



Avaliação do perfil de citocinas séricas e óxido nítrico na hanseníase experimental murina

Evaluation of the serum cytokines profile and nitric oxide in experimental murine leprosy

Evaluación del perfil sérico de citoquinas y óxido nítrico en la lepra experimental murina

Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa^{ID^{1,2}}, Thayna Sosolote Lima^{ID²}, Beatriz Gomes Carreira Sartori^{ID²}, Suzana Madeira Diório^{ID²}, Sônia Maria Usó Ruiz Silva^{ID²}, Vania Nieto Brito-de-Souza^{ID²}, Maria Renata Sales Nogueira^{ID²}, Patrícia Sammarco Rosa^{ID²}, Sílvia Cristina Barboza Pedrini^{ID³}, Fátima Regina Vilani-Moreno^{ID²}

COMO CITAR ESSE ARTIGO:

Barbosa ASAA, Lima TS, Sartori BGC, Diório SM, Silva SMUR, Brito-de-Souza VN, Nogueira MRS, Rosa PS, Pedrini SCB, Vilani-Moreno FR. Avaliação do perfil de citocinas séricas e óxido nítrico na hanseníase experimental murina. *Hansen. Int.* 2024;49:e39344. doi: <https://doi.org/10.47878/hi.2024.v49.39344>

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa
Instituto Lauro de Souza Lima
E-mail: drisierra@hotmail.com.

EDITOR CHEFE:

Dejair Caitano do Nascimento

RECEBIDO EM: 06/07/2023

ACEITO EM: 21/12/2023

PUBLICADO EM: 17/01/2024

¹ Faculdade de Tecnologia de Bauru – FATEC, Bauru, São Paulo – SP, Brasil.[ROR](#)

² Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo – SP, Brasil.[ROR](#)

³ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo – SP, Brasil.[ROR](#)

RESUMO

Introdução: a hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um parasita intracelular obrigatório. Assim, a resistência do hospedeiro a esse patógeno depende da imunidade celular. O uso de modelos experimentais tem permitido o estudo da hanseníase do ponto de vista imunológico, microbiológico e terapêutico, entretanto, as diferenças na progressão da infecção entre os modelos mais empregados (camundongos imunocompetentes, BALB/c, e camundongos congenitamente atímicos, *nude*) são pouco estudadas. **Objetivo:** comparar a evolução



da infecção pelo *M. leprae* em camundongos BALB/c e *nude* quanto à multiplicação bacilar e avaliação do perfil inflamatório sistêmico pela quantificação sérica de citocinas e óxido nítrico (NO). **Métodos:** os camundongos foram inoculados com *M. leprae* nos coxins plantares e avaliados aos 3, 5 e 8 meses após a infecção. **Resultados:** camundongos *nude* apresentaram multiplicação bacilar progressiva nos coxins plantares. Em camundongos BALB/c, o número de bacilos foi maior aos 5 meses. Em relação à quantificação de citocinas, nos camundongos BALB/c houve aumento de IL-2 e IL-17A e diminuição de IL-6 e NO aos 8 meses de inoculação. Nos camundongos *nude*, verificou-se o aumento do TNF aos 8 meses de inoculação e manutenção dos níveis de NO. **Conclusão:** os resultados encontrados sugerem que em camundongos BALB/c ocorre a ativação de uma resposta imune capaz de controlar a multiplicação do *M. leprae*, em contrapartida em camundongos *nude* a infecção é progressiva a despeito de altos níveis de TNF.

Palavras-chave: Hanseníase. Modelos Animais. Citocinas. Óxido Nítrico. Imunidade.

ABSTRACT

Introduction: leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), an obligate intracellular parasite. Thus, host resistance to this pathogen depends on cellular immunity. The use of experimental models has made it possible to study leprosy from an immunological, microbiological, and therapeutic point of view. However, the differences in the progression of the infection between the most used models (immunocompetent mice, BALB/c, and congenitally athymic mice, *nude*) have been little studied. **Objective:** to compare the evolution of *M. leprae* infection in BALB/c and *nude* mice in terms of bacillary multiplication and evaluation of the systemic inflammatory profile by quantifying serum cytokines and nitric oxide (NO). **Methods:** the mice were inoculated with *M. leprae* in the footpads and evaluated at 3, 5, and 8 months after infection. **Results:** *nude* mice showed progressive bacillary multiplication in the footpads. In BALB/c mice, the number of bacilli was higher at 5 months. In terms of cytokine quantification, BALB/c mice showed an increase in IL-2 and IL-17A and a decrease in IL-6 and NO at 8 months of inoculation. In the *nude* mice, there was an increase in TNF at 8 months of inoculation and maintenance of NO levels. **Conclusion:** the results suggest that BALB/c mice activate an immune response capable of controlling the multiplication of *M. leprae*, whereas in *nude* mice the infection is progressive despite high levels of TNF.

Keywords: Leprosy. Models, Animal. Cytokines. Nitric Oxide. Immunity.



RESUMEN

Introducción: la lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), un parásito intracelular obligado. Así pues, la resistencia del huésped a este patógeno depende de la inmunidad celular. La utilización de modelos experimentales ha permitido estudiar la lepra desde un punto de vista inmunológico, microbiológico y terapéutico. Sin embargo, las diferencias en la evolución de la infección entre los modelos más utilizados (ratones inmunocompetentes, BALB/c, y ratones congénitamente atímicos, nude) han sido poco estudiadas. **Objetivo:** comparar la evolución de la infección por *M. leprae* en ratones BALB/c y nude en términos de multiplicación bacilar y evaluación del perfil inflamatorio sistémico mediante la cuantificación de citoquinas séricas y óxido nítrico (NO). **Métodos:** los ratones fueron inoculados con *M. leprae* en las almohadillas plantares y evaluados a los 3, 5 y 8 meses tras la infección. **Resultados:** los ratones nudes mostraron una multiplicación bacilar progresiva en las almohadillas plantares. En los ratones BALB/c, el número de bacilos fue mayor a los 5 meses. En cuanto a la cuantificación de citoquinas, los ratones BALB/c mostraron un aumento de IL-2 e IL-17A y una disminución de IL-6 y NO a los 8 meses de la inoculación. En los ratones nude, se produjo un aumento del TNF a los 8 meses de la inoculación y un mantenimiento de los niveles de NO. **Conclusión:** los resultados sugieren que los ratones BALB/c activan una respuesta inmunitaria capaz de controlar la multiplicación de *M. leprae*, mientras que en los ratones nude la infección es progresiva a pesar de los altos niveles de TNF.

Palabras clave: Lepra. Modelos animales. Citoquinas. Óxido nítrico. Inmunidad.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa de amplo espectro clínico, frequente em países em desenvolvimento, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), uma micobactéria de forma bacilar álcool-ácido resistente (BAAR)¹.

O cultivo *in vitro* do bacilo é um desafio não superado, entretanto o desenvolvimento de modelos experimentais, como o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) e camundongos da linhagem BALB/c e congenitamente atímicos (*nude*) tem permitido o estudo da hanseníase do ponto de vista microbiológico, imunológico e terapêutico^{2,3}.

Em 1960, Shepard demonstrou que em camundongos da linhagem BALB/c a inoculação de 10⁴ bacilos no coxim plantar atingia um *plateau* de multiplicação em torno de oito meses e declínio um ano após a inoculação. O crescimento dos bacilos nesta linhagem é limitado e sem disseminação para outros tecidos e órgãos, por se tratarem animais imunocompetentes⁴.



Outro marco da hanseníase experimental foi a inoculação do *M. leprae* em camundongos *nude*, deficientes quanto à resposta imune mediada por linfócitos T, nos quais ocorrem intensa multiplicação bacilar e disseminação do bacilo para fígado e baço 18 meses após a inoculação inicial no coxim plantar^{5,6}.

O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório que apresenta predileção por células de Schwann e macrófagos, podendo levar a danos sensoriais e motores, devido à injúria nos nervos afetados induzindo a neuropatia com comprometimento e deformidades das mãos e pés⁷.

A fisiopatologia da hanseníase é influenciada por aspectos genéticos, imunológicos e ambientais que determinam a suscetibilidade individual ao bacilo. Ambas as respostas imunes, inata e adquirida, estão envolvidas no controle do bacilo, no entanto, estudos apontam para a correlação entre as formas clínicas da doença e o perfil de citocinas, deste modo, pacientes com a forma tuberculóide (TT), uma manifestação limitada da doença, exibem predomínio do perfil Th1 caracterizado pela produção de IL-2 e IFN- γ , enquanto os pacientes com a forma disseminada da hanseníase, chamada vichorwiana (VV), apresentam proeminência de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10)⁸.

Entre as formas TT e LL existe o grupo dimorfo com características clínicas, bacteriológicas e histopatológicas variáveis de acordo com o grau de resposta imune ao *M. leprae*⁹. Esses pacientes têm diferentes perfis de citocinas em suas lesões cutâneas, com predomínio do perfil Th1 em pacientes dimorfo tuberculóides (DT) e do perfil Th2 em pacientes dimorfo vichorwianos (DV)¹⁰.

Mais recentemente, estudos tem revelado que além do clássico paradigma Th1/Th2, existe a participação das células T regulatórias (Treg), Th9, Th17 e Th25, havendo a predominância do perfil Th1/Th9/Th17 no polo tuberculóide (TT/DT) e Th2/Treg/Th25 no polo virchowiano (VV/DV)¹¹⁻¹³.

Acredita-se que a resposta Th17 possa desempenhar um papel crítico na modulação da atividade dos macrófagos, uma vez que a IL-17 pode induzir a produção de TNF e iNOS, levando à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que auxiliam na destruição do bacilo¹².

Quanto à resposta imune em modelos experimentais, camundongos BALB/c e atímicos, quando inoculados com *M. leprae* no coxim plantar, apresentam comportamentos distintos, isto é, enquanto nos BALB/c os bacilos permanecem apenas no coxim plantar com lesões granulomatosas semelhantes as lesões de pacientes TT¹⁴, nos camundongos *nude* existe intensa multiplicação bacilar com disseminação dos bacilos para outras áreas, além do coxim plantar, apresentando lesões predominantemente macrofágicas com numerosos bacilos no seu interior semelhantes aquelas de pacientes LL¹⁴.

Considerando que há escassez de estudos comparando a evolução da infecção pelo *M. leprae* em camundongos imunocompetentes (BALB/c) e imunocomprometidos (*nude*), este estudo teve como objetivo avaliar o perfil sistêmico de resposta ao bacilo com base na dosagem de citocinas e óxido nítrico (NO) em diferentes estágios da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: foram utilizados 40 camundongos da linhagem BALB/c e 40 camundongos *nude* (NU-*Foxn1^{nu}*), de ambos os sexos, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima, de Bauru, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos em mini-isoladores em *racks* ventilados, em condição livre de patógenos específicos, com água e ração *ad libitum*.

Aspectos Éticos: todos os procedimentos foram realizados de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo CONCEA e aprovação número 001/23 pelo Comitê de Ética para Uso de Animais-CEUA do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brasil.

Inóculo: a suspensão de *M. leprae* foi obtida do coxim plantar de camundongos *nude*, previamente inoculados com a cepa Thai-53 para manutenção do bacilo. Após a maceração dos coxins em solução salina de Hank's (Sigma, St Louis, MO, USA), a suspensão foi filtrada em membrana de nylon estéril, de 40 µm de diâmetro (BD Falcon, Bedford, MA, USA), para eliminar os restos teciduais¹⁵ e o número total de bacilos foi calculado de acordo com a protocolo descrito no Manual de Técnicas Laboratoriais para hanseníase¹⁶.

Inoculação: os camundongos foram inoculados por via intradérmica em ambos os coxins plantares traseiros com 0,03 ml da suspensão de *M. leprae*, contendo 1×10^4 bacilos para os camundongos BALB/c e 3×10^6 bacilos para os camundongos *nude*.

Eutanásia: os animais foram eutanasiados aos 3, 5 e 8 meses pós-inoculação (10 por grupo). Dez camundongos saudáveis, BALB/c e *nude*, foram utilizados como grupo controle. Após a eutanásia, foi coletado o sangue total para obtenção do soro, o qual foi aliqüotado e mantido a -80 °C até o momento de sua utilização. Os coxins plantares foram removidos para determinação do número de bacilos.

Determinação do número de bacilos no coxim plantar: após a maceração dos coxins em solução salina de Hank's (Sigma, St Louis, MO, USA), a suspensão foi filtrada em membrana de nylon estéril, de 40 µm de diâmetro (BD Falcon, Bedford, MA, USA), para eliminar os restos teciduais¹⁵. A suspen-

são bacilar foi fixada em lâminas e corada segundo a técnica de Ziehl-Neelsen. O número total de bacilos foi calculado de acordo com a protocolo descrito no Manual de Técnicas Laboratoriais para hanseníase¹⁶.

Quantificação de citocinas séricas: a quantificação das citocinas séricas IL-2, IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foi realizada pelo método CBA (*Cytometric Bead Array*, número de catálogo 560485, Becton Dickinson Indústrias, BD, Estados Unidos). As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, no analisador BD FACSAria™ Fusion (Becton Dickinson Indústrias, BD, Estados Unidos). Os resultados foram gerados usando o *software* FCAP Array (BD) com base em uma curva padrão e expressos em pg/ml. Os níveis séricos de citocinas abaixo do limite de detecção foram expressos como 0 pg/ml.

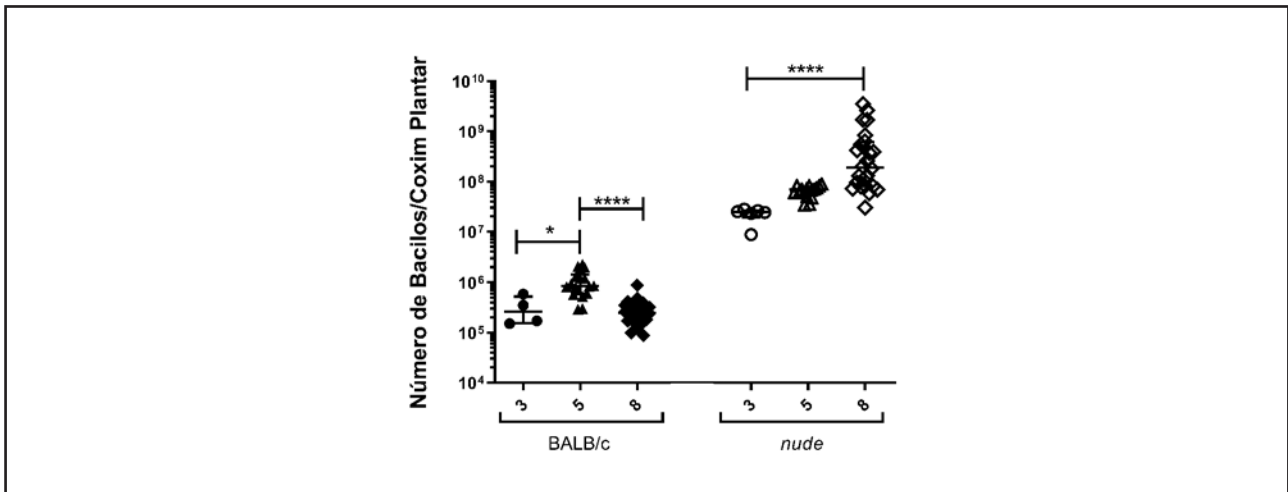
Produção de Óxido Nítrico (NO): o NO se decompõe em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), assim a produção deste elemento foi estimada pela detecção de NO_2^- através do método colorimétrico de Griess¹⁷. Em uma placa de 96 orifícios, foram pipetados 100 μl de soro e 100 μl do reagente de Griess, que contém n-(1-naftil)-etilenediamina (NEED) diluído a 0,1% em água destilada e sulfanilamida diluída a 1% em H_3PO_4 a 5% em volumes iguais. A placa foi mantida por 10 min em temperatura ambiente e, a seguir, a leitura foi realizada em microleitor automático de ELISA com comprimento de onda de 540 nm, contra branco constituído por reagente de Griess. Os resultados foram expressos em micromolar (μM) comparando-se a densidade óptica (DO) a uma curva padrão estabelecida em cada ensaio.

Análise estatística: as comparações dos dados de NO e citocinas séricas foram avaliadas pelo teste de análise de variância não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico GraphPad Prism 7.0 program.

RESULTADOS

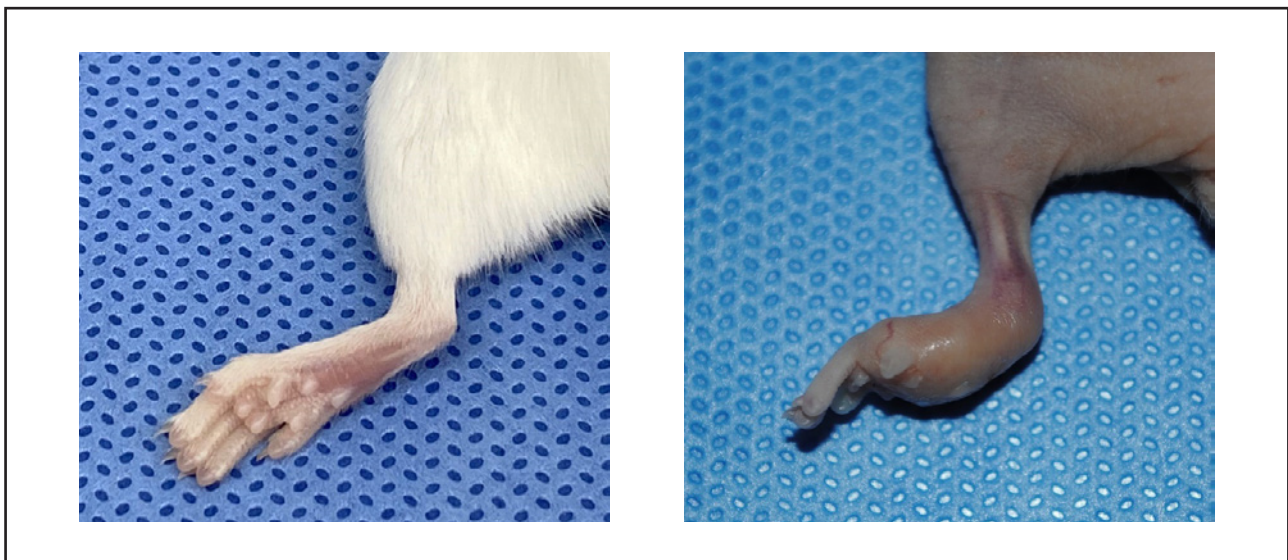
Em camundongos BALB/c, a infecção progrediu até os 5 meses, após este período houve declínio no número de bacilos que não apresentou diferença significativa entre 3 e 8 meses após a infecção, como observado na Figura 1. Estes animais não exibiram nenhuma lesão macroscópica nos coxins plantares durante o período de estudo (Figura 2). A infecção foi progressiva nos camundongos *nude* com multiplicação bacilar nos coxins plantares (Figura 1) e aparecimento de lesões macroscópicas aos 5 meses, as quais aumentaram de tamanho, muitas vezes envolvendo todo o coxim plantar aos 8 meses pós-inoculação (Figura 2).

Figura 1 – Quantificação de bacilos nos coxins plantares de camundongos BALB/c e *nude* inoculados com *Mycobacterium leprae*. As barras representam a mediana e os intervalos interquartil. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 2 – Camundongos inoculados com *M. leprae* no coxim plantar. A) Coxim plantar sem lesão macroscópica aparente aos 8 meses pós-inoculação em camundongo BALB/c. B) Lesão macroscópica aos 8 meses pós-inoculação em camundongo *nude*.

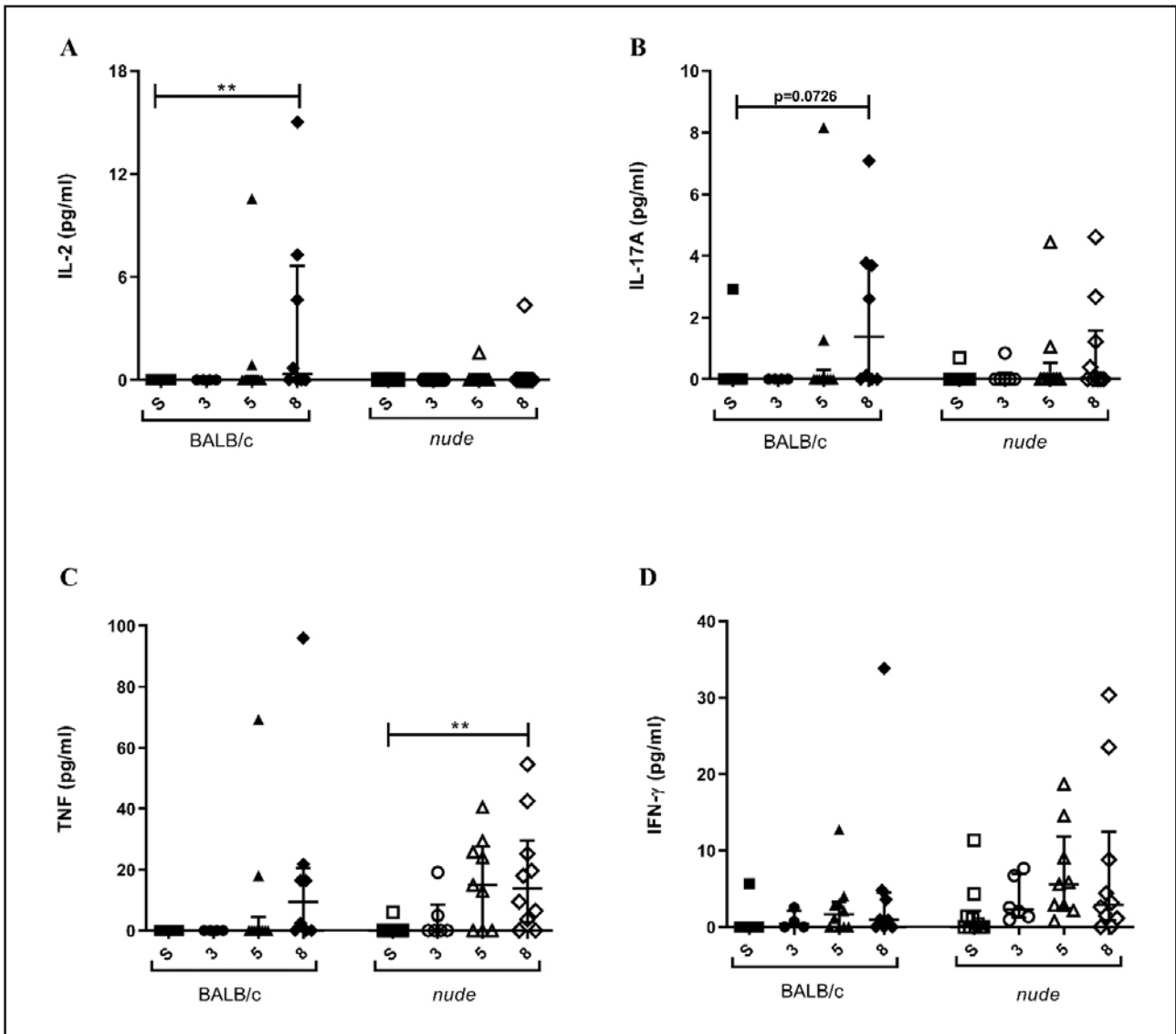


Fonte: Elaborado pelos autores.

A quantificação das citocinas na linhagem BALB/c revelou níveis maiores de IL-2 e IL-17 aos 8 meses quando comparado com o grupo controle (Figuras 3A e 3B). A citocina IL-6 apresentou níveis maiores no grupo controle em comparação aos 8 meses pós-inoculação (Figura 4A) enquanto o TNF, IFN- γ , IL-10 e IL-4 não apresentaram alterações significantes (Figuras 3 e 4).

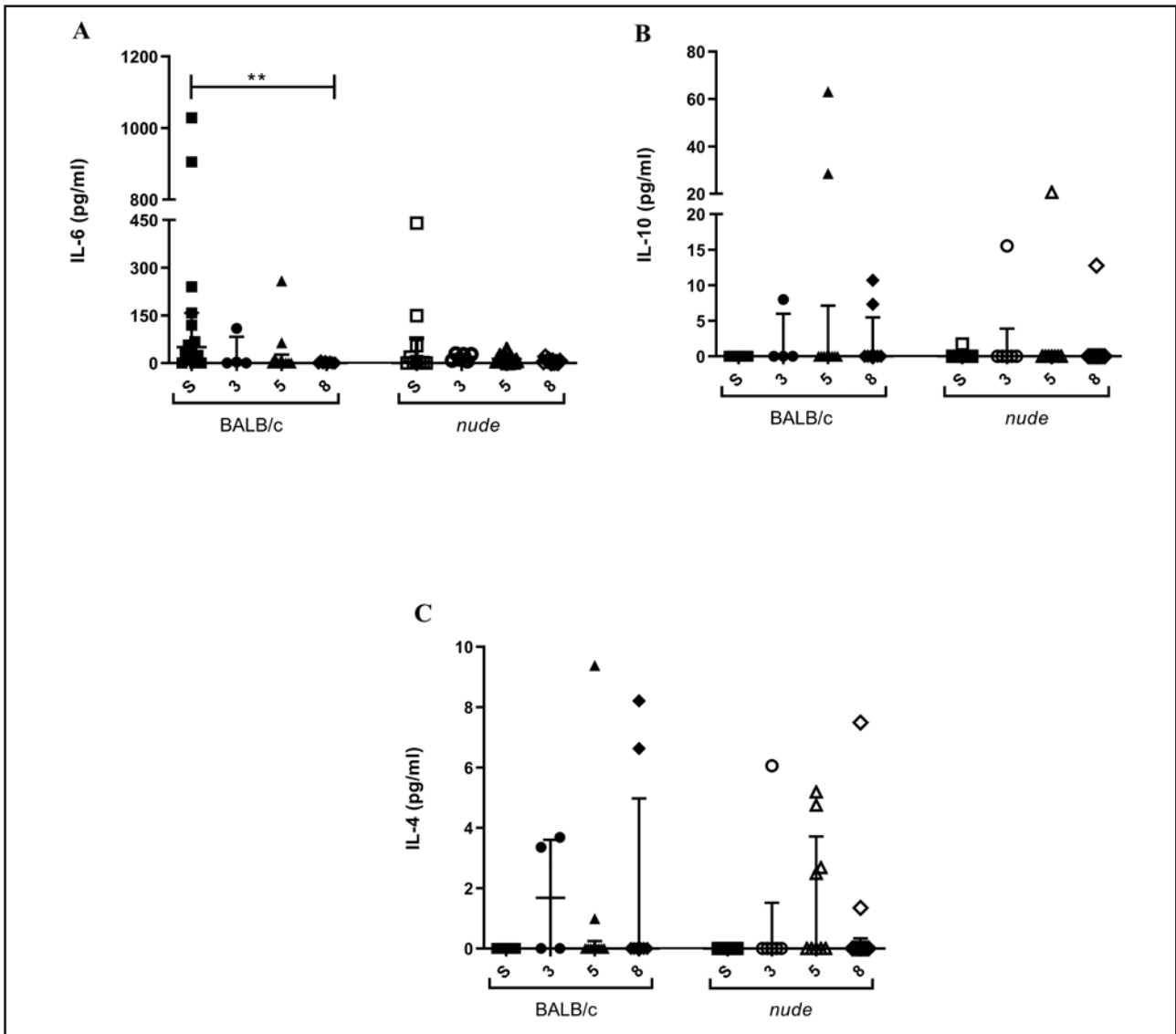
A quantificação das citocinas nos camundongos *nude* revelou níveis maiores de TNF aos 8 meses, quando comparado ao grupo controle (Figura 3C). Não houve diferença significativa nos níveis das citocinas IL-2, IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10 (Figuras 3 e 4).

Figura 3 – Quantificação de citocinas séricas (IL-2, IL-17A, TNF e IFN- γ) em camundongos BALB/c e *nude* inoculados com *M. leprae* no coxim plantar e eutanasiados aos 3, 5 e 8 meses pós-inoculação. S = camundongos saudáveis. $**p < 0,01$.



Fonte: Elaborado pelos autores.

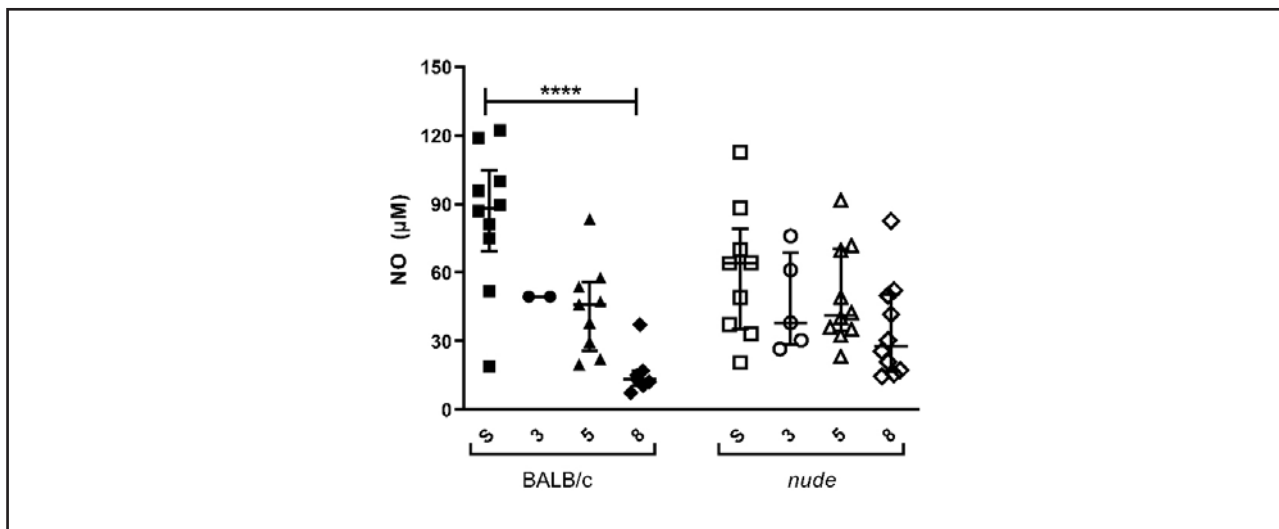
Figura 4 – Quantificação de citocinas séricas (IL-4, IL-6 e IL-10) em camundongos BALB/c e *nude* inoculados com *M. leprae* no coxim plantar e eutanasiados aos 3, 5 e 8 meses pós-inoculação. S = camundongos saudáveis. $**p < 0,01$.



Fonte: Elaborado pelos autores.

A dosagem de NO nos camundongos BALB/c foi maior no grupo controle em comparação aos 8 meses pós-inoculação (Figura 5). Nos camundongos *nude* não foram evidenciadas diferenças significativas durante o processo infeccioso (Figura 5).

Figura 5 – Dosagem sérica de óxido nítrico (NO) em camundongos BALB/c e *nude* inoculados com *M. leprae* no coxim plantar e eutanasiados aos 3, 5 e 8 meses pós-inoculação. S = camundongos saudáveis. **** $p < 0.0001$.



Fonte: Elaborado pelos autores.

DISCUSSÃO

Neste estudo, o processo infeccioso nos camundongos *nude* foi progressivo e intenso com multiplicação dos bacilos nos coxins plantares, enquanto nos camundongos BALB/c a infecção atingiu um *plateau* de multiplicação bacilar aos 5 meses com regressão aos 8 meses. A evolução mais precoce do processo infeccioso nos animais da linhagem BALB/c em comparação aos achados de Shepard se deve, possivelmente, à viabilidade dos bacilos presentes no inóculo, tendo em vista que eram provenientes de camundongos *nude* (utilizados para manutenção da cepa Thai-53) e não de lesões de pacientes multibacilares não tratados, conforme descrito por Shepard⁴.

Como o *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório de células de Schwann e macrófagos, a resistência do hospedeiro a este patógeno depende da resposta imune celular, sendo o paradigma Th1/Th2 clássico na hanseníase¹⁸.

O resultado da dosagem de citocinas séricas nos camundongos BALB/c revelou níveis maiores de IL-2 e IL-17 aos 8 meses em comparação ao grupo controle. Particularmente com relação à IL-17, níveis elevados desta citocina são observados no polo tuberculóide, o que contribui para o recrutamento de células inflamatórias que ativam as células endoteliais, promovendo a manutenção do processo inflamatório crônico. Tem sido descrito que a resposta Th17 desempenha um papel crítico na modulação da atividade dos macrófagos, uma vez que esta citocina pode induzir a produção de TNF e iNOS, levando à destruição dos bacilos^{19,20}.

Nos camundongos BALB/c, a dosagem sérica de TNF e IFN- γ revelou níveis maiores aos 8 meses, porém sem diferença estatisticamente significativa,

sugerindo um possível perfil Th1 como observado em pacientes TT. O aumento dos níveis dessas citocinas também foi observado em sobrenadante de cultura de células peritoneais de camundongos BALB/c inoculados com *M. leprae* após 8 meses, corroborando com os nossos achados¹⁴.

Em relação à IL-6, os camundongos BALB/c sadios (grupo controle) produziram níveis maiores desta citocina em comparação aos 8 meses de infecção. Sabe-se que esta citocina possui função pró-inflamatória, sendo detectada principalmente em pacientes do polo LL²². É possível que nos camundongos esta diminuição na produção de IL-6 seja pela maior expressão de citocinas do perfil Th1 durante o processo infeccioso.

Nos camundongos *nude*, os resultados mostraram níveis maiores de TNF aos 8 meses em comparação ao grupo controle. Neste sentido, podemos sugerir que a produção desta citocina esteja relacionada à elevada carga bacilar aos 8 meses de infecção, uma vez que em camundongos *nude* há disseminação de *M. leprae* para outros locais, além do coxim plantar^{12,22}. Deste modo, os lipopolissacarídeos da parede celular do bacilo poderiam estimular diretamente a produção de TNF, não havendo a participação da resposta imune celular, uma vez que estes animais são atímicos²¹. Quanto às demais citocinas, não houve diferença significativa no decorrer do processo infeccioso, embora níveis mais elevados de IL-17 e IFN- γ tenham sido observados aos 5 e 8 meses em comparação ao grupo controle.

É importante salientar que os resultados da dosagem de citocinas séricas encontradas nos animais avaliados neste estudo podem não refletir totalmente as alterações encontradas no coxim plantar, necessitando de estudos adicionais *in situ* para uma melhor avaliação da resposta imune desses modelos experimentais.

É sabido que as citocinas produzidas durante a resposta imune podem ativar ou inibir a ação microbicida dos macrófagos. Quando o macrófago é ativado inúmeros processos são iniciados, inclusive, a produção de NO¹², importante no controle de infecções, devido a sua ação microbicida.

A atividade microbicida dos macrófagos envolve a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através do complexo NADPH-oxidase e iNOS, respectivamente. Uma maior expressão de iNOS foi descrita em lesões cutâneas de pacientes TT/DT em comparação com lesões VV/DV, o que pode ser atribuído à resposta imune do tipo Th1²³.

A dosagem sérica de NO revelou níveis maiores nos camundongos BALB/c do grupo controle em comparação aos 8 meses pós-inoculação. Isto nos chamou atenção porque era de se esperar uma maior produção durante o processo infeccioso, tendo em vista que esses animais exibem resposta imune celular contra o *M. leprae*. Essa diminuição de NO pode ocorrer também em outros modelos de doenças infecciosas, conforme relatado por Anstead et al²⁴, que observa-



ram uma produção de NO menor em camundongos inoculados com *Leishmania donovani* em comparação aos camundongos saudáveis; assim como Barbosa et al²⁵ em camundongos inoculados com o fungo *Lacazia loboi*.

Diferentemente dos camundongos BALB/c, os camundongos *nude* não mostraram diferença estatisticamente significativa nos níveis de NO ao longo da infecção, o que poderia ser reflexo da elevada produção de TNF que acompanhou o crescimento no número de bacilos, numa tentativa de conter a infecção, mesmo na ausência de uma resposta timo dependente.

Em resumo, camundongos BALB/c produziram níveis séricos maiores de IL-2 e IL-17 aos 8 meses pós-inoculação. Nos camundongos *nude* houve aumento dos níveis séricos de TNF aos 8 meses do processo infeccioso. Esses animais, entretanto, por serem atímicos, não são capazes de eliminar o *M. leprae* e apresentam elevada carga bacilar. Os resultados sugerem uma resposta imune nos camundongos BALB/c capaz de controlar a multiplicação do *M. leprae* em comparação com uma infecção progressiva em camundongos *nude* ainda que na presença de um ambiente pró-inflamatório sistêmico mediado por elevada produção de TNF.

APROVAÇÃO ÉTICA E CONSENTIMENTO INFORMADO: o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima, registrada com o nº CEUA ILSL 001/23, a partir de Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

CONFLITOS DE INTERESSE: os autores informam que não há conflitos de interesse no presente artigo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES: Lima TS e Sartori BGC contribuíram na concepção e delineamento do estudo. Diorio SM, Nogueira MRS e Silva SMUR contribuíram na análise e interpretação dos resultados. Rosa PS, Pedrini SCB e Brito-de-Souza VN contribuíram na redação e revisão crítica do conteúdo do manuscrito. Barbosa ASAA e Vilani-Moreno FR contribuíram na concepção, delineamento do estudo, análise e interpretação dos resultados, redação e revisão crítica do conteúdo do manuscrito. Todos os autores realizaram revisão crítica da redação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev. 2006;19(2): 338-81. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006>.



2. Lahiri R, Randhawa B, Krahembuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse footpad. *J Med Microbiol.* 2005;54(3):235-42. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45700-0>.
3. Ploemacher T, Faber WR, Menke H, Rutten V, Pieters T. Reservoirs and transmission routes of leprosy: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(4):e0008276. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008276>.
4. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. *J Exp Med.* 1960;112(3):445-54. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.112.3.445>.
5. Prabhakaran K, Harris EB, Kirchheimer WF. Hairless mice, human leprosy and thymus-derived lymphocytes. *Experientia.* 1975;31:784-5. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01938464>.
6. Chehl S, Ruby J, Job CK, Hastings RC. The growth of *Mycobacterium leprae* in nude mice. *Lepr Rev.* 1983;54(5):283-304. doi: <https://doi.org/10.5935/0305-7518.19830035>.
7. Casalenovo MB, Rosa PS, Faria Bertoluci DF, Barbosa ASAA, Nascimento DCD, Souza VNB, et al. Myelination key factor krox-20 is downregulated in Schwann cells and murine sciatic nerves infected by *Mycobacterium leprae*. *Int J Exp Pathol.* 2019;100(2):83-93. doi: <https://doi.org/10.1111/iep.12309>.
8. Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence.* 2022;13(1):1985-2011. doi: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2141987>.
9. Ridely DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five groups system. *Int J Lepr.* 1966 [cited 2023 Mar 15];34(3):255-273. Available from: <http://ila.ilsl.br/pdfs/v34n3a03.pdf>.
10. Venturini J, Soares CT, Belone AFF, Barreto JA, Ura S, Lauris JR, et al. In vitro and in skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. *Lepr Rev.* 2011;82(1):25-35. doi: <https://doi.org/10.47276/lr.82.1.25>.



11. Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, Dacso MM, Rao PN, Stryjewska BM, et al. Leprosy: clinical aspects and diagnostic techniques. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(1):1-14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.12.080>.
12. Froes LAR Junior, Sotto MN, Trindade MAB. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. *An Bras Dermatol.* 2022;97(3):338-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.08.006>.
13. Sousa JR, Quaresma JAS. The role of T helper 25 cells in the immune response to *Mycobacterium leprae*. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78(5):1009-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.11.025>.
14. Vilani-Moreno FR, Barbosa ASAA, Sartori BGC, Diório SM, Silva SMUR, Rosa PS, et al. Murine experimental leprosy: evaluation of immune response by analysis of peritoneal lavage cells and footpad histopathology. *Int J Exp Pathol.* 2019;100(3):161-74. doi: <https://doi.org/10.1111/iep.12319>.
15. Trombone APF, Pedrini SCB, Diório SM, Belone ADFF, Fachin LRV, 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:e50620. doi: <https://doi.org/10.3791/50620>.
16. World Health Organization. Laboratory Techniques for Leprosy (WHO/CDS/LEP/86). Switzerland: WHO; 1986. 165p.
17. Grenn LC. Nitrite biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci.* 1981;18:7764-8. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7764>.
18. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, MitraDK. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004338. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004338>.
19. Tavares IF, Santos JB, Pacheco FDS, Gandini M, Mariante RM, Rodrigues TF, et al. *Mycobacterium leprae* Induces Neutrophilic Degranulation and Low-Density Neutrophil Generation During Erythema Nodosum Leprosum. *Front Med (Lausanne).* 2021;8(8):711623. doi: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.711623>.
20. Oliveira MF, Medeiros RCA, Mietto BS, Calvo TL, Mendonça APM, Rosa TLISA, et al. Reduction of host cell mitochondrial activity as *Mycobacterium leprae* strategy to evade host innate immunity. *Immunol Rev.* 2021;301(1):193-208. doi: <https://doi.org/10.1111/imr.12962>.



21. Adams LB. Susceptibility and resistance in leprosy: studies in the mouse model. *Immunol Rev.* 2021;301(1):157-74. doi: <https://doi.org/10.1111/imr.12960>.
22. Froes LAR Jr, Trindade MAB, Sotto MN. Immunology of leprosy. *Int Rev Immunol.* 2022;41(2):72-83. doi: <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1851370>.
23. Adams LB. Susceptibility and resistance in leprosy: studies in the mouse model. *Immunol Rev.* 2021;301(1):157-74. doi: <https://doi.org/10.1111/imr.12960>.
24. Anstead GM, Chandrasekar B, Lhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun* 2001;69(8):4709-18. doi: <https://doi.org/10.1128/iai.69.8.4709-4718.2001>.
25. Barbosa ASAA, Diório SM, Pedrini SCB, Silva SMUR, Sartori BGC, Calvi S, et al. Nutritional status and immune response in murine experimental Jorge Lobo's disease. *Mycoses.* 2015;58(9):522-30. doi: <https://doi.org/10.1111/myc.12351>.

