

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

LUIS ALBERTO RIBEIRO FRÓES JÚNIOR

**Subconjuntos de linfócitos B nas lesões cutâneas da hanseníase
tuberculoide, indeterminada, virchowiana e estados reacionais**

**São Paulo
2024**

LUIS ALBERTO RIBEIRO FRÓES JÚNIOR

**Subconjuntos de linfócitos B nas lesões cutâneas da hanseníase
tuberculoide, indeterminada, virchowiana e estados reacionais**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Mírian
Nacagami Sotto

Coorientadora: Profa. Dra. Maria
Ângela Bianconcini Trindade

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fróes Júnior, Luis Alberto Ribeiro

Subconjuntos de linfócitos B nas lesões cutâneas da hanseníase tuberculóide, indeterminada, virchowiana e estados reacionais / Luis Alberto Ribeiro Fróes Júnior; Mírian Nacagami Sotto, orientadora; Maria Angela Bianconcini Trindade, coorientadora. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) - Programa de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Hanseníase 2. Subpopulações de linfócitos B 3. Imunidade 4. Imunohistoquímica 5. Imunopatogênese 6. Mycobacterium leprae I. Sotto, Mírian Nacagami, orient. II. Trindade, Maria Angela Bianconcini III. Título

USP/FM/DBD-028/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: FROES Jr, Luis Alberto Ribeiro

Título: Subconjuntos de linfócitos B nas lesões cutâneas da hanseníase tuberculóide, indeterminada, virchowiana e estados reacionais

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento:

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento:

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento:

RESUMO

Fróes Júnior LAR. Subconjuntos de linfócitos B nas lesões cutâneas da hanseníase tuberculoide, indeterminada, virchowiana e estados reacionais [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Introdução: a hanseníase, uma doença infecciosa crônica, envolve uma interação complexa de respostas imunológicas. Enquanto extensa pesquisa tem se concentrado na imunidade celular, o papel dos linfócitos B, incluindo os linfócitos B-1, linfócitos B da Zona Marginal (MZB), linfócitos B Reguladores (Bregs) e linfócitos B Efetores-1 (Be1), permanece menos elucidado. Este estudo tem como objetivo investigar a distribuição desses subconjuntos de linfócitos B em lesões cutâneas de hanseníase, contribuindo para uma melhor compreensão da patogenia da hanseníase.

Métodos: análises imunohistoquímicas e morfométricas foram realizadas para examinar a presença de subconjuntos de linfócitos B em vários subtipos de hanseníase. O estudo focou na distribuição de linfócitos B CD20+, juntamente com a quantificação de seus subconjuntos (linfócitos B1, MZB, Bregs e Be1) nas lesões cutâneas de diferentes formas clínicas da hanseníase e estados reacionais.

Resultados: Os linfócitos B predominaram em lesões tuberculoides, enquanto a expressão de MZB-1 exibiu heterogeneidade entre os subtipos de hanseníase. Lesões de Reação Tipo 1 (RT1) apresentaram contagens celulares de linfócitos B-1 e MZB significativamente mais altas em comparação com Reação Tipo 2 (RT2), hanseníase virchowiana (HV) e hanseníase indeterminada (HI). Curiosamente, a expressão de PAX5/MZB-1 (linfócitos B-1 e MZB) revelou padrão muito semelhante à expressão de PAX5/CD5 (apenas linfócitos B1), com expressão predominante no polo Th1. Em estados reacionais, especialmente RT1, todos os subconjuntos de linfócitos B estavam presentes em número significativamente maior que nos demais grupos. Os linfócitos Be1, associados a resposta Th1, estavam marcadamente presentes na RT1 e na forma tuberculóide (HT). Linfócitos Bregs foram consistentemente escassos em todos os grupos, mas foram mais frequentes na RT1.

Discussão: este estudo demonstra pela primeira vez a presença e distribuição de subconjuntos de linfócitos B em lesões de hanseníase e sua potencial influência na resposta imunológica. Tais achados poderão contribuir para o desenvolvimento de novas terapias-alvo e refinamento do manejo da doença.

Palavras-chave: Hanseníase. Subpopulações de linfócitos B. Imunidade. Imunohistoquímica. Immunopatogênese. *Mycobacterium leprae*.

ABSTRACT

Fróes Júnior LAR. B-lymphocyte subsets in the cutaneous lesions of tuberculoid, indeterminate, virchowian leprosy, and reactional states [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

Introduction: Leprosy, a chronic infectious disease, involves a complex interaction of immune responses. While extensive research has focused on cellular immunity, the role of B lymphocytes, including B-1 cells, Marginal Zone B cells (MZB), Regulatory B cells (Bregs), and Effector-1 B cells (Be1), remains less elucidated. This study aims to investigate the distribution of these B cell subsets in leprosy skin lesions, contributing to a better understanding of leprosy pathogenesis.

Methods: Immunohistochemical and morphometric analyses were performed to examine the presence of B cell subsets in various leprosy subtypes. The study focused on the distribution of CD20+ B lymphocytes, along with the quantification of their subsets (B-1, MZB, Bregs, and Be1) in skin lesions of different clinical forms of leprosy and reactional states.

Results: B cells predominated in tuberculoid lesions, while MZB-1 expression exhibited heterogeneity among leprosy subtypes. Type 1 Reaction (T1R) lesions showed significantly higher B-1 and MZB cell counts compared to Type 2 Reaction (T2R), lepromatous leprosy (LL), and indeterminate leprosy (I). Interestingly, the expression of PAX5/MZB-1 (B-1 and MZB cells) revealed a pattern very similar to PAX5/CD5 (only B-1 cells), with predominant expression in the Th1 pole. In reactional states, especially T1R, all B cell subsets were present in significantly higher numbers than in other groups. Be1 cells, associated with Th1 response, were markedly present in T1R and the tuberculoid form (TT). Breg lymphocytes were consistently scarce in all groups but were more frequent in T1R.

Discussion: This study demonstrates, for the first time, the presence and distribution of B cell subsets in leprosy lesions and their potential influence on the immune response. These results may contribute to the development of new targeted therapies and refinement of disease management.

Keywords: Leprosy. B-lymphocyte subsets. Immunity. Immunohistochemistry. Immunopathogenesis. *Mycobacterium leprae*.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mirian, expresso minha profunda gratidão por me honrar ao escolher-me como seu aluno de doutorado. Espero ter correspondido à confiança depositada em mim, e agradeço por compartilhar seu vasto conhecimento e inspirar meu percurso acadêmico. Sua orientação e *mentorship* foram fundamentais para meu crescimento científico e intelectual.

À Dra. Maria Ângela, meu apreço pela generosidade em partilhar seu profundo conhecimento sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da hanseníase. Além disso, agradeço por abrir portas cruciais e viabilizar oportunidades que ampliaram minha inserção no mundo acadêmico e impulsionaram minha produção científica.

À Dra. Carla Pagliari, expresso minha gratidão pelo auxílio inestimável nas etapas laboratoriais da pesquisa. Sua expertise e colaboração foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da USP, agradeço a oportunidade de realizar o curso de doutorado. Essa experiência foi crucial para meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Expresso minha sincera gratidão ao Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo – Sebastião Sampaio (FUNADERSP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo 306371/2018-9) pelo apoio financeiro. Sem esse suporte, a concretização deste trabalho não seria possível.

Agradeço ao amigo Felipe pelo apoio crucial no início do doutorado, especialmente durante a pandemia. Aos amigos Bruno e Renato, assim como à minha mãe Magnólia, dedico meu profundo agradecimento pelo apoio incondicional ao longo de décadas. Suas palavras de incentivo e presença constante foram fundamentais em inúmeras etapas e desafios da minha vida. Seu apoio foi a luz que guiou meu caminho, e por isso, expresso minha eterna gratidão.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio, sabedoria e contribuições dessas pessoas extraordinárias. Obrigado por serem parte fundamental desta jornada.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfometria de uma imagem em caso de hanseníase tuberculoide **Página 34**
- Figura 2.** Fluxograma indicando o número de casos e controles para cada reação imuno-histoquímica.**Página 36**
- Figura 3.** Imunomarcção de CD20 e MZB-1 em amostras de hanseníase tuberculoide, indeterminada e virchowiana.....**Página 38**
- Figura 4.** Imunomarcção de CD20 e MZB-1 nas reações hansênicas**Página 39**
- Figura 5.** Painel de marcação por imuno-histoquímica para linfócitos B1, MZB, Be1 e Bregs, e imunofluorescência ao microscópio confocal a laser para linfócitos B1.**Página 40**
- Figura 6.** Medianas e medidas de dispersão central para cada reação imuno-histoquímica.....**Página 43**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos 95 casos estudados pelo número de registro na pesquisa, forma clínica, idade, sexo e local da lesão biopsiada.**Página 28**

Tabela 2. Anticorpos utilizados, especificações e sistemas de revelação
..... **Página 32**

Tabela 3. Diferenças nas medianas entre os grupos com comparações estatisticamente significativas, e seus respectivos valores de p**Página 41**

Tabela 4. Demonstra as medianas e valores de p para comparações entre grupos quanto à expressão de CD20 versus MZB1 em amostras de hanseníase.
..... **Página 43**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs: células apresentadoras de antígenos

Be1: Linfócito B efetor-1

Breg: Linfócito B regulador

c-MAF: “Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog”

CD1d: Antígeno de “cluster” de diferenciação 1d

CD4: Antígeno de “cluster” de diferenciação 4

CD5: Antígeno de “cluster” de diferenciação 5

CD8: Antígeno de “cluster” de diferenciação 8

CD19: Antígeno de “cluster” de diferenciação 19

CD20: Antígeno de “cluster” de diferenciação 20

CD25: Antígeno de “cluster” de diferenciação 25

CD138: Antígeno de “cluster” de diferenciação 138

CTLs: Linfócitos T citotóxicos

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidroclorido

FOXP3: Proteína P3 do fator de transcrição

HI: hanseníase indeterminada

HT: hanseníase tuberculóide

HV: hanseníase virchowiana

IC: Imunocomplexos

IFN- γ : Interferon gama

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 22

IL-22: Interleucina 22

IL-35: Interleucina 35

ILBs: Linfócitos B do tipo inato

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida
MZ B: Linfócitos B da Zona Marginal
MZB-1: "Marginal zone B and B1 cell specific protein"
MyD88: fator de diferenciação mielóide 88
PAX5: "Paired Box" 5
PBS: "phosphate - buffered saline"
PGL-1: Glicopeptídeo Fenólico 1
RT1: Reação tipo 1
RT2: Reação tipo 2
SIS: Sistema imune da pele
STAT4: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 4
Tbet: "T-box transcription factor"
Th1: T "helper cells type" 1
Th2: T "helper cells type" 2
Th17: T "helper cells type" 17
TGF- β : Fator transformador de crescimento beta
TLRs: Receptores do tipo "Toll"
PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
Treg: Linfócito T regulador
V: Volumes

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Primário:	15
2.2 Objetivos Secundários:	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Mecanismos imunológicos na hanseníase	17
3.2 Imunofenótipo dos linfócitos na hanseníase	18
3.3 Linfócitos B.....	20
3.4 Linfócitos B e pele.....	21
3.5 Linfócitos B nos processos infecciosos	22
3.6 Linfócitos B na hanseníase	24
4. CASUÍSTICA E MÉTODO	27
4.1 Declaração de ética	27
4.2 Desenho e Casuística	27
4.3 Técnicas de imuno-histoquímica – protocolo de reação para um único anticorpo (para detecção de células CD20+ e MZB-1+)	30
4.4 Técnica imuno-histoquímica – protocolo de reação de dupla marcação	31
4.5 Técnica de dupla marcação por imunofluorescência para análise em microscópio confocal a laser.....	33
4.6 Análises Morfométricas e Estatísticas	33
5. RESULTADOS	36
5.1 Presença e distribuição de células com marcação única	37
5.2 Presença e distribuição de células com marcação dupla.....	37
5.3 Análise morfométrica e estatística	41
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹	50
9. APÊNDICE A	55

1. INTRODUÇÃO

As manifestações espectrais da hanseníase refletem de maneira intrincada a resposta imune do hospedeiro contra o *Mycobacterium leprae*(1). A imunidade celular, particularmente o equilíbrio entre a dominância Th1 e Th2, emerge como um determinante chave na apresentação clínica da hanseníase (2). Embora os linfócitos T tenham sido extensivamente estudados nesse contexto, o papel dos linfócitos B nas lesões de hanseníase, reconhecido desde as observações de Ridley em 1974, ainda permanece inadequadamente caracterizado (3) (4).

Os linfócitos B de mamíferos abrangem conjuntos distintos, incluindo linfócitos B2 foliculares, linfócitos B-1, linfócitos B da Zona Marginal (MZ B), linfócitos B Reguladores e linfócitos B Efetores-1 (Be1) (5) (6-8). Os linfócitos B-1, originados durante o desenvolvimento fetal, habitam a cavidade peritoneal, exibindo autorrenovação e secreção espontânea de IgM. Em condições normais, os linfócitos B-1 servem como uma ligação entre a imunidade intrínseca e adaptativa, secretando espontaneamente IgM multirreativa, facilitando a eliminação precoce de bactérias. Além disso, os linfócitos B-1 ativam macrófagos e células dendríticas, promovendo a eliminação por meio da liberação de componentes necróticos e apoptóticos, juntamente com a secreção de citocinas (9, 10).

Os linfócitos B da Zona Marginal (MZ B), outro grupo de linfócitos B, residem nas periferias dos folículos linfoides dentro do baço e vários órgãos. Essas células desempenham um papel crucial na orquestração de respostas rápidas de anticorpos contra micróbios transportados pelo sangue ricos em polissacarídeos. Juntamente com as células B-1, são chamadas de linfócitos B do tipo inato (ILBs) ou linfócitos B reguladores do tipo inato (Bregs), devido à sua capacidade de secretar IL-10, uma citocina reguladora (11). Bregs contribuem para respostas imunes cutâneas e exibem ações tanto pró-inflamatórias quanto regulatórias (12). Atuando em contextos autoimunes, inflamatórios e infecciosos, as Bregs também desempenham um papel na indução de células T reguladoras (Tregs) com funções supressoras amplas (13). Evidências recentes sugerem que os ILBs podem ser diretamente estimulados por

micróbios como parasitas e bactérias, levando a uma resposta regulatória por meio da produção de IL-10 durante infecções (14).

Dentro do espectro de subconjuntos de linfócitos B, uma entidade recentemente reconhecida surgiu - o linfócito B efetor 1 (Be1). Essa população enigmática, compartilhando semelhanças com as estabelecidas células T auxiliares 1 (Th1), parece servir como um elo conectivo entre as respostas imunes inatas e adaptativas (15). Os linfócitos Be1 liberam citocinas inflamatórias semelhantes às Th1, como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) (16). Os linfócitos Be1 participam da resposta imune inata contra bactérias, como *Borrelia burgdorferi*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium bovis* (17).

Apesar dos linfócitos B serem parte integrante do sistema imune da pele, são poucas as investigações sobre sua participação nas doenças cutâneas. Na hanseníase os poucos trabalhos têm focado principalmente o estudo dessas células no sangue dos doentes e raramente nas lesões de pele.

Ao dissecar a intrincada interação entre esses subconjuntos de linfócitos B e o ambiente micobacteriano nas lesões de hanseníase, nossa investigação visa proporcionar uma compreensão abrangente da resposta imune na hanseníase. Além de abordar lacunas existentes no conhecimento, os resultados obtidos teriam o potencial de informar estratégias terapêuticas e aprimorar abordagens de manejo da doença, abrindo novos caminhos para intervenções eficazes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário:

O presente projeto tem por objetivo verificar a participação de subconjuntos de linfócitos B nas lesões de pele das formas tuberculóide, virchowiana, indeterminada e nos estados reacionais da hanseníase.

2.2 Objetivos Secundários:

Verificar a presença e comparar o número de linfócitos B (CD20+) em lesões de pele de doentes com as formas tuberculóide, virchowiana, indeterminada e nas reações de tipo 1 e 2, por técnica de imuno-histoquímica

Verificar a presença e comparar o número de células que expressam o marcador MZB-1 (linfócitos B-1, linfócitos da Zona Marginal e plasmócitos) em lesões de pele de doentes com as formas tuberculóide, virchowiana, indeterminada e nas reações de tipo 1 e 2, por técnica de imuno-histoquímica

Verificar a presença e comparar o número dos subtipos de linfócitos B em lesões de pele de doentes com as formas tuberculóide, virchowiana, indeterminada e nas reações de tipo 1 e 2, por técnica de imuno-histoquímica de dupla marcação:

- Linfócitos B-1 Linfócitos (com co-expressão de PAX5 e CD5);
- Linfócitos B-1 e da Zona Marginal (com co-expressão de PAX5 e MZB-1);
- Linfócitos B efetores-1 (com co-expressão de CD20 e Tbet);
- Linfócitos B reguladores (com co-expressão de CD20 e c-MAF - fator de transcrição de interleucina 10).

Demonstrar por técnica de imuno-fluorescência de dupla marcação com microscopia confocal a laser a presença de linfócitos B (PAX5+) que co-expressam a imunoglobulina M (IgM) (linfócitos B-1) na reação tipo 1.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A Doença de Hansen (hanseníase) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis* que têm o homem como hospedeiro principal (18). Apesar de sua incidência em queda, ainda é uma importante causa de morbidade em alguns países do mundo, sendo o Brasil um dos mais atingidos, onde ainda se registram cerca 30 mil casos por ano (19).

Estima-se que mais de 95% dos indivíduos infectados sejam naturalmente resistentes ao *M. leprae*, jamais desenvolvendo qualquer sintoma da doença. Entre indivíduos sintomáticos, a doença se manifesta ao longo de um espectro clínico que, classicamente, tem sido dividido em cinco diferentes apresentações (20).

Em um dos pólos da doença situa-se a forma tuberculóide (HT), com lesões em pequeno número, hipocrômicas e com perda de sensibilidade térmica. O exame anatomopatológico destas lesões caracteriza-se pela formação de granulomas bem delimitados, rodeados por um anel de linfócitos, formados por células epitelióides, células gigantes multinucleadas e macrófagos com poucos ou nenhum bacilo. No outro pólo do espectro, indivíduos com a forma virchowiana (HV) demonstram uma resposta imune humoral, com abundante produção de anticorpos específicos anti-*M. leprae*, todavia com uma resposta imune celular bastante débil. Clinicamente, esses indivíduos se apresentam com um número alto de lesões, com ausência de granulomas ao exame histológico, porém com abundância de macrófagos espumosos repletos de bacilos - as chamadas células de Virchow (21).

Entre os pólos virchowiano e tuberculóide, existem as formas intermediárias, também denominadas dimorfas. São estas: dimorfa - tuberculóide, dimorfa - borderline e a dimorfa - virchowiana. Estas apresentações formam um espectro entre os dois pólos, no qual se nota um gradual aumento da resposta imune humoral - e concomitante enfraquecimento da resposta imune celular - à medida que a forma clínica se desloca do pólo tuberculóide para o pólo virchowiano (20).

Existe ainda a chamada forma indeterminada (HI) da hanseníase, caracterizada clinicamente apenas pela existência de uma mácula hipocrômica com redução de sensibilidade e, ao exame histológico, pela presença de um infiltrado linfocitário, de localização perineural e perianexial, podendo evoluir com cura espontânea ou para alguma das formas clássicas (21).

3.1 Mecanismos imunológicos na hanseníase

A característica espectral da hanseníase é relacionada à capacidade de resposta imune, tanto inata como adaptativa, frente ao *M. leprae* (1).

O *M. leprae* é um bacilo gram-positivo, álcool-ácido resistente e parasita intracelular obrigatório, com tropismo por macrófagos e células de Schwann. O bacilo de Hansen possui parede celular rica em lipídios, dentre os quais destaca-se o glicopeptídeo fenólico 1 (PGL-1), envolvido no mecanismo de escape do bacilo do fagolisossomo da célula hospedeira (22).

A atividade microbicida dos macrófagos envolve a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, através, respectivamente, do complexo NADPH-oxidase e do óxido nítrico. Nas lesões de HT observa-se uma maior expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) devido a uma maior ativação da resposta Th1 (22).

Também importantes na resposta ao bacilo *M. leprae*, as células de Schwann humanas são capazes de processar e apresentar antígenos a linfócitos T CD4+, o que desencadeia um processo inflamatório que as destrói com consequente desmielinização dos nervos periféricos, contribuindo para o desenvolvimento de lesões neurais (23). Um outro mecanismo por meio do qual *M. leprae* estimula o processo inflamatório é através do aumento da sensibilidade da célula de Schwann à citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (24).

Um papel importante neste processo também é atribuído aos receptores do tipo Toll (TLRs), um tipo de receptor de reconhecimento de padrões moleculares (PRR) presente nos macrófagos. Na hanseníase os TLR 2 e 4 reconhecem o bacilo de

Hansen, ativam o macrófago, que produz a interleucina (IL) -12 que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e a eliminação do bacilo (25).

A imunidade celular tem atuação central na resposta ao *M. leprae*, definindo a história natural da doença, que pode evoluir desde uma disseminação praticamente irrestrita (polo virchowiano), até a cura espontânea, passando por um quadro intermediário de progressão mais limitada (polo tuberculóide). Na hanseníase é evidente a correlação entre o braço do sistema imune predominantemente ativado (Th1 ou Th2) e a apresentação clínica da doença, estando a resposta celular associada a um quadro clínico limitado/cura, ao passo que o predomínio da resposta humoral se correlaciona mais fortemente com formas disseminadas (26).

As reações hansênicas são formas clínicas caracterizadas por reações de hipersensibilidade aguda, cursando com agravamento do quadro clínico já apresentado ou com o surgimento de lesões novas, podendo ocorrer antes, durante ou mesmo anos após a cura da doença. Representam a principal complicação da doença, a qual exige tratamento imediato para prevenção de danos neurais permanentes (27).

Os episódios reacionais podem ser de dois tipos: (1) reação reversa e (2) eritema nodoso hansênico. A reação reversa ocorre em cerca de um terço dos pacientes com formas dimorfas, enquanto o eritema nodoso hansênico ocorre em cerca de 50% dos pacientes com a forma virchowiana e em cerca de 10% dos pacientes com formas dimorfa, sobretudo naqueles com baciloscopia igual ou superior a 4+ (28).

3.2 Imunofenótipo dos linfócitos na hanseníase

Nas formas limitadas da hanseníase (paucibacilares) há predomínio de linfócitos T CD4+, com poucas células T CD8+, enquanto na forma virchowiana, observa-se um predomínio de linfócitos T supressores (CD8+), acompanhado de células T CD4+ "naïve" (29).

Trabalhos mais recentes demonstraram, nas lesões de hanseníase e no sangue dos doentes, a presença de linfócitos reguladores (Treg), caracterizados fenotipicamente pela expressão de CD4+, CD25+ (receptor de interleucina (IL) - 2 e FOXP3+ (proteína P3 do fator de transcrição). As células Treg compreendem 10% dos linfócitos T CD4+ no sangue periférico de seres humanos (30). Estas células suprimem as respostas imunes celulares tanto através do contato direto com células efetoras imunes quanto pela produção de citocinas reguladoras como o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e IL-10, exercendo assim um papel na manutenção da auto-tolerância imunológica e homeostase (31)

A reação reversa (reação de tipo 1) caracteriza-se por infiltrado celular composto predominantemente por linfócitos T CD4+, além de macrófagos CD163+. Os linfócitos T CD4+ das lesões cutâneas e neurais são responsáveis pela produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), responsáveis pela dor e edema característicos deste tipo de reação (32).

O eritema nodoso hansênico (reação de tipo 2) caracteriza-se por processo inflamatório sistêmico relacionado à deposição extravascular de imunocomplexos (IC) com exsudato neutrofílico que se soma ao infiltrado macrófagico pré-existente. Não está claro ainda se representa uma reação de hipersensibilidade tipo III mediada por IC ou se a presença de IC é apenas um epifenômeno. Uma vez que este tipo de reação ocorre mais comumente em pacientes com as formas clínicas dimorfas e virchowiana, é possível que o grande número de antígenos presentes, bem como a elevada produção de anticorpos característica das respostas Th2, contribuam para a formação destes imunocomplexos. Ocorre um aumento na proporção de linfócitos T CD4+/CD8+ tanto na pele quanto no sangue dos pacientes. O eritema nodoso hansênico se caracteriza ainda pela presença de altos níveis de TNF- α , além de citocinas características da resposta Th2 (33).

Os linfócitos B também são encontrados em meio aos infiltrados inflamatórios de lesões de hanseníase (3), ainda que sua participação na resposta ao bacilo não seja ainda bem conhecida.

3.3 Linfócitos B

Os linfócitos B dos mamíferos são compostos por subconjuntos com diferentes funcionalidades. Os três subconjuntos principais de linfócitos B são, nomeadamente, linfócitos B2 foliculares, linfócitos B-1 e linfócitos B da zona marginal (MZ B) (5).

Os linfócitos B-1, que surgem no início da ontogenia tanto em murinos como nos seres humanos, abrangem o que já foi conhecido como linfócitos B Ly-1 (ou CD5+). Compreendem os linfócitos B-1a que expressam CD5, além dos marcadores característicos como CD19 e CD20 p.ex. e constituem a maioria das células B-1 na normalidade. Os linfócitos B-1b compartilham características fenotípicas e funcionais com linfócitos B-1a, mas não expressam níveis detectáveis de CD5. É necessário distinguir linfócitos B-1 da maioria das células B maduras que surgem mais tarde na ontogenia e são encontradas em órgãos linfóides adultos. Os linfócitos maduros devem ser designados como linfócitos B convencionais ou B-2 (34).

Linfócitos B-1 são normalmente indetectáveis na medula óssea, linfonodo, placas de Peyer e timo. São encontrados em frequência muito baixa no baço e no sangue periférico, e são relativamente abundantes na cavidade peritoneal. Estas células produzem a maior parte dos anticorpos poli reativos, como a imunoglobulina (Ig) M que podem reagir com uma vasta gama de antígenos e, por conseguinte, foi sugerido que participassem da resposta imune inicial antes que clones de linfócitos B específicos fossem desenvolvidos e recrutados. Além da produção de anticorpos, os linfócitos B também participam ativamente da regulação imunológica, atuando como células apresentadoras de antígenos e pela secreção de citocinas (5).

As funções de regulação imunológica são restritas aos linfócitos B-1 e MZ B, que compartilham muitas propriedades com células imunes inatas que se especializam em respostas a patógenos e podem representar um tipo de linfócito B de memória e células B-1, constitutivas e espontâneas que secretam anticorpos “naturais” e influenciam outros elementos da atividade imunológica (11). Devido a isso, os linfócitos B-1 e MZ B são também denominados linfócitos B semelhantes a inatos (ILBs). Em contraste com os linfócitos B2, os ILBs (incluindo linfócitos B-1 e MZ B) têm capacidade de produzir quantidades elevadas de IL-10 após ativação inata.

Nesse sentido, esses ILBs produtores de IL-10 foram classificados como Bregs "inatos". O papel regulador desses linfócitos tem sido demonstrado nos processos de autoimunidade, inflamatórios e infecciosos (14).

Os linfócitos B-1 desempenham papéis críticos na defesa contra a invasão microbiana. Além de secretar anticorpos naturais, exercem funções que influenciam a expansão e diferenciação das células T (11).

Parasitas e bactérias podem estimular diretamente os ILBs para produzir IL-10, e estes linfócitos B reguladores (Bregs) exercem uma função reguladora na doença resultando em efeito protetor ou deletério, dependendo do modelo de infecção (14). Apenas alguns estudos abordaram diretamente a participação de Bregs em infecções bacterianas. Neves et al. demonstraram que a *Salmonella typhimurium*, através do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e TLR2/4, pode estimular diretamente os linfócitos B para produzir IL-10 (35).

Há ainda controvérsias na literatura sobre a existência de linfócitos B-1 e MZ B no ser humano. Entretanto, muitos trabalhos publicados demonstram a existência de linfócitos B que secretam IL-10, portanto linfócitos Bregs, nas doenças humanas (14).

Além disso, os linfócitos B também podem exercer função efetora semelhante à observada nos linfócitos T (36).

3.4 Linfócitos B e pele

A pele está constantemente exposta a uma grande variedade de agressões e, desse modo, tem mecanismos dependentes da atuação conjunta da imunidade inata e adquirida para manter a sua homeostase. Esses mecanismos são representados pelo chamado sistema imune da pele. O sistema imune da pele (SIS) é composto por linfócitos T, células dendríticas (células de Langerhans), linfócitos T CD8+ e queratinócitos na epiderme. Na derme os elementos celulares do SIS são representados por linfócitos T (CD4+ e CD8+), linfócitos B, células *natural killer*, células dendríticas apresentadoras de antígenos, mastócitos, macrófagos e células endoteliais (37).

Embora o conceito da pele como órgão imune tenha sido reconhecido (37, 38) o papel dos linfócitos B nos mecanismos de imunidade na pele têm sido pouco abordados.

Estudos mais recentes focam o envolvimento dos linfócitos B nos processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos da pele.

Os linfócitos B além da produção de anticorpos exercem funções de células apresentadoras de antígenos (APC), secretam citocinas que potencializam respostas imunes locais e sistêmicas. Há evidências de que os linfócitos B atuam tanto na homeostase, quanto nas doenças da pele, com ação pró-inflamatória e reguladora (12).

Os linfócitos B expressam marcadores de "homing" para a pele, indicativos de sua capacidade de se dirigir para locais de inflamação cutânea, que foram identificados tanto na pele normal quanto na pele doente. Além do envolvimento nos estágios iniciais das respostas imunes da pele através da produção de anticorpos inespecíficos, as células B maduras também contribuem para a resposta imune específica da pele, produzindo anticorpos tanto localmente quanto circulantes. Além disso, podem maturar para se tornarem células B efetoras secretoras de citocinas que são capazes de modular respostas imunes cutâneas por meio da produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias, dependentes do microambiente pré-existente na pele (12).

A presença de células B inatas-"like" que secretam IL-10 foi demonstrada tanto na pele de camundongos como de humanos (39).

3.5 Linfócitos B nos processos infecciosos

Os linfócitos B reguladores (Bregs) são um subconjunto de linfócitos B, que supostamente exercem efeitos imunomoduladores significativos através da produção de IL-10, IL-35 e TGF- β . Os Bregs participam dos processos patológicos de doenças autoimunes e alérgicas por meio de mecanismos imunorreguladores específicos e não

específicos. Embora a IL-10 seja produzida por vários tipos de células e exiba vários efeitos pleiotrópicos, a expressão de IL-10 por Bregs, humanos e de camundongos, é central para a regulação negativa de respostas imunes adaptativas e inatas. A diferenciação de células T em células T auxiliares (Th), incluindo células Th1, Th2 e Th17, que possuem capacidade protetora durante a infecção, pode ser inibida por IL-10. A IL-10 suprime a secreção de IL-22, IL-17 e IFN- γ por linfócitos T CD4+. Além disso, IL-10 pode atenuar a diferenciação de células T CD8+ em linfócitos T citotóxicos (CTLs) sob certos estímulos. A depleção de Breg *in vitro* leva ao aumento da atividade de CTLs, enquanto a ativação de Bregs contribui para a atenuação das funções de CTLs. Os linfócitos Bregs contribuem potencialmente para os níveis elevados de IL-10 no ambiente inflamatório e, desse modo, induzem células T reguladoras (Tregs), que exibem funções supressoras mais amplas (13). Esse mesmo autor revisou a participação de linfócitos Bregs nos processos infecciosos:

Nas infecções virais o envolvimento de Bregs é principalmente através de efeitos imunológicos mediados por IL-10.

Nas doenças parasitárias foi verificado que a IL-10 produzida por Bregs é necessária para a suscetibilidade à infecção por *Leishmania major* LV39 em camundongos BALB/c e para a polarização da resposta das células Th em relação ao fenótipo Th2. Linfócitos B de camundongos infectados com *Schistosoma* secretam IL-10 e promovem também o desenvolvimento da resposta imune Th2. Linfócitos B de doentes com leishmaniose visceral exibem maior capacidade de diferenciação em células B secretoras de IL-10, com o potencial de inibir a ativação, proliferação e secreção de citocinas por células T CD4+, em comparação com controles saudáveis (40).

Nas infecções por *Mycobacterium tuberculosis*, a tuberculose ativa tem sido diretamente associada às altas frequências de linfócitos Bregs (CD19+ CD1d+ CD5+) que apresentam maior atividade supressora e inibem seletivamente a ativação das células Th17 pelo contato celular direto na ausência de IL-10. Os pacientes com tuberculose cavitária apresentam frequências significativamente maiores de células B CD19+ CD1d+ CD5+. Estes achados sugerem que Bregs prejudicam a imunidade protetora e aumentam a gravidade dessa micobacteriose (41).

Como anteriormente exposto, em vários modelos de infecção, os linfócitos B demonstraram influenciar o desenvolvimento e a manutenção das funções dos linfócitos T CD4+ e CD8+; isso sugere que os linfócitos B têm funções reguladoras, algumas das quais podem ser dependentes da produção de citocinas. Entretanto, foi verificado que linfócitos B têm o potencial de se diferenciar em duas populações distintas de células efectoras (Be1 e Be2) que produzem IFN- γ e IL-4, respectivamente. As células B humanas expressam IL-12R funcional. A IL-12 inicia uma cascata de eventos moleculares levando à expressão de IFN- γ pelos linfócitos B, com o envolvimento do transdutor de sinal e ativador de transcrição 4 (STAT4) e do T-box, que é normalmente expresso em células T (T-bet), o que foi comprovado também por técnicas de imunofluorescência de dupla marcação. Esses dois fatores de transcrição estão criticamente envolvidos no desenvolvimento de Th1 (16).

A existência de linfócitos B/T-bet+ também foi demonstrada no microambiente da Doença de Hodgkin. A expressão de T-bet nos linfócitos B indica um fenótipo B efector 1 (Be1), que compreende um grupo de células B que se assemelham às células Th1 (42).

3.6 Linfócitos B na hanseníase

A presença de linfócitos B nas lesões de hanseníase foi inicialmente descrita por Ridley et al. (3). Há discordâncias quanto ao nível de linfócitos B no sangue dos doentes com hanseníase. Na hanseníase ativa os linfócitos B foram relatados como aumentados em número (43). Entretanto, Mendes et al. (44) observaram diminuição de linfócitos B e T no sangue de 30 doentes virchowianos. Esses dados são concordantes com os de Chogle et al. (45).

Na leishmaniose e outras doenças granulomatosas, os linfócitos B contribuem para o desenvolvimento e manutenção do granuloma, provavelmente influenciando o recrutamento de outras células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos T (46). No entanto, paradoxalmente, a hanseníase tuberculóide exibe uma forte resposta granulomatosa apesar de apresentar poucos linfócitos B nas lesões (47). Iyer et al. (48), através de cultura organotípica de pele de pacientes com hanseníase,

demonstraram a presença de linfócitos B, em diferentes estágios de maturação e funcionalmente ativos que poderiam secretar anticorpos específicos anti-*M. leprae* incluindo os da região dimorfa tuberculóide do espectro da doença.

Os mecanismos pelos quais os linfócitos B se acumulam e se diferenciam nas lesões da hanseníase não estão esclarecidos. Ochoa et al. (25) demonstraram que a produção de IL-5 por linfócitos T e a presença do *M. lepre* nas lesões de HV promoveriam a produção de IgM por linfócitos B. De acordo com esses autores, embora os anticorpos possam ser fundamentais nas respostas iniciais para proteção, a presença de linfócitos B e seus mediadores na infecção crônica pode contribuir para a imunopatologia da doença. Esses autores, por análise de bioinformática, observaram que a expressão de genes relacionados à secreção de imunoglobulinas nas lesões de HV difere daquela da HT. As imunoglobulinas M e A são mais abundantes nas lesões de pacientes com HV. Esses autores demonstraram por técnica de dupla marcação por imunofluorescência que as células que expressam IgM nas lesões de HV são plasmócitos. Além disso, culturas de monócitos do sangue estimuladas com *M. leprae* produzem quase 20 vezes mais IgM na presença de IL-5, sem concomitante aumento significativo na produção de IgA ou IgG.

Apesar de os anticorpos não atuarem na proteção na hanseníase, alguns dados sugerem seu papel protetor nas fases precoces dessa doença e de outras infecções micobacterianas. Além disso, a produção local de anticorpos também pode contribuir para a imunopatologia e lesão tecidual observada nessa micobacteriose. Segundo esses autores, o conhecimento dos mecanismos da produção local de anticorpos pode fornecer alvos para monitoramento e intervenção no tratamento das lesões teciduais da hanseníase (49).

Biswas et al. (50) conduziram um estudo indicando uma redução progressiva no número de linfócitos B da hanseníase paucibacilar (mais frequentes) para a forma multibacilar até a RT2 (mais raras), não observando variação significativa no infiltrado de plasmócitos entre as formas da doença. No entanto, ao contrário do estudo anterior, Fabel et al. (47) destacaram um aumento substancial no infiltrado de células CD138+ (plasmócitos) de amostras negativas para baciloscopia para amostras positivas, sugerindo uma participação mais proeminente dessas células em formas

mais difusas da doença. No que diz respeito aos linfócitos B, Fabel et al. (47). notaram uma distribuição semelhante à descrita por Biswas et al.(50), com uma redução progressiva da hanseníase paucibacilar para a multibacilar e a reação tipo 2. Além disso, Fachin et al. (4) observaram que linfócitos CD20+ eram mais abundantes em amostras de HT, enquanto plasmócitos CD138+ não apresentaram diferenças detectáveis. Juntos, os resultados desses estudos indicam que as células B e plasmócitos podem desempenhar papéis distintos na patogênese da hanseníase, influenciando desde as formas paucibacilares até as RT2.

A revisão da literatura deixa clara a relevância do estudo da hanseníase em nosso país. Os seus aspectos imunopatológicos têm sido objeto de numerosas pesquisas nacionais e internacionais, uma vez que a hanseníase representa modelo de doença espectral. Muitos estudos focam na participação dos elementos celulares e moleculares da resposta do hospedeiro frente ao *M. leprae* em amostras de sangue e, por vezes, nas lesões dos pacientes. Entretanto, o papel dos linfócitos B na resposta imune *in situ* da hanseníase foi pouco investigado.

Acreditamos que a avaliação comparativa de subconjuntos de linfócitos B nas formas polares e Indeterminada da hanseníase, bem como nos estados reacionais, poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunopatológicos dessa doença. Ademais, considera-se que, em várias doenças inflamatórias e mesmo neoplásicas, o melhor conhecimento do envolvimento dos linfócitos B e seus subconjuntos nos mecanismos patogénéticos pode conduzir e justificar o uso de terapias-alvo específicas (51-53), o que poderá vir a ser aplicado na hanseníase e em seus estados reacionais.

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1 Declaração de ética

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FCMUSP) sob número do parecer 2.966.174 (Anexo A).

4.2 Desenho e Casuística

Trata-se de um estudo de série de casos, cuja casuística se obteve pela análise retrospectiva de amostras de lesões cutâneas de doentes com hanseníase, colhidas com o objetivo de diagnóstico e classificação da doença e estados reacionais, no período de 2007 a 2019.

As amostras estavam armazenadas no arquivo do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Para revisão e confirmação diagnóstica da doença fez-se a análise de cortes histológicos, de cada amostra, corados pela hematoxilina eosina e pela técnica de Faraco para demonstração de bacilos álcool-ácido resistentes. Obteve-se a classificação das formas clínicas e reacionais pela associação dos dados histopatológicos e clínicos obtidos pela consulta dos prontuários dos pacientes.

A seleção final das amostras teve como base o diagnóstico clínico patológico dos subgrupos de estudo da doença e estados reacionais, considerando-se a adequação da mesma para a obtenção de cortes histológicos a serem submetidos às técnicas imuno-histoquímicas propostas.

Desse modo, a casuística compreendeu amostras de pele de 95 doentes com as apresentações clinicopatológicas da hanseníase: tuberculóide (23 amostras),

indeterminada (14 amostras), virchowiana (18 amostras), reação de tipo 1 (19 amostras) e eritema nodoso hansênico (21 amostras).

A tabela 1 apresenta os dados clínicos e demográficos do grupo de estudo.

Tabela 1. Identificação dos 95 casos estudados pelo número de registro na pesquisa, forma clínica, idade, sexo e local da lesão biopsiada.

FORMA	AMOSTRA	IDADE	SEXO	LOCAL DA LESÃO
TUBERCULÓIDE	LAF17A	57	F	BRAÇO E
	LAF14B	60	F	SOBRANCELHA D
	LAF7A	33	M	COTOVELO D
	LAF7B	71	M	MÃO E
	LAF14A	39	F	FLANCO D
	LAF8A	12	M	ANTEBRAÇO D
	LAF8B	57	M	FLANCO E
	LAF9A	25	F	COTOVELO D
	LAF9B	44	M	PERNA E
	LAF10A	60	M	ANTEBRAÇO D
	LAF11A	15	M	JOELHO D
	LAF12B	30	F	REGIÃO FRONTAL
	LAF13A	70	M	BRAÇO E
	LAF13B	36	M	PERIOCULAR D
	LAF15B	58	M	GLÚTEO D
	LAF16A	80	M	COXA E
	LAF16B	13	F	SOBRANCELHA D
	LAF18	45	M	JOELHO E
	LAF15A	52	F	SOE
	LAF11B	45	F	COTOVELO D
	LAF10B	27	M	MALAR E.
	LAF17B	29	F	COXA D
	LAF12A	70	F	PERNA D
INDETERMINADA	LAF19A	41	F	ANTEBRAÇO E
	LAF19B	57	F	COXA D
	LAF20A	40	F	MANDIBULAR E
	LAF20B	50	F	HEMIFACE E
	LAF21A	9	F	MALAR D
	LAF21B	55	F	HEMIFACE D
	LAF22A	60	M	MANDIBULAR E
	LAF22B	35	M	INFRAPATELAR
	LAF23A	17	F	FACE À E
	LAF23B	50	M	MSD

	LAF24A	11	M	MALAR D
	LAF24B	8	M	MALAR E
	LAF25A	25	F	HEMIFACE E
	LAF25B	39	M	DORSO DIREITO
VIRCHOWIANA	LAF37A	19	F	PERNA E
	LAF38A	48	F	ABDOMEN
	LAF38B	56	M	JOELHO D
	LAF39A	27	M	ANTEBRAÇOD
	LAF39B	23	F	PALMAR D
	LAF40A	52	M	ANTEBRAÇO E
	LAF40B	84	M	LOMBAR
	LAF41A	66	F	SOE
	LAF41B	43	M	PUNHO D
	LAF42A	32	M	PUNHO D
	LAF42B	59	M	SOE
	LAF43A	28	M	ANTEBRAÇO D
	LAF43B	62	M	DORSO
	LAF44A	42	M	DORSO INF D
	LAF44B	56	M	DORSO
	LAF45A	52	F	COTOVELO D
	LAF45B	53	M	DORSO
	LAF37B	26	F	COTOVELO D
REAÇÃO TIPO 2	LAF01B	28	M	ANTEBRAÇO E
	LAF01A	36	F	ANTEBRAÇO
	LAF06B	53	F	COXA E
	LAF02A	39	M	BRAÇO D
	LAF02B	51	M	BRAÇO E
	LAF03A	59	M	ANTEBRAÇO E
	LAF03B	66	M	TÓRAX ANT
	LAF04B	41	M	ANTEBRAÇO E
	LAF04A	71	M	BRAÇO
	LAF05B	31	M	ANTEBRAÇO
	LAF05A	44	M	BRAÇO
	LAF06A	53	M	PERNA E
	LAF46A	31	M	BRAÇO E
	LAF46B	32	F	PERNA D
	LAF47A	37	M	SOE
	LA47B	54	F	TÓRAX ANTERIOR
	LAF47A	54	M	DORSO INF
	LAF50A	32	M	BRAÇO D
	LAF50B	40	M	BRAÇO E
	LAF48B	41	M	COTOVELO E
	LAF49A	24	M	JOELHO D

REAÇÃO TIPO 1	LAF27B	48	F	FRONTE
	LAF27A	73	M	SOE
	LAF28B	54	M	TÓRAX ANTERIOR
	LAF29A	56	M	PERNA D
	LAF29B	56	M	MSE
	LAF30A	54	F	DORSO
	LAF30B	53	F	JOELHO D
	LAF31A	80	F	BRAÇO D
	LAF31B	53	M	ESCAPULAR D
	LAF32A	49	F	COTOVELO D
	LAF32B	16	M	BRAÇO E
	LAF33A	70	M	ANTEBRAÇO E
	LAF33B	26	M	COTOVELO D
	LAF34A	79	F	JOELHO E
	LAF34B	42	M	COXA E
	LAF35A	71	M	BRAÇO DIREITO
	LAF35B	18	M	BRAÇO E
	LAF36	42	F	GLÚTEO D
	LAF28A	31	M	DORSO

Especificamente para comparações de linfócitos B, analisamos como grupo controle dez amostras de pele normal (face medial do antebraço). Essas amostras foram anteriormente coletadas e estudadas por Quaresma et al.(54).

Ao contrário das células dendríticas e linfócitos T, os linfócitos B são conhecidos por serem muito escassos na pele normal em condições de homeostase (55). No entanto, optamos por estabelecer um grupo de controle dedicado para linfócitos B (imunomarcados com o anticorpo CD20) para reafirmar essa observação e eliminar a necessidade de controles de pele normal na avaliação de subconjuntos de linfócitos B.

4.3 Técnicas de imuno-histoquímica – protocolo de reação para um único anticorpo (para detecção de células CD20+ e MZB-1+)

Os cortes histológicos foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas de vidro com carga elétrica, para melhor aderência. A seguir, foram desparafinados em banhos de xilol e hidratados por cadeia descendente de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 10V e em seguida as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e água destilada.

Foi feita exposição antigênica com solução “retrieval” de recuperação de antígenos (Dako), pH 9,0 por 20 minutos a 95°C. Os cortes histológicos foram novamente lavados em água corrente, água destilada e solução salina tamponada por fosfatos (PBS) pH 7,4. A seguir foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente. A etapa seguinte constituiu-se da incubação dos espécimes com os anticorpos primários, diluídos em solução 1% de albumina bovina fração V (SERVA cód. 11930) acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “over-night” a 4°C. Após duas lavagens com PBS por cinco minutos cada, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho ou camundongo, durante 30 minutos a 37°C. Os espécimes foram novamente lavados em PBS e incubados com os sistemas de polímeros especificados na tabela 2, formados por duas etapas de 30 minutos de incubação, constituídas por reagente pós-primário e polímero. Após nova lavagem em PBS, a reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'- diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade de cor acastanhada foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação. Os cortes histológicos foram lavados em água corrente por 10 minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina.

Fragmentos histológicos de amígdala palatina representaram o controle positivo das reações. O controle negativo das reações foi obtido pela omissão dos anticorpos primários que foram substituídos por PBS ou soros isotípicos não reagentes.

4.4 Técnica imuno-histoquímica – protocolo de reação de dupla marcação

As técnicas de dupla marcação foram otimizadas a partir do protocolo descrito por Tudor et al. (42).

A primeira reação foi realizada de maneira semelhante ao protocolo descrito anteriormente. Entretanto, para os marcadores nucleares (PAX-5, Tbet e c-MAF) à solução de diaminobenzidina foram acrescentados 50 microgramas de cloreto de níquel, que resultaram em coloração negra.

Os espécimes foram lavados em água corrente, água destilada e PBS, pH 7,4. A seguir procedeu-se à segunda reação imuno-histoquímica, com incubação do segundo anticorpo primário e revelação da reação também com sistemas à base de polímeros e o cromógeno utilizado foi o “Permanent-green”, Bio-SB, para as imunomarcações citoplasmáticas (anticorpos CD20 e CD5).

Para uma melhor discriminação entre a população de células B da zona marginal (MZ) e plasmablastos/células plasmáticas nos locais da lesão, realizamos a marcação dupla PAX5/MZB-1 para distinguir as células MZB/B-1 dos plasmablastos e células plasmáticas, que têm a expressão de PAX5 silenciada (56).

A Tabela 2 exibe as especificações dos anticorpos, sistemas de detecção e cromógenos usados nos procedimentos imuno-histoquímicos.

Tabela 2. Anticorpos utilizados, especificações e sistemas de revelação

Anticorpo primário	Código	Marca	Diluição/sistema de revelação
Ig de Coelho anti-CD5	SP-19	Cell-marque	1:50 / Polink
Ig de camundongo anti-PAX5	312M-15	Cell-marque	1:200 / Envision flex
Ig de camundongo anti-CD20	AC-0012	Epitomics	1:100 / Envision flex
Ig de Coelho anti-MZB-1	11454-1	Proteintech	1:200 / Polink
Ig de Coelho anti-Tbet	ab150440	ABcam	1:200 / Polink
Anti-c-MAF rabbit antibody	SC7866	Vector	1:100 / Impress
Cromógenos usados em técnicas de dupla marcação	Código	Marca	Diluição/sistema de revelação
Membrana/citoplasma PermaGreen / HRP substrate	K074-RUO	Diagnostic BioSystems	Não se aplica
Núcleo 3.3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloridrate	D5637-50G	Sigma Life Science	Não se aplica

4.5 Técnica de dupla marcação por imunofluorescência para análise em microscópio confocal a laser

Para a demonstração de linfócitos B1 fez-se a dupla marcação com os anticorpos anti-IgM e anti-PAX5 pela técnica de imunofluorescência e análise em microscópio confocal a laser. Ambos os anticorpos primários anti-IgM e anti-PAX5 foram diluídos e misturados em solução de 1% de albumina bovina. O material foi incubado nesta mistura por 48 horas a 4°C. Após este período foram aplicados os anticorpos secundários conjugados específicos para isótipo (Alexa Fluor 488 (verde) anti-IgG de coelho e AlexaFluor® 555 (vermelho) anti-IgG de jumento, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e coloração nuclear com 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidroclorido (DAPI - Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (azul) por 60 minutos. As lâminas foram montadas em meio de montagem (Hydromount, National Diagnostics, Atlanta, GA, EUA) e lamínulas de vidro, mantidas a 4°C, protegidas da luz até a análise ao microscópio confocal a laser.

As imagens fluorescentes foram adquiridas utilizando excitação UV/Laser no microscópio confocal Olympus FluoView 1000 (FV1000), do laboratório multiusuário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

4.6 Análises Morfométricas e Estatísticas

Todas as lâminas imunomarcadas com anticorpos CD20 e MZB-1 foram digitalizadas com o sistema de "whole slide imaging" 3DHISTECH (Budapeste, Hungria). Para a análise morfométrica, foram obtidas imagens com zoom digital de 10× de campos sucessivos, não sobreponíveis, de toda a derme para cada amostra (de 6 a 10 campos/amostra), utilizando o software CaseViewer (versão 2.3 64-bit, 3DHISTECH Ltd.).

As imagens obtidas, de cada amostra, foram submetidas à análise morfométrica com o software gratuito Fiji / ImageJ do National Institute of Health - USA (<http://imagej.nih.gov>). Após calibração, cada imagem foi convertida em uma imagem em 256 cores de 8 bits usando o canal H-DAB (Figura 1A). As áreas imunomarcadas foram convertidas para a cor vermelha (Figura 1B). Fez-se a medida das áreas

positivas (em vermelho) (Figura 1C). Por fim, fez-se a medida da área total dérmica (Figura 1D). A fração de área positiva foi obtida da razão da área imunomarcada positiva sobre a área total de derme. Após a análise de todas as imagens de cada amostra, fez-se a média aritmética da fração de área imunomarcada (CD20 e MZB1) para cada uma das amostras (casos).

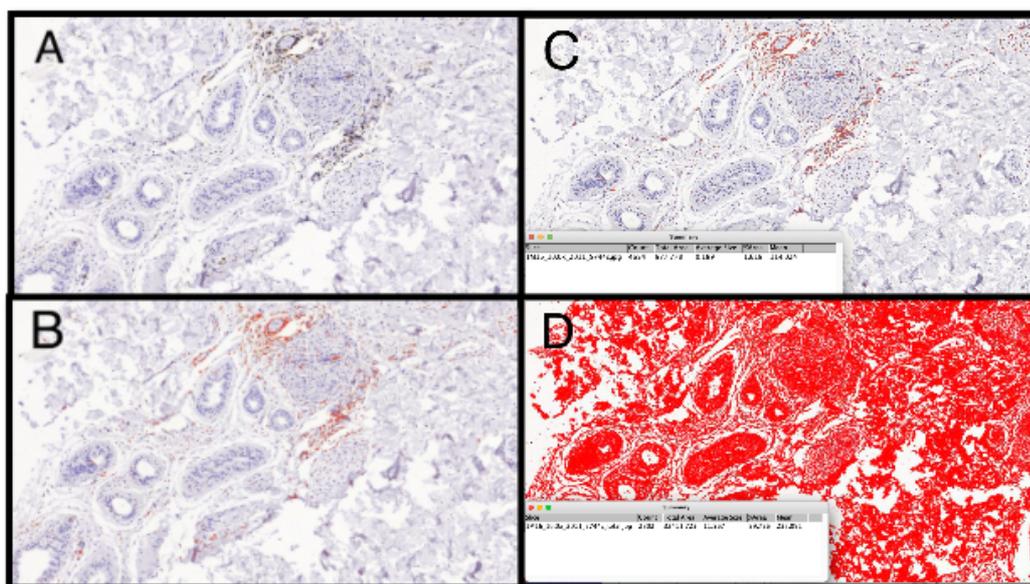


Figura 1. Morfometria de uma imagem em caso de hanseníase tuberculóide: imuno-histoquímica CD20 de um campo 10x (A), imagem em RGB-color com imunomarcção corada em vermelho (B), aferição da área imunomarcada (C), e aferição da área dérmica total (D).

A análise morfométrica da densidade de células com co-expressão positiva foi obtida pela contagem manual das células duplamente positivas e das células imunomarcadas por marcadores de Linfócitos B (PAX5 ou CD20) nos focos “hot spots” da derme de imagens digitais obtidas com objetiva de 40x. Fez-se o cálculo da área dérmica, de cada imagem pelo software ImageJ. Após analisar todas as imagens para cada amostra, a média aritmética foi calculada para a proporção de células duplamente imunomarcadas em relação ao total de células B (CD20 ou PAX5 positivas) por unidade de área.

As amostras submetidas à técnica de imunofluorescência não foram quantificadas, uma vez que somente cinco amostras do grupo de RT1 foram submetidas a esta técnica.

Para a comparação dos resultados obtidos entre os grupos de estudo fez-se a análise pelo teste de ANOVA não paramétrico, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal Wallis e teste de Dunn-Bonferroni para as análises *post hoc*.

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 10.1.0 para macOS (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA, www.graphpad.com). Para todas as análises realizadas, considerou-se o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Amostras de 95 casos e 10 controles foram analisadas. Entre os casos, a proporção de homens para mulheres foi de 11:9, indicando uma representação ligeiramente maior de homens. Os indivíduos deste grupo tinham uma idade média de 44,64 anos, variando de 8 a 84 anos. No grupo de controle, a idade média foi de (44,7 anos), com uma proporção correspondente de homens para mulheres de (5:5). O fluxograma abaixo indica o número de casos e controles submetidos a cada reação imuno-histoquímica (Figura 2).

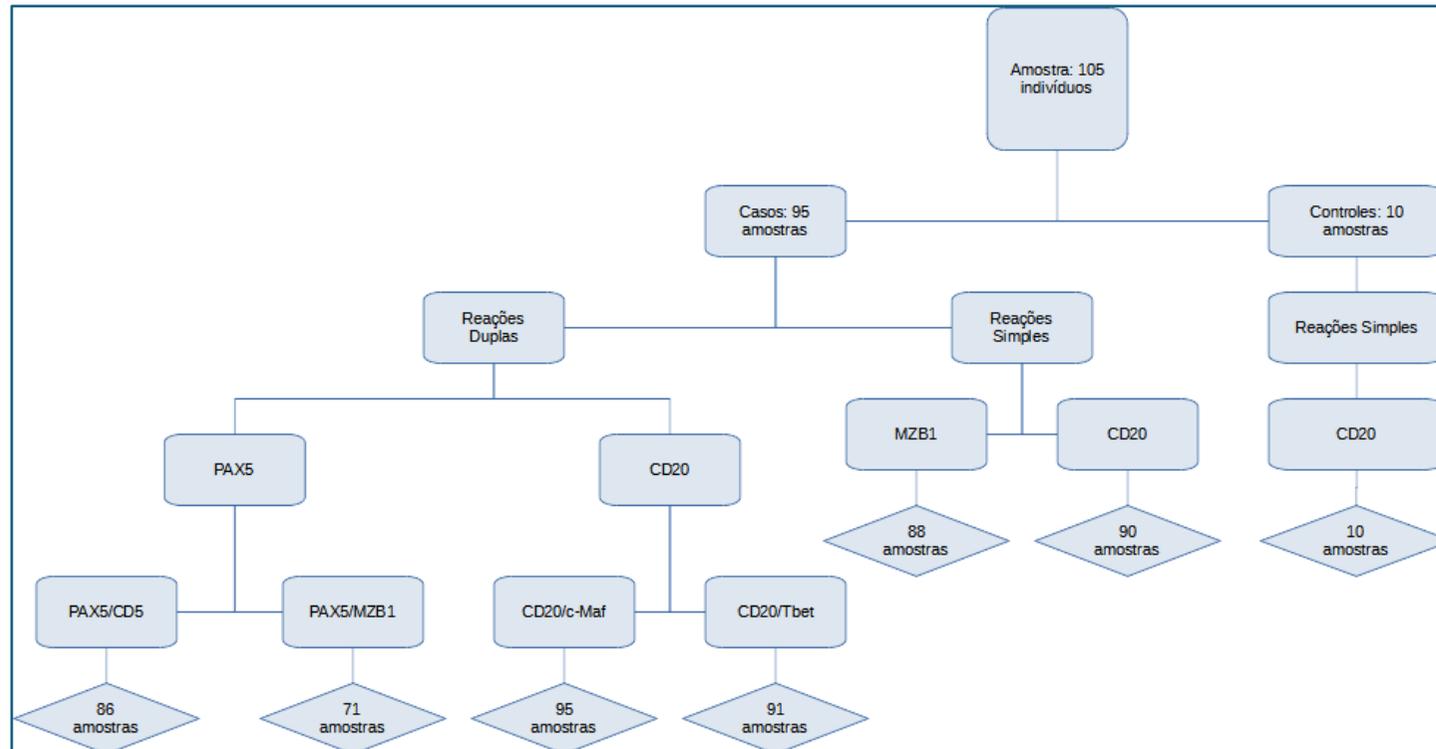


Figura 2. Fluxograma indicando o número de casos e controles em que foram realizadas cada reação imuno-histoquímica.

5.1 Presença e distribuição de células com marcação única

A presença e distribuição de linfócitos B mostrou-se diferente na resposta tecidual dos grupos de hanseníase estudados. Nas amostras de HT os linfócitos B, foram observados na derme papilar e ao redor dos granulomas epitelioides (figura 3A). Na HI foram escassos e, quando presentes, mostraram-se dispostos junto aos vasos sanguíneos e anexos cutâneos (figura 3B). Raros linfócitos foram observados, junto de macrófagos vacuolizados na resposta tecidual das amostras de HV (figura 3C). Essas células foram igualmente escassas nas amostras de pele de hanseníase em RT2 (figura 4B) e pouco mais abundantes e dispostas ao redor de granulomas nas amostras de hanseníase em RT1 (figura 4A).

As células imunomarcadas com anticorpo MZB1 apresentaram morfologia ora semelhante à de linfócitos, ora pouco maiores e semelhantes a plasmócitos. Mostraram-se aparentemente mais escassas que CD20 nas amostras de HT (figura 3D) e extremamente escassas ou ausentes nas amostras de hanseníase indeterminada (figura 3E). Nas amostras de HV, por outro lado, foram mais frequentemente observadas que os linfócitos B e apresentavam morfologia plasmocitária e de prováveis imunoblastos (figura 3F). Nas amostras de RT2 (Figura 4D) formavam pequenos agrupamentos e, como nas amostras HV (figura 3F), apresentavam aspecto morfológico de plasmócitos. As células MZB1 positivas dispunham-se na derme papilar e, em alguns casos, eram escassas e mesmo ausentes em torno de granulomas, ao contrário do observado nas amostras tuberculoides. Nas amostras de RT1, notou-se a presença de células imunomarcadas pelo anticorpo MZB1 dispostas na derme superficial, entretanto mais escassas na derme reticular média (figura 4C).

5.2 Presença e distribuição de células com marcação dupla

Em todas as subpopulações de células B avaliadas, observamos uma presença escassa de células com dupla marcação. A Figura 5 (A-D) ilustra alguns desses casos, contrastando com os infiltrados abundantes mostrados anteriormente para o CD20.

O exame das amostras de RT1 submetidas à técnica de dupla marcação por imunofluorescência e examinadas ao microscópio confocal a laser demonstrou a presença de células com co-expressão de PAX5 e IgM, portanto linfócitos B1 em meio ao infiltrado inflamatório da derme (Figura 5E).

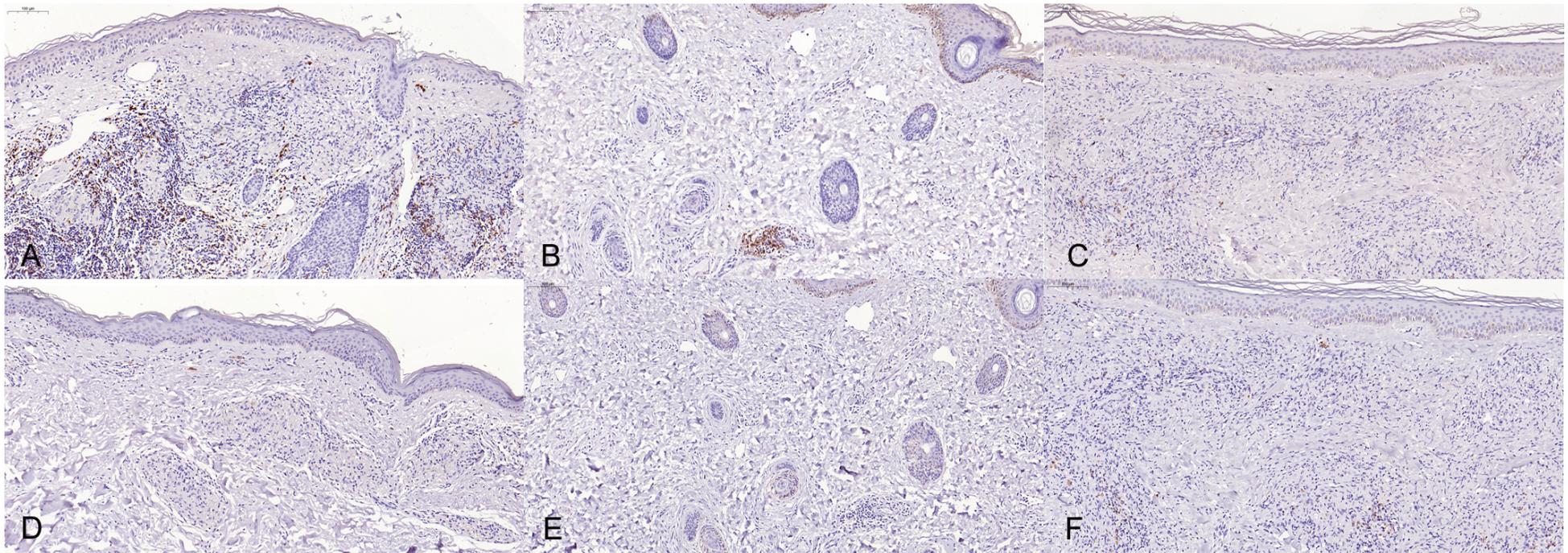


Figura 3. Linfócitos B imunomarcados pelo anticorpo CD20. A – hanseníase tuberculoide. Notar distribuição das células imunomarcadas ao redor dos granulomas. B – Hanseníase indeterminada. Pequeno agrupamento de linfócitos B em torno de vaso sanguíneo da derme reticular. C. Hanseníase virchowiana apresentando raros linfócitos B de permeio ao infiltrado macrófágico dérmico. D – Hanseníase tuberculoide exibindo acentuada escassez de células imunomarcadas pelo anticorpo anti-MZB1. E – Hanseníase indeterminada mostrando ausência de células MZB1 positivas na derme. F – Hanseníase virchowiana com células imunomarcadas pelo anticorpo anti-MZB1 mais abundantes que linfócitos B quando comparada à imagem C. As barras exibem a escala de aumentos originais.

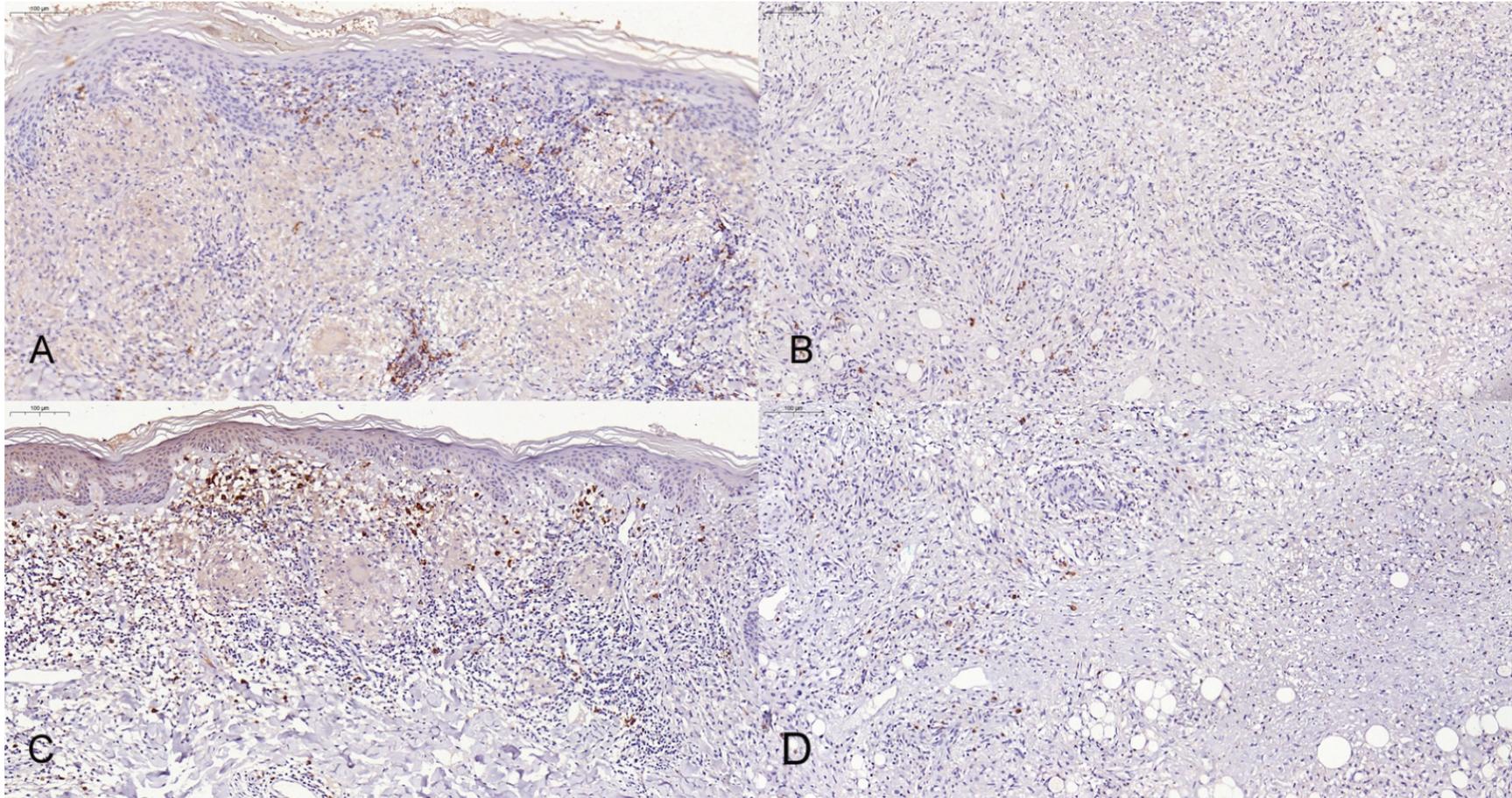


Figura 4. Imunomarcção de CD20 e MZB-1 nas reações hansênicas. A – Reação de tipo 1. Linfócitos B imunomarcados pelo anticorpo anti-CD20 dispostos na derme superficial e agrupados na derme reticular média junto de granulomas epitelióides. B – Reação de tipo 2. Notar a escassez de linfócitos B em meio ao infiltrado dérmico. C – Reação de tipo 1. Presença de células imunomarcadas pelo anticorpo MZB1 dispostas na derme superficial, entretanto mais escassas na derme reticular média. D – Reação de tipo 2. As células imunomarcadas pelo anticorpo MZB1 mostram-se mais abundantes que os linfócitos B representados na figura B. As barras exibem a escala de aumentos originais.

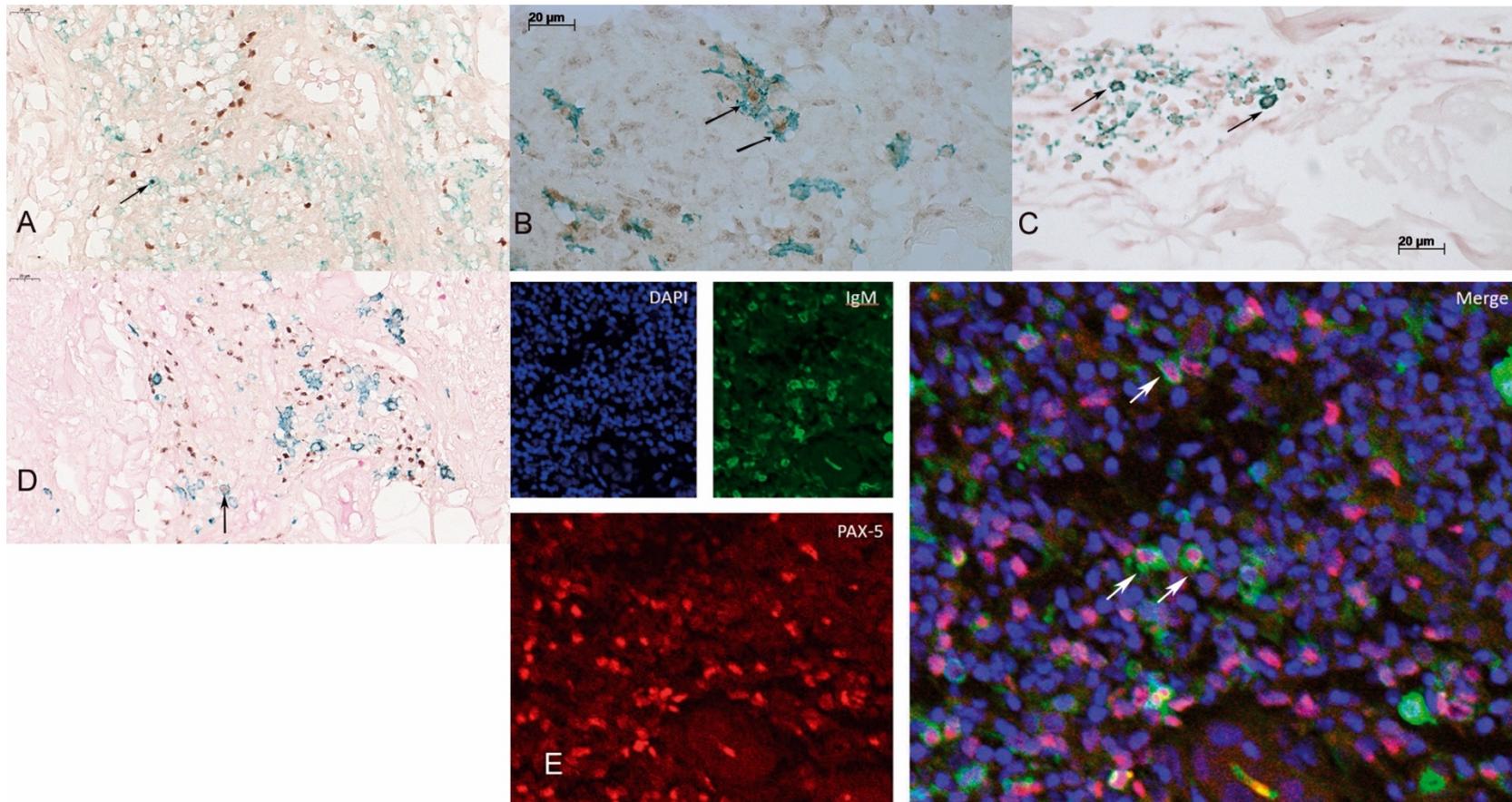


Figura 5. A – Reação hansênica de tipo 1. Linfócitos B1 (seta), em meio ao infiltrado dérmico, apresentando marcação com o anticorpo PAX5 (marcação nuclear) e CD5 (marcação citoplasmática). B – Hanseníase tuberculoide. Linfócitos B efetores (setas) imunomarcados pelo anticorpo Tbet (marcação nuclear) e CD20 (marcação membranosa e citoplasmática). C – Reação hansênica de tipo 1. Linfócitos B reguladores (setas) revelados pela dupla marcação com o anticorpo c-MAF (marcação nuclear) e CD20 (marcação membranosa e citoplasmática). D – Hanseníase tuberculoide. Linfócito MZB B1 revelado pela dupla marcação com o anticorpo PAX5 (marcação nuclear) e anticorpo MZB1 (marcação citoplasmática). E – Painel de dupla marcação por imunofluorescência e observação ao microscópio confocal a laser com os anticorpos PAX 5 (marcação nuclear em vermelho) e IgM (marcação citoplasmática em verde); em azul, núcleos evidenciados pelo corante DAPI. Notar linfócitos B1 caracterizados pela co-expressão de PAX5 e IgM (setas). As barras das imagens de técnicas de imuno-histoquímica demonstram a escala de aumentos originais.

5.3 Análise morfométrica e estatística

As diferenças médias de classificação observadas no teste de comparações múltiplas de Dunn delinham distinções na proporção de células duplamente positivas em comparação com células PAX5 ou CD20 individualmente positivas por unidade de área entre diferentes grupos de hanseníase. Diferenças negativas indicam proporções reduzidas, enquanto diferenças positivas significam proporções elevadas. As diferenças nas medianas entre grupos com comparações estatisticamente significativas estão resumidas na Tabela 3, juntamente com seus valores de p correspondentes. A Figura 6 exibe as medianas para todos os grupos de forma gráfica, juntamente com suas medidas de dispersão central correspondentes.

Como o anticorpo MZB1 revela a proteína MZB1, relacionada ao desdobramento e secreção de imunoglobulinas e que está presente no retículo endoplasmático de linfócitos B da zona marginal de folículos linfóides, plasmablastos e plasmócitos (57) resolvemos comparar a média da fração de área de expressão de CD20 (marcador de linfócitos B) com a média da fração de área de MZB1 em cada um dos grupos de hanseníase, na tentativa de verificar se a expressão de MZB1 seria somente devida à presença de plasmablastos e plasmócitos na resposta tecidual das amostras estudadas. A **tabela 4** apresenta os resultados da análise estatística dessas comparações.

Tabela 3 - Diferenças nas medianas entre os grupos com comparações estatisticamente significativas, e seus respectivos valores de p .

CD20		
Teste de Dunn com múltiplas comparações	Diferença média de classificação	Valor de p ajustado
HT vs. HV	51.82	<0.0001
HT vs. HI	58.67	<0.0001
HT vs. Controles	48.57	0.0002
HV vs. RT1	-41.31	0.0004
HV vs. RT2	-37.8	0.0016
HI vs. RT1	-48.17	<0.0001

HI vs. RT2	-44.66	0.0002
RT1 vs. Controles	38.07	0.0145
RT2 vs. Controles	34.56	0.0374
MZB-1		
Teste de Dunn com múltiplas comparações	Diferença média de classificação	Valor de p ajustado
HT vs. HI	35.07	0.0006
HV vs. HI	36.58	0.0007
HI vs. RT1	-32.17	0.0066
PAX5/CD5		
Teste de Dunn com múltiplas comparações	Diferença média de classificação	Valor de p ajustado
HV vs. RT1	-22.93	0.0245
HI vs. RT1	-30.86	0.0024
RT1 vs. RT2	30.17	0.0005
CD20/Tbet		
Teste de Dunn com múltiplas comparações	Diferença média de classificação	Valor de p ajustado
HT vs. HI	27.33	0.0055
HT vs. RT2	22.86	0.0123
HI vs. RT1	-27.29	0.0096
RT1 vs. RT2	22.82	0.0227
CD20/c-Maf		
Teste de Dunn com múltiplas comparações	Diferença média de classificação	Valor de p ajustado
HI vs. RT1	-15.74	0.0373
PAX5/MZB-1		
Teste de Dunn com múltiplas comparações	Diferença média de classificação	Valor de p ajustado
HT vs. RT1	-31.18	<0.0001
HV vs. RT1	-37.5	
HI vs. RT1	-37.5	<0.0001
RT1 vs. RT2	35.53	<0.0001

HT: hanseníase tuberculóide; HI: hanseníase indeterminada; HV: hanseníase virchowiana; RT2 – Reação tipo 2; RT1 – Reação tipo 1. Teste estatístico de comparações múltiplas de Dunn, nível de significância $\alpha = 0,05$.

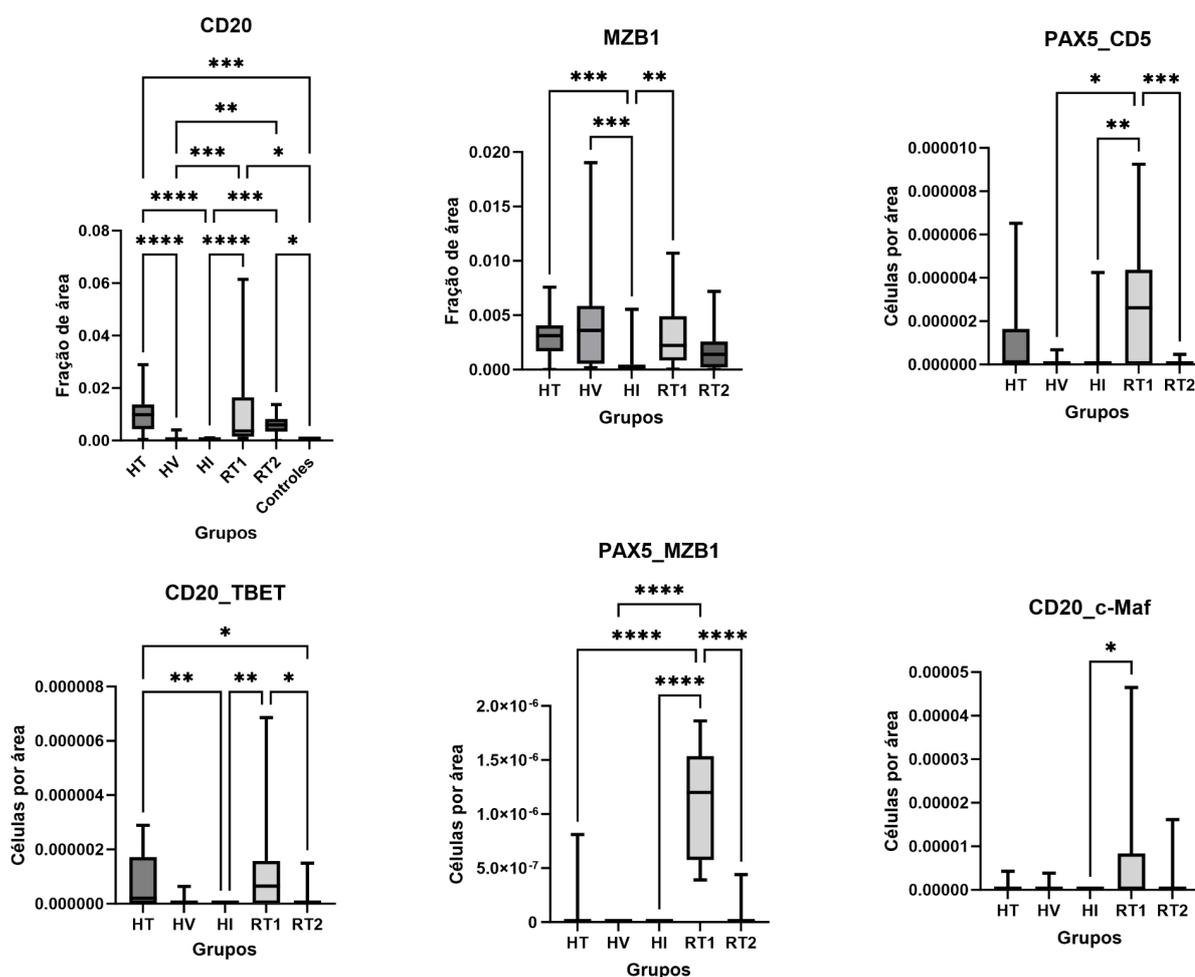


Figura 6 - Medianas de todos os grupos em forma gráfica, juntamente com suas respectivas medidas de dispersão central. Os asteriscos indicam comparações post-hoc que são estatisticamente significativas (nível de significância $\alpha = 0,05$). HT: hanseníase tuberculoide; HI: hanseníase indeterminada; HV: hanseníase virchowiana; RT2 – Reação tipo 2; RT1 – Reação tipo 1.

Tabela 4. Medianas e valores de p para comparações entre grupos quanto à expressão de CD20 versus MZB1 em amostras de hanseníase.

	CD20	MZB1	Valor de p^*
HT	0.00981	0.00312	0.000004593
HI	0.00002	0.00000	NS
HV	0.00019	0.00361	0.0004653
RT2	0.00596	0.00127	0.007633
RT1	0.00208	0.00225	NS

HT: forma tuberculoide; HI: forma indeterminada; HV: forma virchowiana; RT2 – reação hanseníase de tipo 2; RT1 – reação hanseníase de tipo 1; NS: não-estatisticamente significativa.
*Segundo teste de Mann-Whitney

6. DISCUSSÃO

Observamos que a fração de área ocupada por células CD20+ (linfócitos B) foi maior na forma tuberculoide da hanseníase do que na forma virchowiana. Esses achados são consistentes com a literatura recente (47, 50). O grupo de HV, por outro lado, também apresenta um componente menor de células B em comparação aos grupos de reação, tanto RT1 quanto RT2.

O envolvimento de linfócitos B em infecções por micobactérias tem sido recentemente discutido. Na tuberculose, linfócitos B e células plasmáticas são considerados envolvidos nos mecanismos de formação de granulomas, produção de citocinas, resposta de linfócitos T e apresentação de antígenos (41, 47). Assim, a maior expressão de CD20 e linfócitos B na resposta granulomatosa observada na HT seria esperada e consistente com dados da literatura.

Em nosso estudo, curiosamente, amostras de estados reacionais (RT1 e RT2) mostraram uma população maior de linfócitos B do que o grupo virchowiano. Em RT1, isso poderia estar relacionado à melhor organização da resposta granulomatosa. Em RT2, nossos achados diferem dos descritos por Biswas et al. (50), onde os autores relataram menos linfócitos B em RT2 do que na hanseníase multibacilar. Esses autores correlacionaram a presença de linfócitos B em RT2 com a presença de granulomas malformados no tecido.

Lesões de hanseníase indeterminada demonstraram menor expressão de linfócitos B do que o grupo tuberculoide e os grupos reacionais (RT1 e RT2). Talvez isso se deva à baixa intensidade da resposta inflamatória nas lesões de hanseníase indeterminada ou à polarização indefinida desse grupo.

A molécula MZB-1, codificada pelo gene MZB-1, está presente no retículo endoplasmático e atua como uma chaperona envolvida no desdobramento e secreção de imunoglobulina M (IgM). O anticorpo MZB-1 é um marcador para linfócitos B, especialmente linfócitos B-1, linfócitos MZB, plasmablastos e plasmócitos (57). Linfócitos B-1 são caracterizados pela secreção de IgM. Escolhemos este marcador na tentativa de verificar a presença ou ausência desse subtipo de linfócito B em lesões

de hanseníase. No entanto, conseguimos demonstrar a expressão de IgM em células positivas para PAX5 (células B) apenas por meio da técnica de imunofluorescência e análise por microscopia confocal, já que os resultados obtidos pela técnica imunoenzimática não foram satisfatórios.

Linfócitos MZB, assim como linfócitos B-1, fazem parte da resposta imune inata e desempenham papéis importantes nas fases iniciais das respostas imunes humorais (58). Linfócitos MZB residem nos folículos dos órgãos linfoides, especialmente no baço, e transportam eficientemente antígenos do sangue para os folículos, onde ativam células T CD4+ e se diferenciam em plasmócitos (57).

Em nossa casuística, a expressão de MZB-1 foi maior na HT do que na HI. A HI, por sua vez, também apresentou menor expressão de MZB-1 do que a HV e a RT1. É interessante notar que os linfócitos MZB que expressam MZB-1 se correlacionam com um maior número de linfócitos T CD8+ infiltrados no ambiente tumoral de carcinoma pancreático e estão relacionadas a um melhor prognóstico para essa neoplasia (59).

Analisando a expressão de CD20 e MZB-1 nos grupos estudados, verificamos que, no grupo HT, a expressão de CD20 foi maior do que a de MZB-1. Isso se deve provavelmente ao fato de que MZB-1 marca linfócitos B-1, MZB e plasmócitos. Plasmócitos estão fortemente associados à resposta Th2 (humoral) na hanseníase e são escassos no polo Th1 (47, 50). Além disso, observamos nas técnicas de dupla marcação que MZB e B-1 eram muito mais escassos do que CD20 em todos os grupos de pacientes, incluindo HT.

No grupo HV, por outro lado, a expressão de CD20 foi menor do que a de MZB-1. Em HV, o componente de plasmócitos é significativo (47, 50). Neste caso, os plasmócitos seriam revelados pelo anticorpo MZB-1. A escassez de linfócitos B-1 e MZB em HV e RT2 reforça a hipótese de que a marcação de MZB-1 em HV e RT2 foi predominantemente plasmocitária, e não de linfócitos B-1/MZB.

Na RT2, observamos uma maior expressão de CD20 em comparação com MZB-1. Diante deste achado, podemos propor uma hipótese semelhante à do grupo

HT, de que os linfócitos B-1/MZB também são escassos na RT2. A fraca marcação de MZB-1 neste grupo também se explicaria pela baixa presença de plasmócitos na RT2, já documentada na literatura (47, 50).

Não houve diferença no grupo de HI em relação à expressão dos dois marcadores, possivelmente porque as células inflamatórias são muito escassas/ausentes em ambos.

Não houve diferença na expressão de CD20 e MZB-1 em RT1. Considerando que plasmablastos e plasmócitos são reconhecidamente pouco frequentes em RT1 (47, 50), as escassas células que exibem marcação imunohistoquímica para MZB-1 são provavelmente linfócitos MZB/B-1. Notavelmente, observamos uma marcação mais intensa tanto para linfócitos B-1 quanto MZB nas lesões de RT1.

Ao utilizar a colocalização PAX5/MZB-1, excluimos plasmablastos e plasmócitos, restringindo a marcação a linfócitos B-1/MZB. Curiosamente, a diferença entre os grupos em PAX5/MZB-1 (linfócitos B-1 e MZB) foi muito semelhante à de PAX5/CD5 (que marca apenas linfócitos B-1), indicando que PAX5/MZB-1 não marcou um número substancial de células MZB. Para ambas as marcações (PAX5/MZB-1 e PAX5/CD5), RT1 apresentou significativamente mais células que RT2, HV e HI. No entanto, exclusivamente em PAX5/MZB-1, observamos uma contagem significativamente maior de células em RT1 em comparação com HT. Como essa discrepância não foi observada na marcação PAX5/CD5 (células B-1), podemos atribuí-la a uma diferença no número de linfócitos MZB, possivelmente menor na HT.

Os linfócitos B efetores-1 são mais abundantes em RT1 e HT, de modo significativo em comparação aos grupos HI e RT2. A associação das células Be1 com a resposta Th1 torna esse resultado esperado. Embora não tenha atingido significância estatística, HV demonstrou uma contagem menor de células Be1 em comparação com HT e RT1, reforçando ainda mais a conexão das células Be1 com a resposta Th1 na hanseníase. Células Th1, especialmente aquelas produzindo IFN- γ ou estimuladas por IL-12, induzem a polarização de células B, chamadas de Be1, levando à expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-12 (6, 7). Por outro lado, a interação com células Th2 ou a exposição a IL-4 direciona linfócitos B,

chamados de Be2, a produzir IL-2 e IL-4. Linfócitos Be1 e Be2, por sua vez, desempenham papéis na promoção da diferenciação *in vitro* de linfócitos Th1 e Th2, respectivamente (6, 60). Posteriormente, foi revelado que o IFN- γ derivado de linfócitos B desempenha um papel crucial nas respostas Th1, contribuindo para o transplante e rejeição tumoral, artrite autoimune e respostas antibacterianas (15, 61-63).

Linfócitos B reguladores foram notavelmente escassos em todos os grupos, com uma diferença significativa observada apenas entre RT1 e HI. É importante notar que, como mencionado anteriormente, linfócitos MZB e B-1 são subtipos de linfócitos B reguladores. No entanto, a imunomarcagem para MZB e B-1 foi muito mais intensa do que para Bregs. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de termos identificado tais células a partir da expressão do fator de transcrição IL-10, c-Maf, o que implicaria em uma avaliação funcional dos linfócitos B reguladores por meio da sua produção de IL-10. A presença mais fraca de IL-10 em lesões com atividade inflamatória menos intensa indicaria menor atividade, e não necessariamente a ausência dessas células.

A predominância de linfócitos B reguladores no polo Th1 está alinhada com estudos anteriores que destacaram o papel protetor dos Bregs em várias doenças autoimunes, como esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, diabetes mellitus tipo 1 e doença inflamatória intestinal, todas associadas a células Th1 e/ou Th17 (64). Além disso, Bregs têm sido implicados na imunologia tumoral, onde as células Th1 combatem diretamente as células tumorais liberando citocinas que ativam receptores de morte celular na superfície das células tumorais (65). Linfócitos B reguladores são conhecidos por serem recrutados por tumores, exercendo suas propriedades imunossupressoras dentro do microambiente tumoral e prejudicando as respostas antitumorais (65). Evidências crescentes sugerem que Bregs desempenham um papel na evasão da resposta imune do corpo durante a infecção pelo vírus da hepatite B, onde a cura é altamente dependente de respostas Th1 (66). Bregs também podem ser estimulados diretamente por parasitas e bactérias, levando a uma resposta reguladora caracterizada pela produção de IL-10 durante infecções (14).

Nosso estudo lança luz sobre a distribuição distinta de subconjuntos de células B em lesões de hanseníase, revelando variações significativas entre diferentes formas clínicas e estados reacionais. Os resultados obtidos apontam para uma participação mais expressiva dos linfócitos B, talvez em consonância com linfócitos T, no polo tuberculoide e reação de tipo 1 da doença. O melhor conhecimento do envolvimento dos linfócitos B e seus subconjuntos nos mecanismos patogénicos, poderá embasar e justificar o uso de terapias-alvo específicas na hanseníase e em seus estados reacionais, como o proposto para doenças inflamatórias e neoplásicas (51-53).

7. CONCLUSÕES

Notavelmente, os linfócitos B foram mais frequentes no polo tuberculoide, contrastando com a escassez observada na hanseníase virchowiana.

A expressão diferencial de MZB-1 ressaltou ainda mais a heterogeneidade dentro dos subtipos clinicopatológicos da hanseníase, com a hanseníase tuberculoide apresentando número mais elevado de MZB-1 em comparação com a forma indeterminada e a hanseníase virchowiana.

Todos os subtipos de linfócitos identificados por meio de marcação dupla foram observados em maior número na reação de tipo 1, incluindo linfócitos B-1 e MZB, indicando uma maior participação dos linfócitos B nesse tipo de reação.

Os linfócitos B efetores mostraram-se mais frequentes nas lesões de hanseníase tuberculoide e reação de tipo 1, o que os pode associar à resposta de perfil Th1.

Os linfócitos B reguladores foram escassos em todos os grupos estudados, entretanto foram mais frequentes na reação de tipo 1 que se caracteriza por resposta imune robusta, sublinhando o potencial papel imunossupressor e/ou imunorregulador desse subtipo de linfócitos (Breg) na hanseníase.

Os resultados obtidos contribuem com informações valiosas sobre a intrincada interação entre subconjuntos de linfócitos B e a resposta imune na hanseníase, abrindo caminho para pesquisas adicionais sobre a imunopatogênese dessa doença complexa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

1. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. 2012;42(11):2925-36.
2. Sauer ME, Salomão H, Ramos GB, D'Espindula HR, Rodrigues RS, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: Expected-and unexpected-developments and perspectives. *Clin Dermatol*. 2016;34(1):96-104.
3. Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ*. 1974;51(5):451-65.
4. Fachin LR, Soares CT, Belone AF, Trombone AP, Rosa PS, Guidella CC, et al. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histol Histopathol*. 2017;32(4):385-96.
5. Somekh E, Serour F, Gorenstein A, Vohl M, Lehman D. Phenotypic pattern of B cells in the appendix: reduced intensity of CD19 expression. *Immunobiology*. 2000;201(3-4):461-9.
6. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*. 2000;1(6):475-82.
7. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(4):236-47.
8. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):118-32.
9. Prieto JMB, Felipe MJB. Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2017;54:38-44.
10. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):34-46.
11. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1285:97-114.
12. Egbuniwe IU, Karagiannis SN, Nestle FO, Lacy KE. Revisiting the role of B cells in skin immune surveillance. *Trends Immunol*. 2015;36(2):102-11.
13. Dai YC, Zhong J, Xu JF. Regulatory B cells in infectious disease (Review). *Mol Med Rep*. 2017;16(1):3-10.
14. Zhang X. Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(2):113-21.
15. Bao Y, Liu X, Han C, Xu S, Xie B, Zhang Q, et al. Identification of IFN- γ -producing innate B cells. *Cell Res*. 2014;24(2):161-76.

16. Durali D, de Goër de Herve MG, Giron-Michel J, Azzarone B, Delfraissy JF, Taoufik Y. In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. *Blood*. 2003;102(12):4084-9.
17. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):441-51.
18. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(6):856-64.
19. Froes LAR, Trindade MAB, Sotto MN. Immunology of leprosy. *Int Rev Immunol*. 2022;41(2):72-83.
20. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255-73.
21. Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):205-18.
22. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445-55.
23. Martiniuk F, Giovinazzo J, Tan AU, Shahidullah R, Haslett P, Kaplan G, et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol*. 2012;11(5):626-30.
24. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet*. 2004;363(9416):1209-19.
25. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005;11(6):653-60.
26. Sauer ME, Salomao H, Ramos GB, D'Espindula HR, Rodrigues RS, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: Expected-and unexpected-developments and perspectives. *Clin Dermatol*. 2016;34(1):96-104.
27. Hungria EM, Bühner-Sékula S, de Oliveira RM, Aderaldo LC, Pontes AA, Cruz R, et al. Leprosy reactions: The predictive value of *Mycobacterium leprae*-specific serology evaluated in a Brazilian cohort of leprosy patients (U-MDT/CT-BR). *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005396.
28. Hungria EM, Buhner-Sekula S, de Oliveira RM, Aderaldo LC, Pontes AA, Cruz R, et al. Leprosy reactions: The predictive value of *Mycobacterium leprae*-specific serology evaluated in a Brazilian cohort of leprosy patients (U-MDT/CT-BR). *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005396.
29. Hussain T, Kulshreshtha KK, Yadav VS, Katoch K. CD4+, CD8+, CD3+ cell counts and CD4+/CD8+ ratio among patients with mycobacterial diseases (leprosy, tuberculosis), HIV infections, and normal healthy adults: a comparative analysis of studies in different regions of India. *J Immunoassay Immunochem*. 2015;36(4):420-43.
30. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*. 2007;317(5838):627-9.

31. Quaresma JA, Esteves PC, de Sousa Aarão TL, de Sousa JR, da Silva Pinto D, Fuzii HT. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. *Microb Pathog*. 2014;76:84-8.
32. Chowdhry S, Shukla A, D'souza P, Dhali T, Jaiswal P. Treatment of severe refractory erythema nodosum leprosum with tumor necrosis factor inhibitor Etanercept. *Int J Mycobacteriol*. 2016;5(2):223-5.
33. Walker SL, Balagon M, Darlong J, Doni SN, Hagge DA, Halwai V, et al. ENLIST 1: An International Multi-centre Cross-sectional Study of the Clinical Features of Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0004065.
34. Kantor A. A new nomenclature for B cells. *Immunol Today*. 1991;12(11):388.
35. Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, et al. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity*. 2010;33(5):777-90.
36. Mi Z, Liu H, Zhang F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Front Immunol*. 2020;11:567.
37. Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol*. 1987;88(5):569-73.
38. Streilein JW. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol*. 1983;80 Suppl:12s-6s.
39. Geherin SA, Gómez D, Glabman RA, Ruthel G, Hamann A, Debes GF. IL-10+ Innate-like B Cells Are Part of the Skin Immune System and Require $\alpha 4\beta 1$ Integrin To Migrate between the Peritoneum and Inflamed Skin. *J Immunol*. 2016;196(6):2514-25.
40. Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, Mastelic B, Tacchini-Cottier F, Louis J, et al. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol*. 2010;184(2):886-94.
41. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):676-86.
42. Tudor CS, Distel LV, Eckhardt J, Hartmann A, Niedobitek G, Buettner M. B cells in classical Hodgkin lymphoma are important actors rather than bystanders in the local immune reaction. *Hum Pathol*. 2013;44(11):2475-86.
43. Gajl-Peczalska KJ, Lim SD, Jacobson RR, Good RA. B lymphocytes in lepromatous leprosy. *N Engl J Med*. 1973;288(20):1033-5.
44. Mendes NF, Kopersztych S, Mota NG. T and B lymphocytes in patients with lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol*. 1974;16(1):23-9.
45. Chogle JB, Khanolkar SR, Antia NH. T & B lymphocytes in the spectrum of leprosy. *Lepr India*. 1977;49(1):36-43.

46. Moore JW, Moyo D, Beattie L, Andrews PS, Timmis J, Kaye PM. Functional complexity of the Leishmania granuloma and the potential of in silico modeling. *Front Immunol.* 2013;4:35.
47. Fabel A, Giovanna Brunasso AM, Schettini AP, Cota C, Puntoni M, Nunzi E, et al. Pathogenesis of Leprosy: An Insight Into B Lymphocytes and Plasma Cells. *Am J Dermatopathol.* 2019;41(6):422-7.
48. Iyer AM, Mohanty KK, van Egmond D, Katoch K, Faber WR, Das PK, et al. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. *Hum Pathol.* 2007;38(7):1065-73.
49. Ochoa MT, Teles R, Haas BE, Zaghi D, Li H, Sarno EN, et al. A role for interleukin-5 in promoting increased immunoglobulin M at the site of disease in leprosy. *Immunology.* 2010;131(3):405-14.
50. Biswas D, Sethy M, Behera B, Palit A, Mitra S. Image Morphometric Analysis of B Cells and Plasma Cells in Erythema Nodosum Leprosum With Clinicopathological Correlation. *Am J Dermatopathol.* 2021;43(10):700-6.
51. Fillatreau S. Regulatory functions of B cells and regulatory plasma cells. *Biomed J.* 2019;42(4):233-42.
52. Flynn NJ, Somasundaram R, Arnold KM, Sims-Mourtada J. The Multifaceted Roles of B Cells in Solid Tumors: Emerging Treatment Opportunities. *Target Oncol.* 2017;12(2):139-52.
53. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2017;127(3):772-9.
54. Quaresma MV, Azevedo LS, Pereira NV, Saldanha MG, David-Neto E, Sotto MN. Lymphocyte subsets and Langerhans cells in the skin of kidney transplant recipients under three different immunosuppressive regimens. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2022;36(12):2466-72.
55. Nihal M, Mikkola D, Wood GS. Detection of clonally restricted immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal and lesional skin: analysis of the B cell component of the skin-associated lymphoid tissue and implications for the molecular diagnosis of cutaneous B cell lymphomas. *J Mol Diagn.* 2000;2(1):5-10.
56. Johanson TM, Lun ATL, Coughlan HD, Tan T, Smyth GK, Nutt SL, et al. Transcription-factor-mediated supervision of global genome architecture maintains B cell identity. *Nat Immunol.* 2018;19(11):1257-64.
57. Miyagawa-Hayashino A, Yoshifuji H, Kitagori K, Ito S, Oku T, Hirayama Y, et al. Increase of MZB1 in B cells in systemic lupus erythematosus: proteomic analysis of biopsied lymph nodes. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):13.
58. Zouali M, Richard Y. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Front Immunol.* 2011;2:63.
59. Miyake K, Mori R, Homma Y, Matsuyama R, Okayama A, Murakami T, et al. MZB1 in borderline resectable pancreatic cancer resected after neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Surg Res.* 2017;220:391-401.
60. Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J Immunol.* 2005;175(11):7103-7.

61. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med*. 2012;209(5):1001-10.
62. Olalekan SA, Cao Y, Hamel KM, Finnegan A. B cells expressing IFN- γ suppress Treg-cell differentiation and promote autoimmune experimental arthritis. *Eur J Immunol*. 2015;45(4):988-98.
63. Ding Q, Mohib K, Kuchroo VK, Rothstein DM. TIM-4 Identifies IFN- γ -Expressing Proinflammatory B Effector 1 Cells That Promote Tumor and Allograft Rejection. *J Immunol*. 2017;199(7):2585-95.
64. Moudgil KD, Choubey D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(10):695-703.
65. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(8):721-8.
66. Gong Y, Zhao C, Zhao P, Wang M, Zhou G, Han F, et al. Role of IL-10-Producing Regulatory B Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Dig Dis Sci*. 2015;60(5):1308-14.

1 De acordo com Estilo Vancouver.

9. APÊNDICE A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SUBCONJUNTOS DE LINFÓCITOS B NAS LESÕES CUTÂNEAS DO ESPECTRO DA HANSENIASE E ESTADOS REACIONAIS

Pesquisador: Mirian Nacagami Sotto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 99663118.3.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.966.174

Apresentação do Projeto:

Avaliação de linfócitos B e sua participação em lesões de hansenise.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a participação de linfócitos B, quantificar e comparar sua população em lesões de hansenise de formas polares, dimorfa, indeterminada e em estados reacionais, através de imuno-histoquímica em material armazenado no laboratório

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos envolvidos para pacientes, uma vez que a pesquisa se debruçará sobre peças de biopsia já realizadas anteriormente para elucidação diagnóstica e armazenadas no laboratório.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não apresenta questionamentos éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Dispensado do TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br