

## RESUMO

### ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS COM OS DIFERENTES ESTÁGIOS DA LEISHMANIOSE MUCOSA

**Introdução:** Leishmaniose mucosa (LM) devido à infecção por *Leishmania braziliensis* é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões principalmente na mucosa nasal. Essas lesões apresentam aspectos destrutivos e desfigurativos, com estágios evolutivos de gravidade que vão desde uma pequena nodulação até a completa destruição da arquitetura da pirâmide nasal. Como a leishmania é um parasita intracelular, a maioria dos estudos imunológicos em pacientes com leishmaniose tegumentar enfatiza a resposta mediada por células, com um número limitado de estudos sobre o papel dos linfócitos B e dos anticorpos na proteção ou na patogênese da LM. **Objetivo:** Correlacionar os títulos de anticorpos e a frequência das subpopulações de linfócitos B com a gravidade da doença mucosa e também como marcador da resposta terapêutica. **Métodos:** Pacientes com diagnóstico confirmado de LM foram classificados de acordo com o estadiamento clínico das lesões e realizado coleta de sangue para análise por citométrica de fluxo das subpopulações de linfócitos B e coleta de soro para detecção de anticorpos das classes: IgG total, IgG1 e IgG2 pela técnica de Elisa. **Resultados:** Quando se comparou a produção de anticorpos IgG total e subclasses IgG1 e IgG2 nos diferentes estágios da leishmaniose mucosa, foi observada uma maior produção de IgG total e IgG1 nos estágios IV e V quando comparado com os estágios I e II,  $p < 0,05$ . Houve uma redução significativa das absorbâncias nos pacientes que responderam ao tratamento, tanto com relação aos anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 ( $p < 0,05$ ). Houve uma maior frequência dos linfócitos regulatórios em relação aos linfócitos de memória,  $p < 0,05$ . **Conclusão:** Os nossos dados sugerem que existe uma associação dos títulos de anticorpos com a gravidade da doença mucosa. A redução da produção de anticorpos após o tratamento indica que este teste pode ser utilizado na avaliação da resposta terapêutica. A produção elevada de células B regulatórias não foi capaz de modular

adequadamente a resposta imune nestes pacientes. **Palavras-chave:** leishmaniose mucosa, IgG total, IgG1, IgG2, linfócitos B.

## **ABSTRACT**

### **ASSOCIATION BETWEEN THE FREQUENCY OF SUBPOPULATIONS OF B LYMPHOCYTES AND PRODUCTION OF ANTIBODIES WITH THE DIFFERENT STAGES OF MUCOSA LEISHMANIASIS**

**Introduction:** Mucosal leishmaniasis (ML) due to infection by *Leishmania braziliensis* is characterized by the development of lesions mainly in the nasal mucosa. These lesions present destructive and disfiguring aspects, with evolutionary stages of gravity ranging from a small nodulation to the complete destruction of the architecture of the nasal pyramid. As leishmania is an intracellular parasite, most immunological studies in patients with tegumentary leishmaniasis emphasize the cell-mediated response, with a limited number of studies on the role of B lymphocytes and antibodies in the protection or pathogenesis of ML. **Objective:** To correlate antibody titers and the frequency of B lymphocyte subpopulations with the severity of mucosal disease and also as a marker of the therapeutic response. **Methods:** Patients with a confirmed diagnosis of LM were classified according to the clinical staging of the lesions and blood collection was performed for flow cytometric analysis of the B lymphocyte subpopulations and serum collection for the detection of antibodies of the classes: total IgG, IgG1 and IgG2 by technique of Elisa. **Results:** When comparing the production of total IgG antibodies and IgG1 and IgG2 subclasses in the different stages of mucosal leishmaniasis, a higher production of total IgG and IgG1 in stage IV and V was observed when compared to stage I and II,  $p < 0.05$ . There was a significant reduction in the absorbances in patients who responded to treatment, both with respect to IgG class antibodies and IgG1 and IgG2 subclasses ( $p < 0.05$ ). There was a higher frequency of regulatory lymphocytes in relation to memory lymphocytes,  $p < 0.05$ . **Conclusion:** Our data suggest that there is an association of antibody titers with the severity of mucosal disease. Reduction of antibody production after treatment indicates that this test can be used to evaluate the therapeutic

response. High production of regulatory B cells was not able to adequately modulate the immune response in these patients. **Keywords:** mucosal leishmaniasis, total IgG, IgG1, IgG2, B lymphocytes.

## **RESULTADOS**

### Aspectos demográficos e clínicos dos pacientes com leishmaniose mucosa

Participaram do estudo 35 pacientes com LM, 55 pacientes com LC e 10 IS. A média de idade e desvio padrão dos pacientes com LM foi de 47,2 anos +- 16,6. Em relação ao gênero, houve maior frequência do gênero masculino, 21 (60%), comparado com o gênero feminino, 14 (40%). No grupo de LC, participaram do estudo 55 pacientes, sendo a média de idade e desvio padrão de 36,1 +- 9,5. A frequência do gênero masculino foi de 37 (67,3%) e do gênero feminino 18 (32,7%). E um total de 10 indivíduos sadios, sendo a média de idade e desvio padrão de 31,4 +- 5,8, com maior frequência do gênero feminino 07 (70%).

Quando se compara a distribuição das idades nos 03 grupos houve diferença estatística com valor de  $p=0,0002$ . Assim como a distribuição do gênero nos três grupos, com valor de  $p=0,0001$ .

Os pacientes com LM foram tratados com antimoniato de meglumina associado ou não à pentoxifilina por um período de 30 dias, sendo que 09 (25,7%) pacientes foram tratados com apenas Antimoniato de Meglumina e 26 (74,3%) foram tratados com antimoniato de meglumina associado à

pentoxifilina. Desses 35 pacientes apenas 04 (11,4%) houve falha no tratamento, sendo 03 (8,6%) dos que foram tratados apenas com Antimoniato de Meglumina e 01 (2,8%) tratado com a associação das duas drogas.

As características demográficas e clínicas dos três grupos de pacientes são demonstradas na tabela 1.

**Tabela 1.** Dados demográficos e clínicos dos pacientes com LM, LC e IS.

| <b>Variáveis</b>                         | <b>LM<br/>(n=35)</b> | <b>LC<br/>(n=55)</b> | <b>IS<br/>(n=10)</b> | <b>Valor de p</b> |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>Média de idade</b>                    | 47,2                 | 36,1                 | 31,4                 | 0,0002*           |
| Desvio Padrão                            | ± 16,6               | ± 9,5                | ± 5,8                |                   |
| <b>Gênero (%)</b>                        |                      |                      |                      |                   |
| Feminino                                 | 14 (40%)             | 18 (32,7%)           | 7 (70%)              | 0,0001**          |
| Masculino                                | 21 (60%)             | 37 (67,3%)           | 3 (30%)              |                   |
| <b>Tratamento</b>                        |                      |                      |                      |                   |
| Antimoniato de Meglumina                 | 09 (25,7%)           | 55                   | NA                   | -                 |
| Antimoniato de Meglumina + Pentoxifilina | 26 (74,3%)           | NA                   | NA                   | -                 |
| Falha terapêutica                        | 04 (11,4%)           | NA                   | NA                   | -                 |

LM leishmaniose mucosa IS: indivíduos sadios; LC: leishmaniose cutânea; NA: não se aplica. \* Teste Anova de uma via. \*\* Teste do Qui-quadrado.

Quanto ao estadiamento clínico das lesões mucosa, houve uma maior predominância dos estágios I - II 16 (45,7%) em relação aos outros estágios, III 09 (25,7%) e IV-V 10 (28,6%).

Quando se analisou a distribuição da idade e gênero em relação aos estágios da LM não houve diferença estatística com relação à idade nos três estágios

da doença. Houve predominância do gênero masculino nos pacientes dos 3 grupos, sem diferença estatística. (Tabela 2).

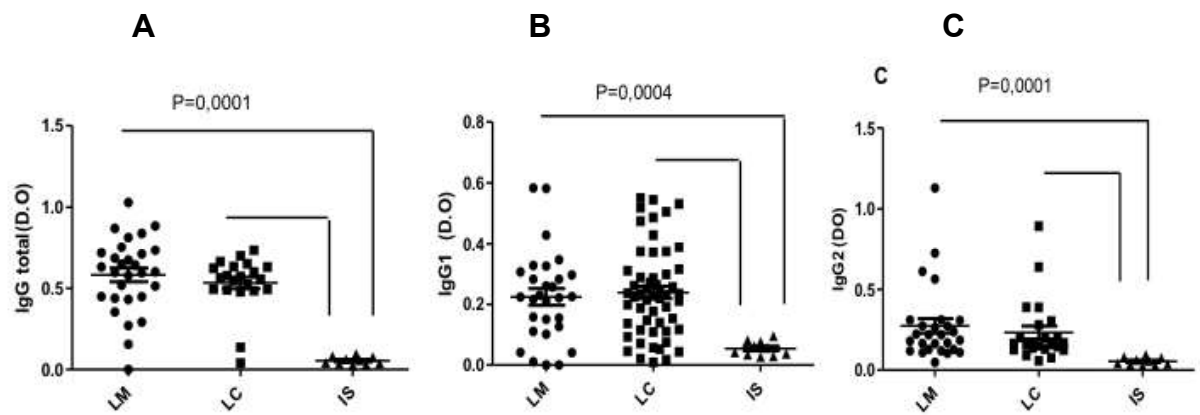
| Variáveis             | Estágio I-II | Estágio III | Estágio IV-V | valor de p* |
|-----------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| <b>Média de idade</b> |              |             |              |             |
|                       | 40           | 51          | 56           | 0,36        |
| Desvio Padrão         | ± 15,1343    | ± 13,4629   | ± 17,1710    |             |
| <b>Gênero (%)</b>     |              |             |              |             |
| Feminino              | 8 (50%)      | 3 (33,3%)   | 3 (30%)      | 0,54*       |
| Masculino             | 8 (50%)      | 6 (66,7%)   | 7 (70%)      |             |
| <b>Total</b>          | 16 (45,7%)   | 9 (25,7%)   | 10 (28,6%)   |             |

**Tabela 2.** Aspectos demográficos e clínicos dos pacientes com leishmaniose mucosa de acordo com a gravidade da doença.

\*Teste do Qui-quadrado

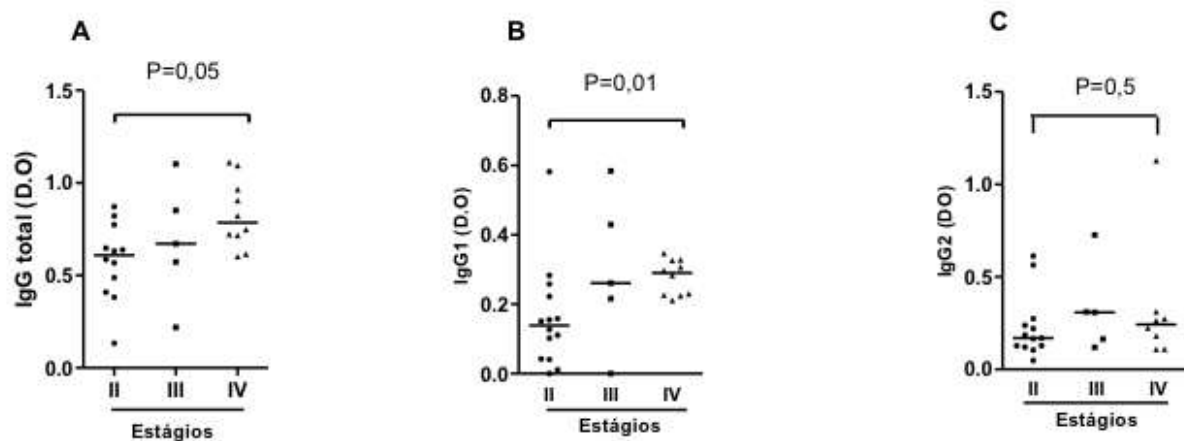
A produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2 contra antígenos de *Leishmania braziliensis* em pacientes com LM e pacientes com LC e a comparação com indivíduos sadios é mostrada na Figura 5 A, B e C.

A produção de anticorpos da classe IgG total (A), IgG1 (B) e IgG3 (C) foi maior em pacientes com LM e LC quando comparados com IS, ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Produção de anticorpos IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) contra antígenos de *Leishmania braziliensis* em pacientes com LM e pacientes com LC e indivíduos saudáveis.  $P < 0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis.

Com a finalidade de determinar a existência de relação entre a gravidade da doença mucosa e a produção de anticorpos contra antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis*, anticorpos da classe IgG das subclasses IgG1 e IgG2 foram determinados no soro de pacientes com diferentes estágios da doença. Devido ao número limitado de pacientes nos estágios I e estágio V, para análise da relação entre a produção de anticorpos e gravidade da doença os pacientes do estágio I foram agrupados com estágio II e os pacientes do estágio V com estágio IV.

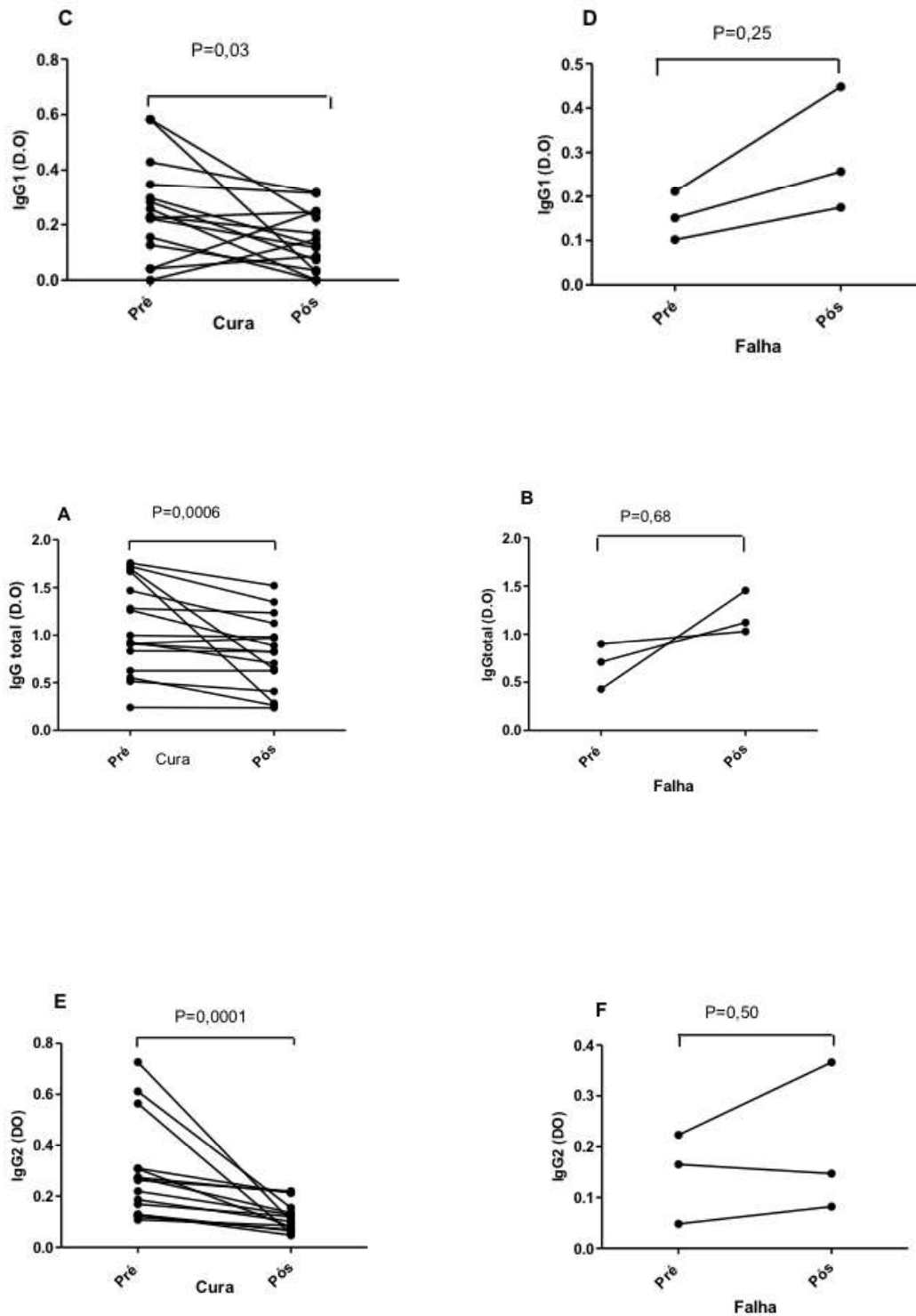


**Figura 6.** Produção de anticorpos IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) contra antígenos de *Leishmania braziliensis* em pacientes em diferentes estágios da LM. Pelo teste de Kruskal-Wallis.

Quando se comparou a produção de anticorpos dos isotipos IgG total e subclasses IgG1 e IgG2 nos diferentes estágios da LM, de acordo com a Tabela 1, foi observada uma maior produção de IgG total e IgG1 no estágio IV e V quando comparado com o estágio I e II,  $p < 0,05$ .

Todos os pacientes com LM (n=35) foram tratados com antimoniato de meglumina associado ou não à pentoxifilina por um período de 30 dias, sendo que 09 (25,7%) pacientes foram tratados com apenas Antimoniato de Meglumina e 26 (74,3%) foram tratados com antimoniato de meglumina associado à pentoxifilina. Desses 35 pacientes com LM 20 (57%) pacientes apresentavam produção de anticorpos após o tratamento.

Com a finalidade de determinar se uma redução na produção de anticorpos se relacionava com a resposta terapêutica, anticorpos da classe IgG e subclasses de IgG1 e IgG2 foram determinados antes e após o tratamento (Figura 6 A – B, C – D e E – F).

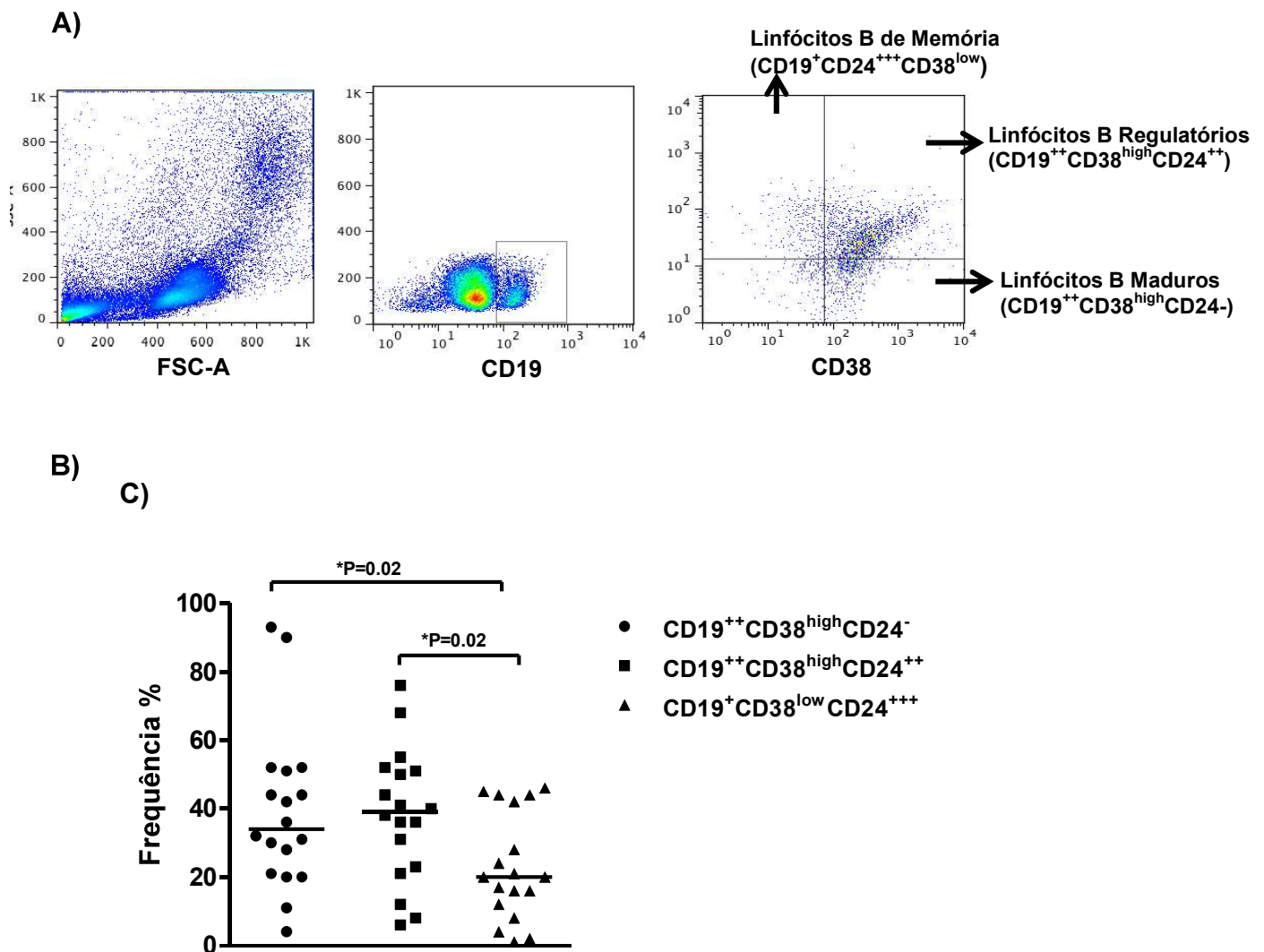


**Figura 7.** Anticorpos anti-leishmania da classe IgG (A-B) e das subclasses IgG1(C-D) e IgG2 (E-F) antes e após o tratamento em pacientes que apresentaram cura (n=17) (A, C e E) ( $P<0,05$ ) e em pacientes que apresentaram falha terapêutica (n=3) (B,D e F) ( $P>0,05$ ). A análise estatística foi realizada pelo teste de Wilcoxon.



Houve uma redução significativa das absorvâncias nos pacientes que responderam ao tratamento com antimonial, tanto com relação aos anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 ( $p < 0,05$ ). Tão relevante quanto esta observação foi a elevação na produção de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 nos três pacientes que apresentaram falha terapêutica, mas sem significância estatística.

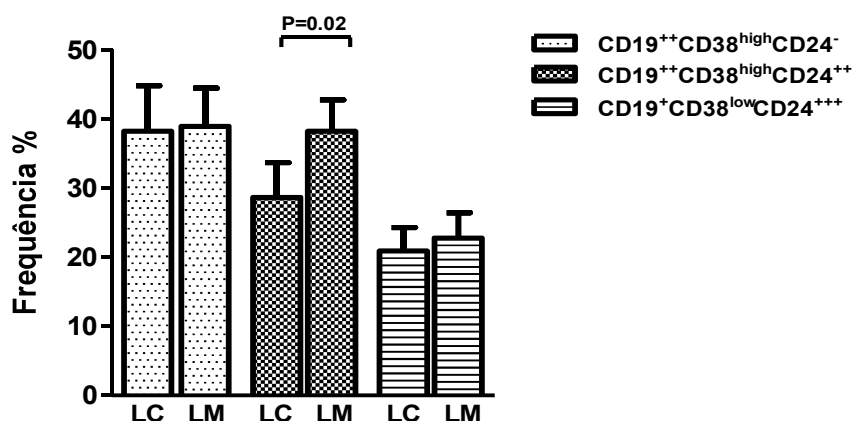
Com o objetivo de observar a frequência de linfócitos B maduros, regulatórios e de memória em pacientes com leishmaniose mucosa foram utilizados anticorpos marcadores de superfície anti-CD19+, anti-CD24+ e anti-CD38+. Houve uma maior frequência dos linfócitos maduros em relação aos linfócitos de memória e maior frequência dos linfócitos regulatórios em relação aos linfócitos de memória,  $p < 0,05$ .



**Figura 8.** Frequência ex vivo das subpopulações de linfócitos B em pacientes com LM. **(A)** A região dos linfócitos foi determinada de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) das células e as subpopulações dos linfócitos B foram definidas a partir da expressão de CD19, CD38 e CD24, caracterizando-as como: Linfócitos B maduros ( $CD19^{++}CD38^{high}CD24^{-}$ ), Linfócitos B regulatórios ( $CD19^{++}CD38^{high}CD24^{++}$ ) e linfócitos B de Memória ( $CD19^{+}CD38^{low}CD24^{+++}$ ). **(B)**

Frequência das subpopulações de linfócitos B de pacientes com LM (N=18). As subpopulações de linfócitos B foram caracterizados de acordo a expressão da molécula CD38<sup>+</sup> na superfície celular, analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em frequência. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar as comparações entre as subpopulações de linfócitos B. \*\* p<0.05.

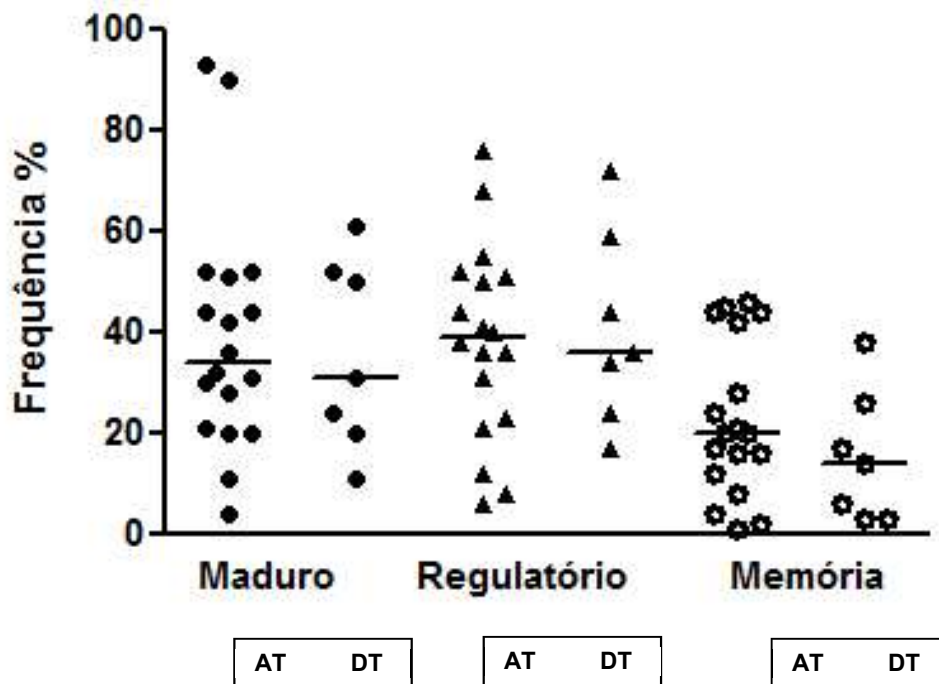
Quando se compara a frequência das subpopulações de linfócitos B em pacientes com LM e LC, os pacientes com LM apresentaram maior frequência de células B regulatórias que os pacientes com LC.



**Figura 9.** Comparação das subpopulações de linfócitos B. **(A)** Frequência das subpopulações dos linfócitos B em pacientes com LC (N=13) e pacientes com LM (N=18) foram definidas a partir da expressão de CD19, CD38 e CD24, caracterizando-as como: Linfócitos B maduros (CD19<sup>++</sup>CD38<sup>high</sup>CD24<sup>-</sup>), Linfócitos B regulatórios (CD19<sup>++</sup>CD38<sup>high</sup>CD24<sup>++</sup>) e linfócitos B de Memória (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>CD24<sup>+++</sup>). Para o cálculo de significância estatística foi utilizado o test U de Mann-whitney para as diferenças estatísticas entre as subpopulações de linfócitos B, p=0.02.

E ao se avaliar a frequência de subpopulações de linfócito B antes e após o tratamento, observa-se uma discreta queda das subpopulações de linfócitos

B maduros, regulatórios e memória, após o tratamento, porém sem significância estatística ( $p>0,05$ ).



**Figura 10. Avaliação das subpopulações de linfócitos B antes do tratamento (AT) e depois do tratamento (DT).** A frequência das subpopulações dos linfócitos B foi avaliada antes do tratamento e depois do tratamento em pacientes com LM (N=18), a partir da expressão de CD19, CD38 e CD24, caracterizando-as como: Linfócitos B maduros ( $CD19^{++}CD38^{high}CD24^{-}$ ), Linfócitos B regulatórios ( $CD19^{++}CD38^{high}CD24^{++}$ ) e linfócitos B de Memória ( $CD19^{+}CD38^{low}CD24^{+++}$ ). Para o cálculo de significância estatística foi utilizado o teste de Wilcoxon.  $P>0.05$ .