



Anais Brasileiros de Dermatologia

www.anaisdedermatologia.org.br



ARTIGO ORIGINAL

Subpopulações de células B em lesões de hanseníase: desvendando a complexa interação^{☆,☆☆}

Luis Alberto Ribeiro Fróes Junior ^{a,*}, Carla Pagliari ^a,
Maria Angela Bianconcini Trindade ^b e Mirian Nacagami Sotto ^{a,c}

^a Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b LIM56, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^c Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 11 de dezembro de 2024; aceito em 18 de janeiro de 2025



PALAVRAS CHAVE

Hanseníase;
Imunidade humoral;
Imuno-histoquímica;
Subpopulações de
linfócitos B

Resumo

Fundamentos: A hanseníase é doença infecciosa crônica marcada por interações imunológicas complexas, mas os papéis de subconjuntos específicos de linfócitos B em sua patologia são pouco compreendidos.

Objetivos: Investigar a presença e distribuição de subconjuntos de células B, incluindo células B1, células B da Zona Marginal (ZM), células B reguladoras (Bregs) e células B efetoras-1 (Be1), em diferentes formas clínicas de hanseníase e estados reacionais.

Métodos: Análises imunohistoquímicas e morfométricas foram realizadas em lesões de pele de pacientes com diversas apresentações clínicas de hanseníase.

Resultados: Células B CD20+ foram abundantes em lesões tuberculoides, enquanto a expressão de BZM-1 variou significativamente entre os subtipos de hanseníase. Lesões com Reação Tipo 1 (T1R) exibiram contagens significativamente maiores de células B B1 e BZM em comparação com as lesões de Reação Tipo 2 (T2R), Hanseníase Virchowiana (HV) e Hanseníase Indeterminada (I). Os padrões de expressão de PAX5/BZM-1 e PAX5/CD5 sugeriram a presença dominante dessas células no polo Th1. Células Be1, fortemente associadas à resposta imune Th1, também foram mais abundantes em apresentações clínicas Th1 (hanseníase tuberculoides e T1R). Embora as células Bregs fossem geralmente escassas, elas foram mais frequentemente observadas em T1R.

Limitações do estudo: Este estudo foi limitado pelo número relativamente pequeno de casos analisados por subtipo clínico e estado reacional.

Conclusões: Este é o primeiro estudo a documentar a presença e a distribuição desses subconjuntos específicos de células B em lesões de hanseníase. Os achados sugerem papéis distintos para os subtipos de linfócitos B, particularmente no polo tuberculoides e durante reações do Tipo 1.

© 2025 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2025.501184>

[☆] Como citar este artigo: Froes LAR Jr, Pagliari C, Trindade MAB, Sotto MN. B-cell subsets in leprosy lesions: unraveling the complex interplay. An Bras Dermatol. 2025;100:501184.

^{☆☆} Trabalho realizado no Departamento de Patologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: lulafroes@usp.br (L.A. Fróes Junior).

2666-2752/© 2025 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

As manifestações espectrais da hanseníase refletem a resposta imune do hospedeiro contra *Mycobacterium leprae*.¹ Como bactéria intracelular obrigatória, a eficácia da resposta imune contra a hanseníase depende principalmente da imunidade celular, com o equilíbrio entre Th1 e Th2 desempenhando papel fundamental na determinação da apresentação clínica da doença. A progressão da hanseníase tuberculoide (localizada) para a virchowiana (disseminada) é marcada pela mudança da resposta Th1 (celular) para Th2 (humoral). Consequentemente, o perfil de citocinas varia entre as apresentações, com citocinas Th1 (como IFN- γ , IL-2 e IL-12) na hanseníase tuberculoide e citocinas Th2 (como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β) na hanseníase virchowiana.²

A hanseníase “indeterminada” apresenta-se com mácula hipocrômica com sensibilidade local diminuída, podendo evoluir com cura espontânea ou progredir para apresentação clássica. Esse tipo de hanseníase não apresenta predominância clara de resposta Th1 ou Th2.¹

As reações hansênicas são episódios de hipersensibilidade aguda caracterizados pela piora de lesões prévias ou pelo surgimento de novas. A reação tipo 1 (T1R) é uma reação de hipersensibilidade tipo IV caracterizada pela exacerbação da resposta imune celular contra *M. leprae*, com secreção significativa de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-1 β e IL-6.³ A reação tipo 2 (T2R) envolve um processo inflamatório sistêmico relacionado à deposição extravascular de imunocomplexos e exsudato neutrofílico, com altos níveis de TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.³

Em 1993, Modlin et al.⁴ publicaram estudos que relacionavam o espectro clínico da hanseníase às respostas Th1-Th2. Desde então, a maior parte da pesquisa em imunologia da hanseníase concentrou-se nas células T. Embora Ridley et al. tenham descrito pela primeira vez a presença de células B em 1974, o foco nas células T ao longo das décadas levou a uma investigação limitada sobre o papel das células B.⁵ Foi apenas recentemente, em 2017, que Fachin et al.⁶ revelaram presença aumentada de células B no polo Th1, desafiando a suposição anterior de que as células B estariam predominantemente associadas ao polo Th2, que normalmente está ligado a respostas humorais.

As células B de mamíferos abrangem subconjuntos distintos, incluindo células foliculares B2, células B1, células B da zona marginal (BZM), células B reguladoras e células B efectoras-1 (Be1).^{7,8} As células B1, originárias do desenvolvimento fetal, habitam a cavidade peritoneal, exibindo autorrenovação e secreção espontânea de IgM. Apesar das controvérsias na literatura a respeito da caracterização das células B1 em seres humanos,⁹⁻¹¹ relatos indicam que elas expressam constitutivamente CD5 (células B1a) e secretam espontaneamente IgM multirreativa, facilitando a eliminação bacteriana precoce.¹²

As células BZM, outra categoria de linfócitos B, habitam a zona marginal dos folículos linfóides no baço e em vários outros tecidos.¹³ Essas células orquestram respostas rápidas de anticorpos contra micróbios transmitidos pelo sangue, ricos em polissacarídeos. Juntamente com as células B1, um subconjunto de células BZM, especificamente as células B precursoras da zona marginal do tipo 2 de transição (T2-PZM), são denominadas linfócitos B semelhantes a inatos (ILBs) ou células B reguladoras inatas (Bregs) em virtude de

sua capacidade de secretar IL-10, uma citocina reguladora.¹⁴ As Bregs contribuem para as respostas imunes cutâneas e exibem ações pró-inflamatórias e regulatórias.¹⁵

Um subconjunto de células B recentemente reconhecido, a célula Be1, compartilha semelhanças com as células T-auxiliares-1 (Th1) e parece conectar as respostas imunes inata e adaptativa.^{16,17} As células Be1 liberam citocinas inflamatórias semelhantes a Th1, como IFN- γ , TNF- α e IL-12.^{18,19}

Ao dissecar a intrincada interação entre esses subconjuntos de células B e o ambiente micobacteriano nas lesões da hanseníase, essa investigação visa fornecer uma compreensão abrangente da resposta imune *in situ* na hanseníase. Esses achados têm o potencial de subsidiar estratégias terapêuticas e refinar as abordagens de manejo da doença, abrindo novos caminhos para uma intervenção eficaz.

Materiais e métodos

Este estudo envolve o exame de uma série de casos. Inicialmente coletadas para o diagnóstico e a classificação das formas clássicas de hanseníase e dos estados reativos, amostras de pele foram selecionadas dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Clínica Dermatológica do Departamento/Divisão da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Essas amostras foram processadas por técnicas histológicas e incluídas em parafina. Foram examinadas amostras de pele de 95 pacientes com diversas manifestações clinicopatológicas da hanseníase. Estas incluíram hanseníase virchowiana (18 amostras), hanseníase tuberculoide (23 amostras), hanseníase indeterminada (14 amostras), T1R (19 amostras) e T2R (21 amostras). Especificamente, para comparações dentro do grupo CD20, foi utilizado grupo controle composto por amostras de pele normal de 10 pacientes. Em contraste com as células dendríticas e T, sabe-se que as células B são muito escassas na pele normal em condições homeostáticas.²⁰ No entanto, foi estabelecido grupo controle dedicado para CD20 a fim de reafirmar essa observação e eliminar a necessidade de controles em subconjuntos de células B. Todas as amostras histológicas de lesões de hanseníase foram coradas com Hematoxilina & eosina e pela técnica de coloração de bacilos álcool-ácido resistentes (técnica de Faraco) para confirmação diagnóstica. Além disso, os prontuários dos pacientes foram consultados para auxiliar na classificação e composição dos grupos de estudo.

Técnicas de imuno-histoquímica

Seções de quatro micrômetros embebidas em parafina foram obtidas de todos os espécimes e submetidas a técnicas de marcação única usando anticorpos CD20 (células B) e BZM-1 (células B1, células BZM e plasmablastos/plasmócitos).²⁰ Para melhor discriminação entre a população de células BZM e plasmablastos/células plasmáticas nos locais da lesão, foi realizada a marcação dupla PAX5/BZM-1 para distinguir as células BZM/B1 no tecido dos plasmablastos e células plasmáticas, que silenciaram a expressão de PAX5.²¹ Também foi realizada a marcação dupla para PAX5/CD5 (células B1), CD20/T-bet (células Be1) e CD20/c-MAF (Bregs) com protocolo modificado por Tudor et al.²² Para Bregs, inicialmente tentou-se realizar a marcação dupla com PAX5/IL-10; no entanto, em virtude de resultados insatisfatórios, optou-

Tabela 1 Especificações de anticorpos, sistemas de detecção e cromógenos

Anticorpo primário	Código ID	Fabricante	Sistema de diluição/detecção
Anticorpo anti-CD5 de coelho	SP-19	Cell-marque	1:50 / Polink
Anticorpo anti-PAX5 de camundongo	312M-15	Cell-marque	1:200 / Envision flex
Anticorpo anti-CD20 de camundongo	AC-0012	Epitomics	1:100 / Envision flex
Anticorpo anti-BZM-1 de coelho	11454-1	Proteintech	1:200 / Polink
Anticorpo anti-Tbet de coelho	aB-150440	ABcam	1:200 / Polink
Anticorpo anti-c-MAF de coelho	SC7866	Vector	1:100 / Impress
Cromógenos usados na técnica de dupla marcação	Código ID	Fabricante	Sistema de diluição/detecção
Membrana/citoplasma			
PermaGreen / substrato HRP	K074-RUO	Diagnostic BioSystems	Não aplicável
Núcleo			
3.3'- Tetracloridrato de diaminobenzidina	D5637-50G	Sigma Life Science	Não aplicável

-se pela marcação do CD20 de superfície com o fator de transcrição nuclear da IL-10, c-MAF, também expresso por linfócitos B reguladores.²³⁻²⁵ A escolha por CD20/c-MAF produziu resultados mais facilmente discerníveis e confiáveis. A [tabela 1](#) apresenta as especificações dos anticorpos, os sistemas de detecção e os cromógenos utilizados nos procedimentos imuno-histoquímicos. Descrições detalhadas das técnicas são fornecidas como dados suplementares.

Microscopia confocal de fluorescência

O protocolo da técnica de imunofluorescência para microscopia confocal foi realizado da seguinte maneira: ambos os anticorpos primários, anti-IgM e anti-PAX5, foram diluídos e misturados em solução de albumina bovina a 1% e incubados por 48 horas a 4 °C. Em seguida, foram aplicados os anticorpos conjugados secundários isotipo-específicos Alexa Fluor® 488 (verde) Ig anti-coelho de cabra e AlexaFluor® 555 (vermelho) Ig anti-camundongo de burro, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, e a coloração nuclear com 6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato DAPI – Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha (azul) por 60 minutos. As lâminas foram montadas em meio de montagem (Hydromount, National Diagnostics, Atlanta, GA, EUA) e lâminas de vidro, e mantidas protegidas da luz a 4 °C até a análise. As imagens fluorescentes foram adquiridas por excitação UV/laser em microscopia confocal Olympus FluoView 1000 (FV1000). Dado o número limitado de casos analisados (cinco, no total), não foram realizadas análises morfométricas quantitativas.

Análises morfométricas e estatísticas

Todas as lâminas imunocoradas com anticorpos CD20 e BZM-1 foram escaneadas com o sistema 3DHISTECH “whole slide imaging” (imagem de lâmina inteira) (Budapeste, Hungria). Para a análise morfométrica, imagens com zoom digital de 10× foram obtidas de campos sucessivos e não sobreponíveis de toda a derme para cada amostra, utilizando o *software* Case Viewer (versão 2.3 de 64 bits, 3DHISTECH Ltd.).

As imagens foram processadas utilizando o *software* Fiji/ImageJ, disponível gratuitamente no National Institutes of Health (<http://imagej.nih.gov>). Seguindo a abordagem metodológica delineada por Biswas et al.,²⁵ foram analisadas

exaustivamente todas as imagens associadas a cada amostra. As médias aritméticas da fração da área imunocorada, especificamente para CD20 e BZM-1, foram então calculadas para cada amostra (caso). Em análises envolvendo colocalização de antígenos, as células duplamente positivas foram contadas manualmente em cada *hotspot* das imagens da lâmina inteira, divididas pelo número total de células B no mesmo campo e, em seguida, pela área dérmica do campo (estimada pelo *software* gratuito Fiji/ImageJ). Após a análise de todas as imagens de cada amostra foi calculada a média aritmética para a proporção de células duplamente imunomarcadas em relação ao total de células B (células CD20 ou PAX5 positivas) por unidade de área. Assim, o uso do termo “expressão” posteriormente no texto refere-se especificamente ao número de células positivas ou à fração de tecido imunomarcado, e não à intensidade da coloração.

ANOVA unidirecional não paramétrica seguida pelo teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis foi realizada utilizando o GraphPad Prism versão 10.1.0 para macOS, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA, www.graphpad.com. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Amostras de 95 casos e 10 controles foram analisadas. Entre os casos, a proporção homem-mulher foi de 11:9, indicando representação ligeiramente maior de homens. Esse grupo apresentou idade média de 44,64 anos, variando de 8 a 84 anos. No grupo controle, a idade média foi de 44,7 anos, com proporção homem-mulher correspondente de 5:5.

Presença e distribuição de células monomarcadas

A presença e a distribuição de linfócitos B diferiram na resposta tecidual entre os grupos de hanseníase estudados. Células B foram observadas na derme papilar e ao redor de granulomas epitelioides em amostras de hanseníase tuberculóide ([fig. 1A](#)). Na hanseníase indeterminada, as células B eram escassas e, quando presentes, localizavam-se próximas aos vasos sanguíneos e anexos cutâneos ([fig. 1B](#)). Linfócitos raros foram observados juntamente com macrófagos vacuolados na resposta tecidual de amostras de hanseníase

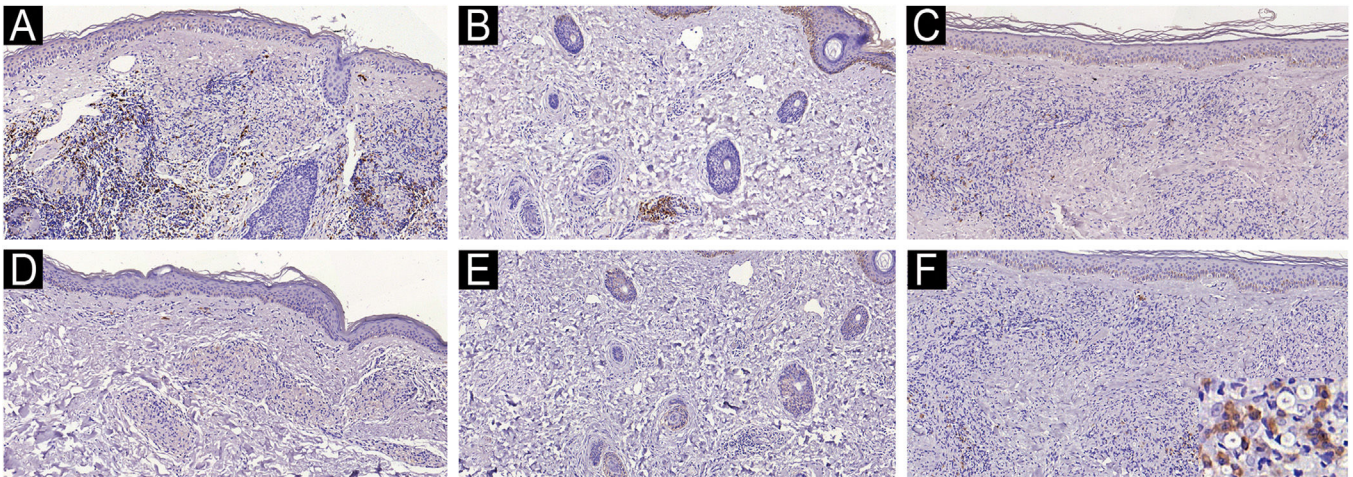


Figura 1 Células B (CD20+) na hanseníase tuberculoide dispostas ao redor de granulomas (A) e células imunomarcadas com o anticorpo BZM1 (D). Presença de raras células B perivascularares (B) e ausência de expressão de BZM1 (E) na hanseníase indeterminada. Na hanseníase virchowiana, observe raros aglomerados de células B dentro do infiltrado difuso de macrófagos (C) e raras células imunomarcadas com o anticorpo BZM1, algumas delas com morfologia de plasmócitos (inserção; F). Técnica imuno-histoquímica, cromógeno diaminobenzidina e contracoloração com hematoxilina. As barras de escala (superior esquerda) indicam a ampliação.

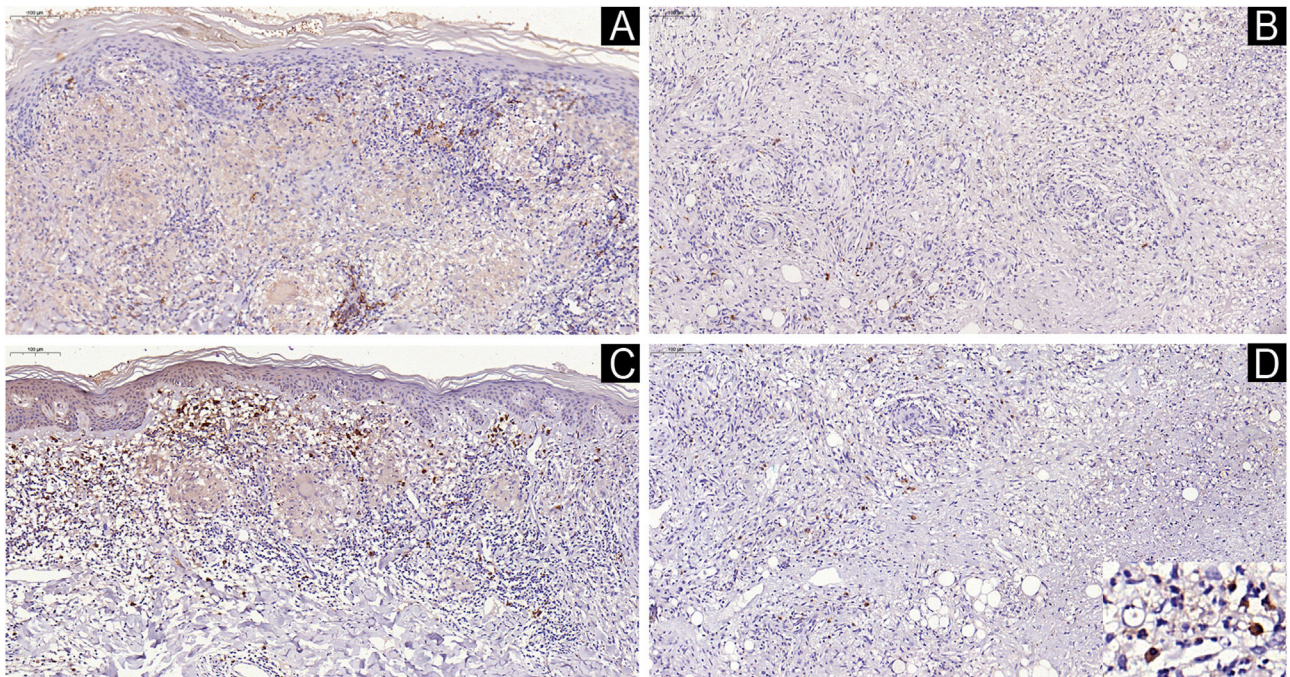


Figura 2 Na reação tipo 1, células B (CD20+) estão presentes na derme papilar e ao redor do granuloma epitelióide na derme reticular (A). Células imunomarcadas com o anticorpo BZM1 são observadas na derme papilar; no entanto, estão ausentes ao redor do granuloma (C). Na reação tipo 2, raras células B em meio ao infiltrado regressivo de macrófagos (B) e alguns aglomerados de células imunomarcadas com o anticorpo BZM1, algumas delas com morfologia de plasmócitos (inserção; D). Técnica imuno-histoquímica, cromógeno diaminobenzidina e contracoloração com hematoxilina. As barras de escala (superior esquerda) indicam a ampliação.

virchowiana (fig. 1C). Células B foram ligeiramente mais abundantes, dispostas ao redor de granulomas, na hanseníase reativa tipo 1 (fig. 2A) e escassas em amostras de pele com hanseníase reativa tipo 2 (fig. 2B).

As células imunomarcadas com o anticorpo BZM-1 exibiram morfologia às vezes semelhante a linfócitos, às vezes ligeiramente maior e semelhante a plasmócitos. Elas pareciam mais escassas do que CD20 em amostras de hanseníase

tuberculoide (fig. 1D) e extremamente escassas ou ausentes em amostras de hanseníase indeterminada (fig. 1E). Por outro lado, em amostras de hanseníase virchowiana, células positivas para BZM-1 foram observadas com mais frequência do que células B e exibiram morfologia de plasmócitos e plasmablastos (fig. 1F). Em amostras de T1R, células positivas para BZM-1 estavam distribuídas na derme papilar e, em alguns casos, eram escassas ou mesmo ausentes ao redor

de granulomas (fig. 2C), ao contrário do que foi observado em amostras de hanseníase tuberculóide. As amostras de T2R apresentaram células positivas para BZM-1 formando pequenos aglomerados e, assim como as amostras de hanseníase virchowiana, apresentaram aparência morfológica de plasmócitos (fig. 2D).

Considerando que o anticorpo BZM-1 revela a proteína BZM-1, associada ao processamento e secreção de imunoglobulinas e presente no retículo endoplasmático de células B na zona marginal de folículos linfóides, plasmablastos e plasmócitos,²⁰ decidiu-se comparar a fração média da área de expressão de CD20 (marcador de células B) com a fração média da área de expressão de BZM-1 em cada grupo de hanseníase. Essa foi uma tentativa de verificar se a expressão de BZM-1 era atribuível exclusivamente à presença de plasmablastos e plasmócitos na resposta tecidual das amostras estudadas. A [tabela 1S em Materiais Suplementares](#) demonstra os resultados da análise estatística dessas comparações.

Presença e distribuição de células duplamente marcadas

Observou-se a presença esparsa de células duplamente marcadas em todas as subpopulações de células B avaliadas. A [figura 3 \(A, B, C, e D\)](#) ilustra alguns desses casos, contrastando com os infiltrados mostrados anteriormente para CD20, principalmente em amostras de reação tuberculóide e hanseníase tipo 1. Além disso, a leitura de lâminas pela técnica de microscopia confocal de imunofluorescência revelou a presença de PAX5/IgM (células B1) em casos de T1R (fig. 3E).

Análises morfométricas e estatísticas

As diferenças de classificação média observadas no teste de comparações múltiplas de Dunn delineiam distinções na proporção de células duplamente marcadas positivas em comparação com células PAX5 ou CD20 simples positivas por unidade de área entre grupos distintos de hanseníase. As diferenças nas medianas entre os grupos com comparações estatisticamente significantes estão resumidas na [tabela 2](#), juntamente com seus respectivos valores de p. A [figura 4](#) apresenta as medianas de todos os grupos em forma gráfica, juntamente com suas medidas correspondentes de dispersão central.

Discussão

O presente estudo observou uma maior fração de área de células CD20+ (células B) no polo da hanseníase tuberculóide em comparação ao polo virchowiano, o que é consistente com achados recentes da literatura.^{25,26} O grupo com hanseníase virchowiana, no entanto, apresentou menor componente de células B em comparação aos grupos reacionais, tanto de T1R quanto de T2R.

O envolvimento de células B em infecções micobacterianas tem sido discutido na literatura, particularmente no contexto da formação de granulomas, produção de citocinas, respostas de células T e apresentação de antígenos.²⁷ Isso poderia explicar a maior expressão de CD20 e a presença de células B no grupo com resposta granulomatosa, em con-

sonância com dados da literatura. Curiosamente, o presente estudo demonstrou que os estados reacionais (T1R e T2R) apresentaram população maior de células B em comparação ao grupo virchowiano. Em T1R, isso pode estar relacionado à melhor organização da resposta granulomatosa. Em T2R, no entanto, os achados do presente estudo diferem daqueles relatados por Biswas et al.,²⁵ que encontraram menos linfócitos B em T2R em comparação à hanseníase multibacilar. Esses autores correlacionaram a presença de linfócitos B em T2R com granulomas malformados, o que pode não estar totalmente de acordo com as presentes observações.

As lesões da hanseníase indeterminada demonstraram menor expressão de células B em comparação ao grupo tuberculóide e aos grupos reacionais (T1R e T2R). Isso pode ser decorrente da resposta inflamatória menos intensa ou da polarização indefinida desse grupo.

A molécula BZM-1, codificada pelo gene *BZM-1*, está presente no retículo endoplasmático e funciona como acompanhante envolvido no enovelamento e secreção de imunoglobulina M (IgM). BZM-1 é um marcador para linfócitos B, particularmente células B1, células da zona marginal B (BZM), plasmablastos e plasmócitos.²⁸ As células B1 são conhecidas por secretarem IgM, caracterizando-as como parte da resposta imune humoral precoce. Esse marcador foi escolhido para demonstrar a presença ou ausência desse subtipo de linfócito B em lesões de hanseníase. No entanto, foi possível demonstrar a expressão de IgM em células PAX5-positivas (células B) apenas por meio de imunofluorescência e microscopia confocal, visto que os resultados obtidos por técnicas imunoenzimáticas foram insatisfatórios.

As células BZM, assim como as células B1, fazem parte da resposta imune inata e desempenham papéis essenciais nos estágios iniciais das respostas imunes humorais.²⁸ As células BZM residem em folículos linfóides, particularmente no baço, e transportam antígenos eficientemente do sangue para os folículos, onde ativam células T CD4+ e induzem a diferenciação de células B em plasmócitos.²⁹ Na presente amostra, a expressão de BZM-1 foi maior na hanseníase tuberculóide do que na forma indeterminada. Curiosamente, as células BZM que expressam BZM-1 correlacionam-se com maior número de linfócitos T CD8+ infiltrantes no ambiente tumoral do carcinoma pancreático e estão associadas a melhor prognóstico para essa neoplasia.²⁰

Analisando a expressão de CD20 e BZM-1 nos grupos estudados, constatamos que, no grupo com hanseníase tuberculóide, a expressão de CD20 foi maior do que a de BZM-1. Isso provavelmente se deve ao fato de o BZM-1 marcar células B1/BZM/plasmócitos, e os plasmócitos estão fortemente associados à resposta Th2 (humoral) na hanseníase, que é escassa no polo Th1.^{25,26} Além disso, observou-se que, nas técnicas de dupla marcação, as células BZM e B1 foram muito mais escassas do que as células CD20 positivas em todos os grupos de pacientes, incluindo a hanseníase tuberculóide.

Por outro lado, no grupo com hanseníase virchowiana, a expressão de CD20 foi menor do que a de BZM-1. Na hanseníase virchowiana, o componente de plasmócitos é significativo e, nesse contexto, o anticorpo contra BZM-1 revelaria plasmócitos. A escassez de células B1 e BZM duplamente coradas em amostras de hanseníase virchowiana e T2R corrobora a hipótese de que o anticorpo BZM-1 apresentou principalmente plasmócitos em vez de células B B-1/MZ.

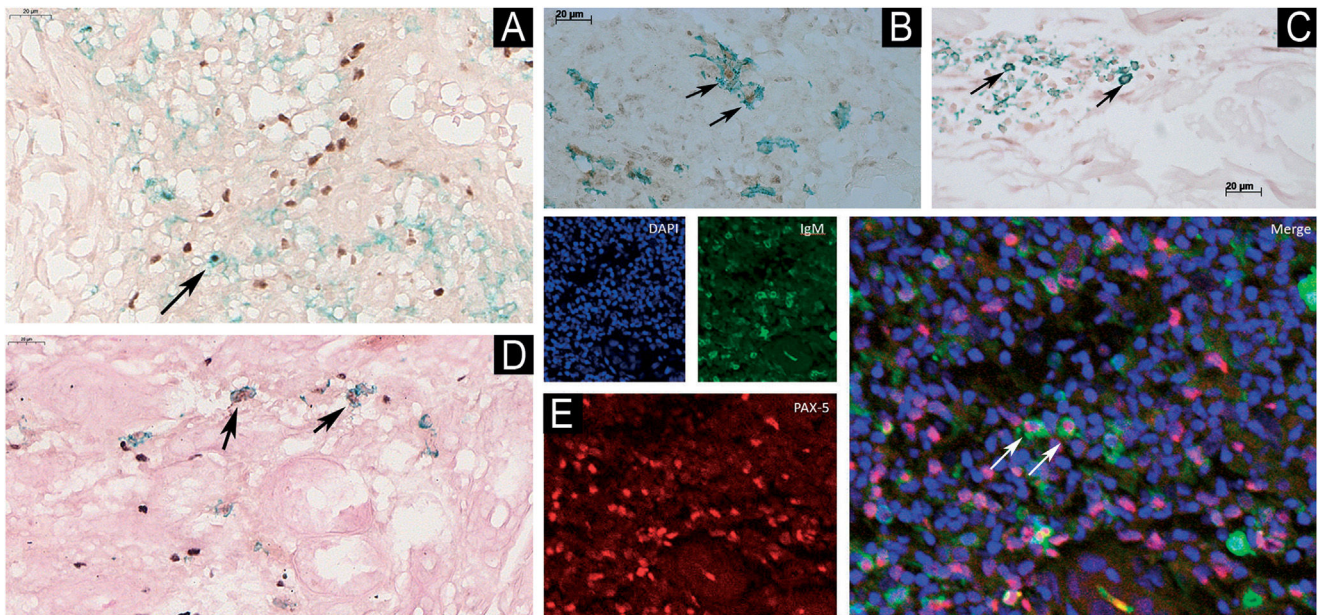


Figura 3 Células B1 (PAX5+/CD5+) na hanseníase tuberculóide (A); célula Be1 (CD20+/Tbet+) na reação tipo 1 (B); célula Breg (CD20+/c-MAF+) na reação tipo 1 (C); células B1 e BZM (PAX5+/BZM1+) na hanseníase tuberculóide (D), técnica de dupla imunomarcagem usando cromógeno diaminobenzidina (marrom) para PAX5 e T-bet e PermaGreen (verde) para anticorpo CD20; célula B1 (PAX5+/IgM+) em microscopia confocal a laser na reação tipo 1 (E). As setas indicam as respectivas células. Barras de escala – indicam a ampliação.

Na reação do tipo 2, observou-se maior expressão de CD20 em comparação à expressão de BZM-1. Diante desse achado, pode-se propor hipótese semelhante à do grupo hanseníase tuberculóide: células B1/BZM também foram limitadas em T2R, e a literatura existente não indica abundância de plasmócitos em T2R.^{25,26}

Não houve diferença significativa no grupo com hanseníase indeterminada em relação à expressão dos dois marcadores, possivelmente em virtude de escassez ou ausência de células inflamatórias.

Também não houve diferença na expressão de CD20 e BZM-1 em T1R. Considerando que plasmablastos e plasmócitos são reconhecidamente pouco frequentes em T1R,^{25,26} as poucas células que exibiram imunocoloração para BZM-1 são provavelmente células BZM ou células B1. A dupla marcação mais robusta para células B1 e BZM foi observada em lesões de T1R. Ao empregar a colocalização PAX5/MZB-1, foram excluídos plasmablastos e plasmócitos, restringindo assim a marcação a células B1/BZM.

Curiosamente, a disparidade entre os grupos T1R, T2R, hanseníase virchowiana, hanseníase indeterminada e hanseníase tuberculóide em PAX5/BZM-1 (células B1 e BZM) foi bastante semelhante à observada em PAX5/CD5 (marcando especificamente células B1), sugerindo que PAX5/BZM-1 não apresentou número substancial de células BZM. Para ambos os marcadores (PAX5/BZM-1 e PAX5/CD5), T1R exibiu significativamente mais células do que T2R, hanseníase virchowiana e hanseníase indeterminada. No entanto, exclusivamente em PAX5/BZM-1, foi observada contagem de células significativamente maior em T1R do que em hanseníase tuberculóide. Como essa discrepância não foi observada na marcação de PAX5/CD5 (células B1), isso foi atribuído a uma diferença no número de células BZM, que pode ser menor no grupo hanseníase tuberculóide.

Embora não tenha sido observado número significativo de células B1 no grupo virchowiano, Kotb et al.,³⁰ utilizando citometria de fluxo sanguíneo periférico, relataram porcentagem maior dessas células em pacientes com hanseníase virchowiana em comparação com controles saudáveis. Eles também associaram a presença de células B1 a fenômenos autoimunes no grupo de pacientes.

O número de células B efetoras-1 (Be1) foi maior nos grupos T1R e hanseníase tuberculóide do que nos grupos hanseníase indeterminada e T2R. A associação das células Be1 com resposta Th1 torna esse resultado esperado. Embora não tenha alcançado significância estatística, os pacientes do grupo hanseníase virchowiana apresentaram contagem menor de células Be1 em comparação com os grupos hanseníase tuberculóide e T1R, reforçando ainda mais a conexão das células Be1 com a resposta Th1 na hanseníase. Lund et al. demonstraram que células Th1, especificamente aquelas que produzem IFN- γ ou são estimuladas por IL-12, induzem a polarização de células B em Be1, levando à expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-12.¹⁵ Por outro lado, a interação com células Th2 ou a exposição a IL-4 direciona as células B, denominadas Be2, a produzir IL-2 e IL-4. As células Be1 e Be2, por sua vez, desempenham papéis na promoção da diferenciação *in vitro* de células Th1 e Th2, respectivamente.^{16,31} Posteriormente, foi revelado que o IFN- γ derivado de células B desempenha papel crucial nas respostas Th1, contribuindo para a rejeição de aloenxertos e tumores, artrite autoimune e resposta antibacteriana.³²⁻³⁴

Células B reguladoras (Bregs) foram notavelmente escassas em todos os grupos de hanseníase estudados, com diferenças significantes observadas apenas entre os grupos T1R e hanseníase indeterminada. É importante observar que, como mencionado anteriormente, as células BZM e B1

Tabela 2 Diferenças nas medianas entre os grupos com comparações estatisticamente significantes e seus respectivos valores de p

CD20		
Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença de classificação média	Valor de p ajustado
HT vs. HV	51,82	< 0,0001
HT vs. I	58,67	< 0,0001
HT vs. Controles	48,57	0,0002
HV vs. T1R	-41,31	0,0004
HV vs. T2R	-37,8	0,0016
I vs. T1R	-48,17	< 0,0001
I vs. T2R	-44,66	0,0002
T1R vs. Controles	38,07	0,0145
T2R vs. Controles	34,56	0,0374
BZM-1		
Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença de classificação média	Valor de p ajustado
HT vs. I	35,07	0,0006
HV vs. I	36,58	0,0007
I vs. T1R	-32,17	0,0066
PAX5/CD5		
Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença de classificação média	Valor de p ajustado
HV vs. T1R	-22,93	0,0245
I vs. T1R	-30,86	0,0024
T1R vs. T2R	30,17	0,0005
CD20/Tbet		
Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença de classificação média	Valor de p ajustado
HT vs. I	27,33	0,0055
HT vs. T2R	22,86	0,0123
I vs. T1R	-27,29	0,0096
T1R vs. T2R	22,82	0,0227
CD20/c-Maf		
Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença de classificação média	Valor de p ajustado
I vs. T1R	-15,74	0,0373
PAX5/BZM-1		
Teste de comparações múltiplas de Dunn	Diferença de classificação média	Valor de p ajustado
HT vs. T1R	-31,18	< 0,0001
HV vs. T1R	-37,5	< 0,0001
I vs. T1R	-37,5	< 0,0001
T1R vs. T2R	35,53	< 0,0001

HT, forma tuberculóide; I, forma indeterminada; HV, forma virchowiana; T2R, reação à hanseníase tipo 2; T1R, reação à hanseníase tipo 1.

são subtipos de células Bregs inatas. No entanto, o número de células BZM e B1 foi maior do que o de células Bregs. Esse aparente paradoxo pode ser atribuído ao fato de terem sido identificadas células Bregs com base apenas na expressão do fator de transcrição c-MAF da IL-10.

A predominância de células Bregs no polo Th1 está alinhada a estudos anteriores que destacaram o papel protetor

das células Bregs em diversas doenças autoimunes, como esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, diabetes *mellitus* tipo 1 e doença inflamatória intestinal, todas associadas a células Th1 ou Th17.³⁵ Além disso, as células Bregs têm sido implicadas na imunologia tumoral, exercendo suas propriedades imunossupressoras no microambiente tumoral.³⁶

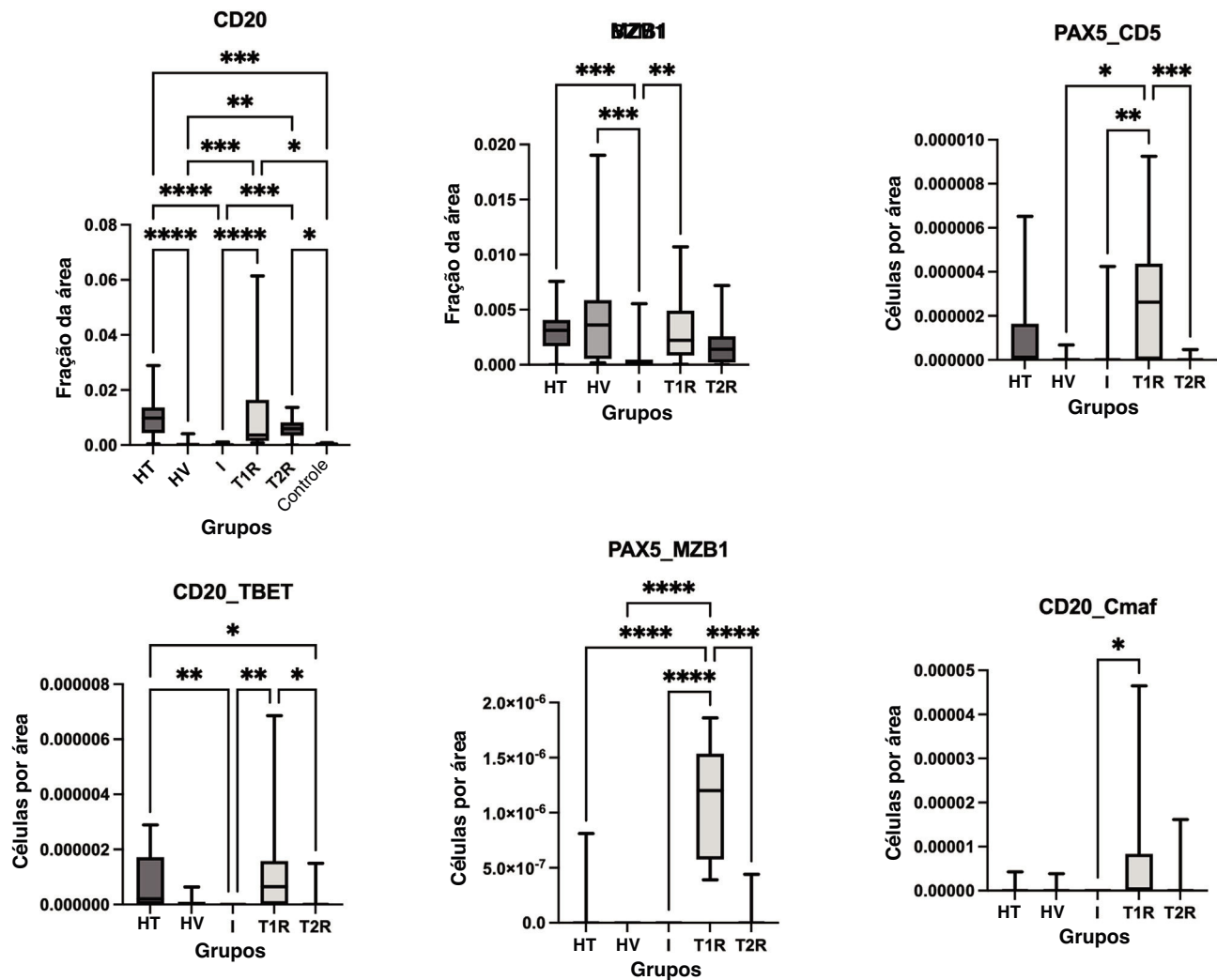


Figura 4 Medianas para todos os grupos em forma gráfica, juntamente com suas medidas correspondentes de dispersão central. Os asteriscos indicam comparações *post hoc* estatisticamente significantes. HT, hanseníase tuberculoide; I, hanseníase indeterminada; HV, hanseníase virchowiana; T1R, reação à hanseníase tipo 1; T2R, reação à hanseníase tipo 2.

Considerando que este estudo, embora tenha envolvido grande número de amostras, é retrospectivo e se baseia em técnicas imuno-histoquímicas para identificar subtipos de linfócitos B, foi possível demonstrar e comparar a presença desses subconjuntos de células B em vários locais de lesão de hanseníase e estados reacionais. Embora existam limitações nessa abordagem, as presentes descobertas sugerem papéis distintos para esses linfócitos B, particularmente dentro do polo tuberculoide e nas reações da hanseníase tipo 1.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Luis Alberto Ribeiro Fróes Jr: Conceitualização; curadoria de dados; análise formal; investigação; metodologia; visualização; redação - elaboração do rascunho original.

Carla Pagliari: Curadoria de dados; investigação.

Maria Angela Bianconcini Trindade: Curadoria de dados; investigação; metodologia; supervisão; redação - revisão e edição.

Mirian Nacagami Sotto: Conceitualização; curadoria de dados; investigação; captação de recursos; metodologia; administração do projeto; supervisão; validação; redação - revisão e edição.

Conflito de interesses

Nenhum.

Editor

Sílvio Alencar Marques

Disponibilidade de dados de pesquisa

Todo o conjunto de dados que dá suporte aos resultados deste estudo foi publicado no próprio artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do Fundo de Apoio à Dermatologia de São Paulo – Sebastião Sampaio (FUNADERSP) e do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), processo nº 306371/2018-9.

Apêndice. Material suplementar

Pode consultar o material suplementar para este artigo na sua versão eletrônica disponível em <https://10.1016/j.abdp.2025.501184>.

Referências

1. Froes LAR, Sotto MN, Trindade MAB. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. *An Bras Dermatol*. 2022;97:338–47.
2. Froes LAR, Trindade MAB, Sotto MN. Immunology of leprosy. *Int Rev Immunol*. 2022;41:72–83.
3. 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;42:2925–36.
4. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*. 1994;102:828–32.
5. Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ*. 1974;51:451–65.
6. Fachin LR, Soares CT, Belone AF, Trombone APF, Rosa PS, Guidella CC, et al. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histol Histopathol*. 2017;32:385–96.
7. Debes GF, McGettigan SE. Skin-associated B cells in health and inflammation. *J Immunol*. 2019;202:1659–66.
8. Prieto JMB, Felipe MJ. Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2017;54:38–44.
9. 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;201:461–9.
10. Baumgarth N. The double life of a B1-cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:34–46.
11. Kageyama Y, Katayama N. Ontogeny of human B1-cells. *Int J Hematol*. 2020;111:628–33.
12. Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol Today*. 1999;20:312–6.
13. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B-cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:118–32.
14. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B-cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol*. 2009;182:3492–502.
15. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B-cells: modulators of CD4+ T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:236–47.
16. 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;1:475–82.
17. 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;24:161–76.
18. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN- γ production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN- γ receptor. *J Immunol*. 2005;174:6781–90.
19. 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;102:4084–9.
20. 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.
21. 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;19:1257–64.
22. 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;44:2475–86.
23. Liu M, Zhao X, Ma Y, Zhou Y, Deng M, Ma Y. Transcription factor c-Maf is essential for IL-10 gene expression in B cells. *Scand J Immunol*. 2018;88:e12701.
24. Michée-Cospolite M, Boudigou M, Grasseau A, Simon Q, Mignen O, Pers JO, et al. Molecular mechanisms driving IL-10-producing B cells functions: STAT3 and c-MAF as underestimated central key regulators? *Front Immunol*. 2022;13:818814.
25. 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;43:700–6.
26. Fabel A, Brunasso AMG, 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;41:422–7.
27. Maglione PJ, Chan J, How B. cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Immunol*. 2009;39:676–86.
28. 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;20:13.
29. Zouali M, Richard Y. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. *Front Immunol*. 2011;2:63.
30. Kotb A, Ismail S, Kimito I, Mohamed W, Salman A, Mohammed AA. Increased CD5+ B-cells are associated with autoimmune phenomena in lepromatous leprosy patients. *J Infect Public Health*. 2019;12:656–9.
31. 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 α , and Th2 cells. *J Immunol*. 2005;175:7103–7.
32. 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;209:1001–10.
33. 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;45:988–98.
34. 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: 2585–95.
35. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguilón JC, et al. Immunosuppressive mechanisms of regulatory B cells. *Front Immunol*. 2021;12:611795.
36. Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasov S, et al. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:10662–7.