, Moraes MO, Pessolani MC, Duarte RS, Lara FA. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. 2014;58(10):5766-74.

Lounis N, Truffot-Pernot C, Grosset J et al. Iron and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Virol.* 2001;20(3):123–6.

Manta FSN, Jacomasso T, Rampazzo RCP, Moreira SJM, Zahra NM, Cole ST, Avanzi C, Leal-Calvo T, Vasconcellos SEG, Suffys P, Ribeiro-Alves M, Krieger MA, Costa ADT, Moraes MO. Development and validation of a multiplex real-time qPCR assay using GMP-grade reagents for leprosy diagnosis. *Plos Negl Trop Dis.* 2022;16(2).

Martindale. The complete drug reference. 32th Taunton, Massachusetts. Pharmaceutical Press, 1999. p. 242-247.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, Williams DL. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2124-30.

Matzanke BF, Bohnke R, Mollmann U, Reissbrodt R, Schunemann V, Trautwein AX. Iron uptake and intracellular metal transfer in mycobacteria mediated by xenosiderophores. *BioMetals.* 1997;(10):193-203.

Ministério da Saúde. NOTA INFORMATIVA Nº 51, DE 2015 CGHDE/DEVIT/SVS/MS; 2015. 5 p. Available from: https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/202004/notainformativa51recidivaresisteinsuficienciamedicamentosanahanseniaise.pdf

Ministério da Saúde. NOTA TÉCNICA Nº 16/2021-CGDE/.DCCI/SVS/MS; 2021. 5 p. Available from: https://www.conass.org.br/wp-content/uploads/2021/07/SEI_MS-0020845770-Nota-Te%CC%81cnica-16.pdf

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofo V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. *Science.* 2005 May 13;308(5724):1040-2.

Organização Mundial da Saúde. Monitoring and Evaluation Guide. Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world; 2017. 110p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf>

Pearson JM, Waters MF. Experimental and clinical studies on rifampicin in treatment of leprosy. *Br Med J*. 1970 Jan 10;1(5688):89-92.

Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, de Almeida Esquenazi D, Pessolani MCV, Sarno EN. Innate Immune Responses in Leprosy. *Front Immunol*. 2018; 28;9:518.

Pönnighaus JM. Diagnosis and management of single lesions in leprosy. *Lepr Rev* 1996;67:89-94.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255-73.

Ruijter JM, Pfaffl MW, Zhao S, Spiess NA, Boggy G, Blom J, Rutledge RG, Sisti D, Lievens A, Preter KD, Derveaux S, Hellemans J, Vandesompele J. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision and implications. *Methods*. 2013;59(1):32-46.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6):45.

Sampieri F, Allen AL, Alcorn J, Clark CR, Vannucci FA, Pusterla N, Mapes SM, Ball KR, Dowling PM, Thompson J, Bernstein LR, Gebhart CJ, Hamilton DL. Efficacy of gallium maltolate against *Lawsonia intracellularis* infections in a rabbit model. 2014;37(6):571-8.

Shepard CC. Chemotherapy of leprosy. *Annu Rev Pharmacol*. 1969;9: 37-50.
Shepard CC. The first decade in experimental leprosy. *Bull World Health Organ*. 1971;44(6):821-7.

Shetty VP, Antia NH, Jacobs JM. The pathology of early leprosy. *J Neur Science*. 1988; 88: 115-31.

Silva BJ, Barbosa MG, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA, Côrte-Real S, da Silva GM, Rosa PS, Fabri M, Sarno EN, Pinheiro RO. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog*. 2017;13(1).

Souza VNB, Malaspina TSS, Campanelli AP *et al*. Increased hepcidin expression in multibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(SUPPL.1):183–189.

Tajalli M, Wambier CG. Lucio's Phenomenon. *N Engl J Med*. 2021;384(17):1646.

Talhari S, Neves RG. Hanseníase. 3ª ed. Manaus: ISEA, 1997.

Trombone AP, pedrini SC, Diório SM, Belone ADE F, Fachin LR, DO Nascimento DC, Rosa PS. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp*. 2014; 23(85).

Turankar RP, Pandey S, Lavania M, Singh I, Nigam A, Darlong J, Darlong F, Sengupta U. *Int J Mycobacteriol*. 2011;4(1):54-9.

Umezawa H, Mizuno S, Yamazaki H, Nitta K. Inhibition of DNA-dependent RNA synthesis by rifamycins. *J Antibiot (Tokyo)*. 1968 Mar;21(3):234-6.

Walker SL, Lockwood DN. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev*. 2008;79(4):372-86.

Waters MF, Niven JS. Experimental infection of the ear and foot pad of the golden hamster with *Mycobacterium leprae*. *Br J Exp Pathol*. 1966 Feb;47(1):86-92.

Welch TM, Gelber RH, Murray LP, Ng H, O'Neill SM, Levy L. Viability of *Mycobacterium leprae* after multiplication in mice. *Infect Immun*. 1980;30(2): 325-328.

World Health Organization (WHO) Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes – Report of a WHO Study Group. WHO: Geneva; 1982. [2017 Dec 18]. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/38984>. [Google Scholar].

World Health Organization (WHO) Multidrug Therapy against Leprosy Development and Implementation over the Past 25 Years. Geneva: WHO; 2004. [Google Scholar].

World Health Organization (WHO). Global Leprosy Update, 2021: moving towards interruption of transmission. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 97, n. 36, p. 429-452.

World Health Organization (WHO). Weekly epidemiological record [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017. 22 p. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255149/1/WER9217.pdf>.

Wu X, Wang TW, Lessmann GM, Saleh J, Liu X, Chitambar CR, Hwang ST. Gallium maltolate inhibits human cutaneous T-cell lymphoma tumor development in mice. *J Invest Dermatol*. 2015;135(3):877-884.

Zhang C, Yang B, Biazik JM, Webster RF, Xie W, Tang J, Allieux FM, Abbasi R, Mousavi M, Goldys EM, Kilian KA, Chandrawati R, Esrafilzadeh D, Kalantar-

Zadeh K. Gallium Nanodroplets are Anti-Inflammatory without Interfering with Iron Homeostasis. *ACS Nano*. 2022 Jun 28;16(6):8891-8903.