



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
ÁREAS DE CONCENTRAÇÃO: PARASITOLOGIA, IMUNOLOGIA E MICROBIOLOGIA

MÁRDEN ESTÊVÃO MATTOS JÚNIOR

**ANÁLISE FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T DO SANGUE PERIFÉRICO NA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

Uberaba
2024

MÁRDEN ESTÊVÃO MATTOS JÚNIOR

**ANÁLISE FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T DO SANGUE PERIFÉRICO NA
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (áreas de concentração: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia) como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas, pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob orientação do Prof^o Dr. Virmondes Rodrigues Júnior.

Uberaba
2024

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

M391a Mattos Júnior, Márden Estêvão
 Análise fenotípica de linfócitos T do sangue periférico na Leishmaniose
 Visceral humana / Márden Estêvão Mattos Júnior. -- 2024.
 73 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024
Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

1. Leishmaniose visceral. 2. Linfócitos T. 3. Imunidade. I. Rodrigues
Júnior, Virmondes. II. Universidade Fede-ral do Triângulo Mineiro. III.
Título.

CDU 616.993.161

ANÁLISE FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T DO SANGUE PERIFÉRICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (áreas de concentração: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia) como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas, pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob orientação do Prof^o Dr. Virmondes Rodrigues Júnior.

Aprovado em: 30 de outubro de 2024.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior – **Orientador**
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Dra. Thais Soares Farnesi Assunção
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Prof. Dr. Helioswilton Sales de Oliveira
Universidade Federal de Goiás – UFG

Prof. Dra. Daniela de Stefani Marquez
Universidade de Rio Verde - UniRv

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de vivenciar experiências tão engrandecedoras.

Aos pacientes e colaboradores do Hospital Municipal de Paracatu – HMP e Unidades Básicas de Saúde do Município de Paracatu que de forma prestativa se doaram para a realização deste projeto em prol da ciência e melhoria na qualidade de vida de moradores de área endêmica.

Aos meus pais que me ensinaram o valor da gratidão à vida e a resiliência diante dos desafios.

Ao meu orientador Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior pela paciência e parceria permanente ao longo desses anos, sempre disponível e prestativo.

Ao meu sogro José Geraldo e minha sogra Rosana pelo apoio incondicional, ajudando-nos a construir nossa família fundamentada na fé e nos bons costumes.

À minha esposa Ana Carolina pela dedicação total à nossa família me encorajando na busca pelos meus ideais.

Aos meus filhos Heitor, Arthur e Antônio, combustível extra para que eu possa seguir em frente.

À minha irmã Marianna e minha afilhada Maria, sempre presentes em momentos de aconchego familiar e apoio incondicional durante os desafios.

Aos meus familiares mais próximos que estão sempre presentes juntos nos desafios da vida.

Ao Centro Universitário Atenas - UniAtenas, na pessoa do Prof. Delander Neiva, por proporcionar um ambiente preparado para o exercício acadêmico e o desenvolvimento de projetos científicos em alto nível.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Ton Sales, Marcus Vinicius da Silva, Henrique Kappel, Thiago Alvares, Daniela de Stefani, Cristiane Molinero, Cristhyano Pimenta, Dra. Luciana Teixeira que me incentivaram e impulsionaram o desenvolvimento deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Painel referente às moléculas de superfície de células T e seus respectivos fluorocromos de acordo com as concentrações usadas e suas funções	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Citocinas e seus respectivos fatores transcricionais responsáveis pela expressão de diferentes perfis de linfócitos T efetores.....	18
Figura 2 - Área de estudo.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - Aloficocianina

APC - Células apresentadoras de antígenos

BB515 - Azul brilhante 515

CD - Células dendríticas

CD - Cluster of differentiation

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

Gal-9 - Galectina-9

gp63 - Glicoproteína 63

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFI - Imunofluorescência

IFN- γ - Interferon- γ

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

LAP - Peptídeo Associado à Latência

LPG - Lipofosfoglicano

LPS - Lipopolissacarídeo

LV - Leishmaniose visceral

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MHC - Molécula de histocompatibilidade

mRNA - RNA mensageiro

NET - Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

NK - Natural killers

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Panamericana de Saúde

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC - Células mononucleares de sangue periférico

PD-1 - Proteína de Morte Celular Programada - 1

PE - Ficoeritrina;

PE-Cy7 - Ficoeritrina cianina 7

PKC - Proteína quinase C

PRR - Receptores de reconhecimento de padrão

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SFB - Soro Fetal Bovino

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

T_{CM} - Células T de memória central

TCR - Receptor de Linfócito T

T_{EM} - Células T efectoras de memória

Tfh - Linfócitos T foliculares

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador - β

Th - Linfócito T auxiliar

TIM-3 - Domínios de Mucina e Imunoglobulina de célula T - 3

TLR - Receptor Toll like

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral - α

Treg - Linfócito T regulatório

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa sistêmica de caráter crônico que atinge órgãos do sistema mononuclear fagocitário, causada por um tripanossomatídeo do gênero *Leishmania*. Nos últimos anos vem se tornando um grave problema de saúde pública e quando não tratada, pode ser fatal. A doença é caracterizada por uma ampla variedade de manifestações clínicas que varia de quadro assintomático ou subclínico a leishmaniose visceral grave. Para conter a progressão da doença causada pelo parasito intracelular é necessária uma resposta imune com perfil predominantemente Th1. No entanto, outros perfis de resposta (Th2, Treg e Th17) podem estabelecer um ambiente regulatório interferindo no prognóstico. O trabalho avaliou o comportamento imunológico de pacientes tratados e indivíduos controles de área endêmica através de análise fenotípica e funcional do repertório de linfócitos T. Os resultados demonstraram forte correlação positiva entre populações de linfócitos T que expressavam moléculas (CD27 e CD28) nos dois grupos analisados, observada também em populações de células T que expressavam molécula PD-1. Entre populações de linfócitos TCD8⁺ de memória (CD8⁺ CD127^{high} CXCR-3⁺) e populações de linfócitos TCD8⁺ em exaustão (CD8⁺ CD127^{low} TIM-3⁺) também foi evidenciada forte correlação positiva nos dois grupos analisados. A correlação entre células T regulatórias (Treg) e populações de linfócitos TCD4⁺ (CD27⁺ e CD28⁺) e TCD8⁺ (CD27⁺ e CD28⁺) demonstrou correlação positiva apenas no grupo de pacientes tratados. Conclui-se que possivelmente exista um ambiente equilibrado, constituído por diferentes populações de células T, tanto pela expressão de moléculas co-estimulatórias em populações de memória, quanto pela expressão de moléculas de exaustão e presença de populações de linfócitos Treg, principalmente no grupo de pacientes tratados, capacitando o indivíduo a controlar a progressão da doença ou se curar clinicamente após o tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Linfócitos T; Imunidade.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a chronic systemic infectious disease affecting organs of the mononuclear phagocytic system, caused by a trypanosomatid of the genus *Leishmania*. In recent years, it has become a serious public health problem, and when left untreated, it can be fatal. The disease is characterized by a wide range of clinical manifestations ranging from asymptomatic or subclinical cases to severe visceral leishmaniasis. To contain the progression of the disease caused by the intracellular parasite, an immune response with a predominantly Th1 profile is necessary. However, other response profiles (Th2, Treg, and Th17) can establish a regulatory environment, interfering with the prognosis. The study evaluated the immunological behavior of treated patients and control individuals from endemic areas through phenotypic and functional analysis of the T lymphocyte repertoire. The results demonstrated a strong positive correlation between T lymphocyte populations expressing molecules (CD27 and CD28) in both analyzed groups, also observed in populations of T cells expressing the PD-1 molecule. Among memory TCD8⁺ lymphocyte populations (CD8⁺ CD127^{high} CXCR-3⁺) and exhausted TCD8⁺ lymphocyte populations (CD8⁺ CD127^{low} TIM-3⁺), a strong positive correlation was also evident in both analyzed groups. The correlation between regulatory T cells (Treg) and populations of TCD4⁺ (CD27⁺ and CD28⁺) and TCD8⁺ (CD27⁺ and CD28⁺) lymphocytes demonstrated a positive correlation only in the treated patient group. It is concluded that there may be a balanced environment, constituted by different populations of T cells, both by the expression of co-stimulatory molecules in memory populations and by the expression of exhaustion molecules and the presence of Treg lymphocyte populations, mainly in the treated patient group, enabling the individual to control the progression of the disease or clinically recover after treatment.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; T Lymphocytes; Immunity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	133
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	144
2.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.	166
2.2.1 RESPOSTA IMUNE INATA.....	166
2.2.2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA	188
2.3 MOLÉCULAS ANALISADAS RELACIONADAS À REPOSTA CELULAR	233
2.3.1 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 4 (CD4).....	233
2.3.2 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 8 (CD8).....	244
2.3.3 CD28.....	254
2.3.4 CD27.....	255
2.3.5 PD-1 (CD279)	265
2.3.6 TIM-3 (CD366)	266
2.3.7 LAP (Latency-Associated Peptide)	277
2.3.8 CD25 (IL-2RA)	287
2.3.9 CD127 (IL-7R α).....	288
2.3.10 CXCR-3 (CD183).....	299
3 JUSTIFICATIVA	31
4 HIPÓTESE	32
5 OBJETIVOS	343
5.1 OBJETIVO GERAL.....	33
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	343
6 PACIENTES E MÉTODOS	34
6.1 CASUÍSTICA.....	34
6.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO A PARTIR DE PROTOCOLO <i>EX VIVO</i>	355
6.3 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	366
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	388
REFERÊNCIAS	399
APÊNDICE A - Artigo Científico	47
APÊNDICE B - Comprovante de Submissão de Artigo Científico	75

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são antroponoses que representam um grupo de doenças tropicais negligenciadas com ampla diversidade clínica, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Possui transmissão vetorial por diversas espécies de flebotomíneos fêmeas através da picada e o contato com a saliva contaminada, tendo vários animais como reservatórios silvestres ou domésticos, sendo o cão, o de maior relevância no ambiente urbano (VAN GRIENSVEN e DIRO, 2019).

A leishmaniose visceral (LV) ou *Kalazar* é considerada a forma clínica mais grave sendo causada pelo protozoário das espécies *Leishmania L. infantum* e *Leishmania L. donovani*, sendo esta última, observada em países do velho mundo (leste da África, Bangladesh, Índia e Nepal). A LV costuma ser fatal se não for tratada em mais de 95% dos casos (RUIZ-POSTIGO et al, 2022).

Caracteriza-se clinicamente por períodos irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia com pancitopenia. A maioria dos casos ocorre no Brasil, na África e na Índia, sendo 50.000 a 90.000 novos casos de LV por ano em áreas endêmicas (RUIZ-POSTIGO et al, 2022).

Em 1984, no Brasil, havia notificação de casos autóctones em 520 municípios e no ano de 2000, esse número aumentou para 930 (SIMPLÍCIO et al, 2002). Em 1998, foi demonstrado que a maior incidência de LV encontrava-se no Nordeste, com 92% do total das notificações, seguida pelas regiões Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (VIEIRA e COELHO, 1998).

A LV está entre as principais doenças parasitárias com potencial para surtos e mortalidade, estando em segundo lugar, atrás apenas da malária (BI et al, 2018; RUIZ-POSTIGO et al, 2022). Apenas no ano de 2020, mais de 90% de novos casos notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram em 10 países, incluindo o Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen (OPAS, 2021).

Em 2020, do total de casos notificados em países latino americanos, 97% (1.933) ocorreram no Brasil, e os demais na Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Venezuela e Uruguai, apresentando uma incidência em áreas de transmissão ativa, de três casos por 100.000 habitantes. No entanto, em 2020, foi registrado o menor número de casos de LV do período, devido à redução de 25% (670) de casos no Brasil, bem como na Colômbia e Venezuela, não ficando claro se esta redução se deve às consequências da pandemia de COVID-19 pela redução

de medidas de vigilância e assistência ou à sazonalidade já conhecida no contexto epidemiológico da doença (OPAS, 2021).

Nas Américas, cerca de 90% dos casos humanos têm sido registrados no Brasil, onde houve um aumento progressivo do número de notificações de LV. Esse aumento se deve a vários fatores, entre eles o crescimento populacional com migração para a periferia das grandes cidades e a ausência de estrutura sanitária e de habitação que impacta diretamente a qualidade de vida associado ao aumento do número de animais domésticos nessas áreas, principalmente, de cães (WHO, 2010).

De acordo com BI et al. (2018), algumas estratégias no controle das leishmanioses no ambiente endêmico, se faz necessário e pode ser realizado pelo diagnóstico e tratamento precoce de indivíduos infectados sintomáticos, vigilância sorológica canina associado ao uso de coleiras repelentes e o controle sistemático do vetor.

Nos últimos 20 anos, a incidência das leishmanioses no Brasil tem aumentado em praticamente todos os estados, sendo considerada uma das infecções emergentes mais importantes. Ela vem ocorrendo de forma endêmico-epidêmica, apresentando diferentes padrões de transmissão, constituindo um importante problema de saúde pública pela sua magnitude epidemiológica e complexidade às medidas de controle (BRASIL, 2014).

Para tanto, estudos voltados ao comportamento imunológico de indivíduos que vivem em áreas endêmicas, devem ser desenvolvidos com o intuito de compreender as possíveis vulnerabilidades que possam facilitar o aumento progressivo de casos sintomáticos da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) humana tem período de incubação variável, em média de dois a oito meses, existindo casos com até quatro anos de evolução (DEANE e DEANE, 1955; AMATO NETO, 1978; ZIJLSTRA et al, 1991). Acomete indivíduos em qualquer faixa etária com predominância no sexo masculino (DEANE e DEANE, 1955; BADARÓ et al, 1986; EVANS ET AL, 1992; ZIJLSTRA e EL-HASSAN, 2001). De acordo com CAVALCANTE et al. (2022), indivíduos em idade avançada possuem alto risco de doença grave e óbito por LV.

A doença é caracterizada por uma variedade de manifestações clínicas que varia de forma assintomática, subclínica a LV clássica. Formas assintomáticas são caracterizadas pela

infecção com ausência de sintomas aparentes. A OMS estima que "Infecções causadas por *Leishmania* são muitas vezes assintomáticas. A maioria dos indivíduos que apresentam evidência de exposição através do teste positivo de Montenegro ou da sorologia, relata não se lembrar de ter uma doença clínica". A soroprevalência varia de 7% a 63% para *L. donovani* na Índia, e de 29% a 34% para *L. infantum* em crianças brasileiras (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2019). Na verdade, a maioria das pessoas infectadas não progride para LV clássica e acredita-se que os doentes graves representam 10-20% entre os infectados (BADARÓ et al, 1986;. WHO, 2010; PEARSON e SOUSA, 1996). O surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida pelo vírus HIV, veio confirmar a presença do parasito em indivíduos assintomáticos para a LV, que, na vigência de imunossupressão (contagem de células TCD4⁺ < 200 células/mm³) acabaram desenvolvendo o quadro clínico da parasitose (ALVAR et al, 1997).

Formas subclínicas são caracterizadas por pelo menos uma manifestação clínica como linfadenopatia ou sintomas leves (febre, tosse, diarreia, mal-estar, leve hepatomegalia e, eventualmente, esplenomegalia) associados à evidenciação do parasito a partir de técnicas diagnósticas (BADARÓ et al, 1986). A LV clássica é caracterizada principalmente pela tríade: febre irregular persistente, palidez e esplenomegalia. Outros achados como pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e perda de peso são comuns, particularmente em pacientes com apresentação tardia (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2019). Neste caso, os pacientes estão com o sistema monofagocitário maciçamente infectado e risco de morte após um período de incubação de semanas a meses.

Depois de instalada, a doença clássica geralmente se manifesta em três períodos, um inicial, outro de estado e um estágio final. O período inicial pode ser insidioso, marcado por febre baixa (até 38,5°C), sem padrão estabelecido, hiporexia, astenia e palidez progressiva, podendo apresentar esplenomegalia discreta. Outros casos têm início abrupto, com febre alta contínua e aumento considerável do baço (PRATA, 1957). O período de estado da doença apresenta amplo quadro clínico. Tem como sinal mais comum a febre, que tende a continuar baixa e sem periodicidade ou horários regulares. Em geral, o paciente mantém seu ânimo preservado, sem toxemia, e astenia progressiva com a evolução do quadro. Pode ocorrer o desenvolvimento de edemas, especialmente de membros inferiores associados à hipoalbuminemia. Alguns indivíduos apresentam sinais de hemorragia, sendo a epistaxe o mais comum, seguido de gengivorragia e petéquias (PRATA, 1957; PEARSON & SOUSA, 1996; HERWALDT, 1999).

A hepatoesplenomegalia, associada à anemia com pancitopenia e febre, constitui alguns dos principais elementos clínicos para o diagnóstico da LV. O baço apresenta crescimento lento, acompanhando a evolução da doença. A maioria dos pacientes apresenta distensão abdominal, com tensão da parede, decorrente principalmente da visceromegalia, mas podendo ser causada por distúrbios gastrointestinais. A diarreia é o sintoma mais frequente do aparelho digestivo, havendo relatos de dor abdominal, náuseas, vômitos ou mesmo obstipação. Também pode ser observada nesse período a tosse, seca ou produtiva, decorrente de uma pneumonite intersticial sendo, por vezes, o motivo que leva o paciente a procurar o serviço de saúde (PRATA, 1957; ZIJLSTRA et al., 1991; ZIJLSTRA & EL-HASSAN, 2001).

Sem intervenção, a doença evolui para o período final quando o paciente apresenta caquexia, edema e agravamento dos sinais e sintomas descritos. É frequente o surgimento de complicações bacterianas graves como pneumonia e sepse, podendo levar o paciente ao óbito (PRATA, 1957).

2.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.

2.2.1 RESPOSTA IMUNE INATA

A fim de desenvolver uma ótima relação de parasitismo com o hospedeiro, a *Leishmania* apresenta mecanismos de escape às respostas inata e adaptativa. Relatos recentes indicam que a resposta imune contra a LV se comporta de maneira diferente em vários organismos (SAMANT et al, 2021).

Vários estudos têm demonstrado que a inoculação simultânea de um inóculo contendo a *Leishmania* e conteúdo extraído de glândula salivar de vetores (*Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*) em camundongos, leva a uma maior carga parasitária. As proteínas presentes nas glândulas salivares e que compõe a saliva de vetores, podem estar relacionadas à exacerbação do quadro clínico devido à sua capacidade de modular a morte dos macrófagos, inibindo a produção de citocinas por células Th1 e aumentando a produção de citocinas por Th2 (KUPANI; PANDEY; MEHROTRA, 2021). A saliva dos flebotomíneos também influencia diretamente o recrutamento de leucócitos, incluindo neutrófilos, como apresentando em um estudo de PETERS et al. (2008) que comparou o recrutamento de neutrófilos em resposta à picada natural do flebotomíneo com inoculação por agulha.

Logo após a picada do vetor, se inicia a resposta imune com processo inflamatório inespecífico. Os neutrófilos facilitam a resposta imune através da modulação de vários mecanismos, incluindo o envolvimento de promastigotas pela produção de vários arranjos de fatores antimicrobianos, como armadilhas extracelulares de neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps - NETs), enzimas líticas, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de citocinas. No entanto, além do papel protetor dos neutrófilos contra a infecção por *Leishmanias*, os neutrófilos podem servir como um “cavalo de Tróia” que espalha transitoriamente promastigotas ou amastigotas (BAMIGBOLA e ALI, 2022).

Após a infiltração bem-sucedida de neutrófilos pelo parasito os macrófagos fornecem a próxima linha de defesa para o hospedeiro, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α) e óxido nítrico (NO). No entanto, os macrófagos tornam-se células hospedeiras decisivas para a persistência parasitária e estabelecimento da infecção, pois, a maioria dos parasitas se diferencia na forma intracelular (amastigotas) no interior de macrófagos (BAMIGBOLA e ALI, 2022).

Um dos principais antígenos de *Leishmania* é o glicolípido lipofosfoglicano (LPG), que constitui grande parte do glicocálice do parasito em estágio promastigota. Esta molécula é importante durante as fases iniciais de modulação da resposta imune, uma vez que demonstrou inibir a proteína quinase C (PKC) e a proteína ativada por mitógeno quinase (MAPK), ambas as quais estão envolvidas no desencadeamento da atividade oxidativa por macrófagos. (ZAMORA-CHIMAL, HERNÁNDEZ-RUIZ, BECKER, 2016).

As células NKT representam 0,1-0,5% dos leucócitos do sangue periférico e são ótimas produtoras de citocinas IFN- γ e TNF- α . Além disso, elas têm atividade citotóxica após a ligação em TCR ou produção de IL-2 e participam de mecanismos imunológicos diante de várias doenças infecciosas, autoimunidade, desenvolvimento neoplásico e mais especificamente, contra a leishmaniose (ZAMORA-CHIMAL, HERNÁNDEZ-RUIZ, BECKER, 2016), onde o potencial oxidativo induzido por estas células, ao produzirem IFN- γ e ativarem macrófagos produtores de ROS, facilita o controle do parasitismo intracelular.

A imunidade inata a partir da ativação e maturação de células dendríticas (CD), possibilita o início da resposta imune adaptativa após o reconhecimento de sinais de perigo chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrão (PRR), como receptor *toll-like* em DC (TLRs) e lectina tipo C, simultaneamente conduzindo a secreção aumentada de citocinas e a ativação de células TCD4⁺ *naive* para linhagens de células Th1, principalmente pela produção de IL-12. O início da resposta imune protetora contra a *Leishmania* depende da transição de fenótipos de células

dendríticas imaturas para fenótipos maduros. Esta transição é caracterizada pela expressão de CD40, CD80 e CD86 e produção da citocina pró-inflamatória IL-12 (BAMIGBOLA e ALI, 2022; COSTA-MADEIRA et al, 2022).

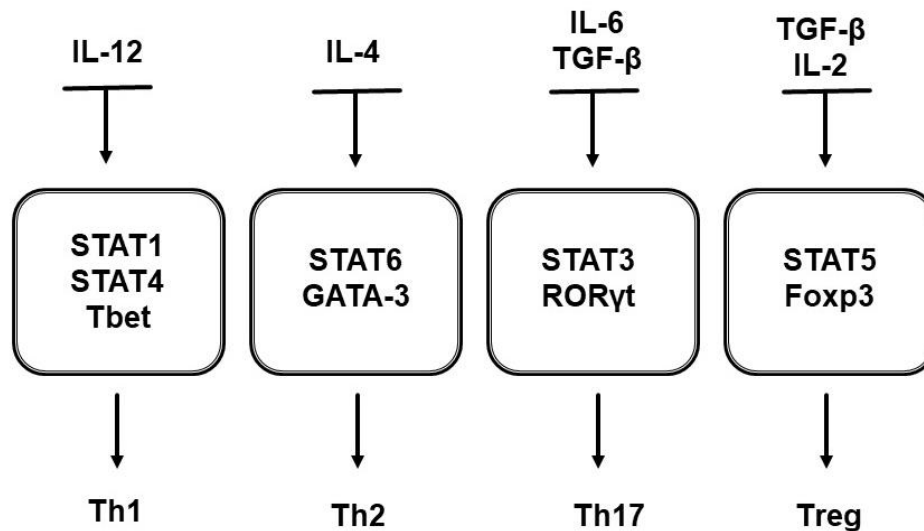
A partir da interação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa e a produção de citocinas que possibilitem a construção de um perfil de resposta imune celular, macrófagos ativados, células NK e linfócitos TCD8⁺ se tornam células primordiais no controle do parasitismo intracelular.

2.2.2 RESPOSTA IMUNE CELULAR

A imunidade celular é a principal responsável pelo controle da infecção, entretanto, o perfil de resposta imunológica direcionada pela produção de citocinas deve ser equilibrado. As células T são protagonistas do sistema imunológico quando se trata de infecções causadas por microrganismos intracelulares, e são capazes de se diferenciarem em várias formas (Th1, Th2, Th17, Treg, Tfh, etc) de acordo com o perfil de citocinas produzidas. Os diferentes perfis de resposta são gerados assim que o sinal inicial é transmitido dos diferentes antígenos apresentados por células dendríticas (CD) e macrófagos (JAWED, DUTTA, MAJUMDAR, 2019).

Os componentes do sistema imunológico desempenham um papel vital no controle desses parasitos, que incluem a ação de células apresentadoras de antígenos e mediadores solúveis como citocinas e quimiocinas. As células T são caracterizadas pela presença de marcadores específicos em sua superfície como CD3, CD4 e CD8, expressão de fatores de transcrição como GATA-3, Tbet, ROR γ t, Foxp3 (Figura 1) e a interação com classe específica de molécula de histocompatibilidade (MHCI e MHCII), para reconhecimento de antígenos de natureza endógena e exógena (JAWED, DUTTA, MAJUMDAR, 2019).

Figura 1: Citocinas produzidas por células do sistema imune e seus respectivos fatores transcripcionais responsáveis por induzir a expressão de diferentes perfis de resposta em linfócitos T efetores.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A importância de uma resposta imune celular equilibrada evidenciada pela intensificação na produção de citocinas por células do tipo Th1, na proteção contra a *Leishmania*, é bem conhecida em humanos e há fortes evidências sugerindo que o IFN- γ estaria envolvido na regulação durante a infecção por *Leishmania*. A estabilidade do quadro clínico após a infecção e possível controle da LV, depende inteiramente da imunidade celular, principalmente de células com perfil Th1 (SAMANT et al, 2021).

Estudos de infecção com espécies visceralizantes de *Leishmania* (*L. L. donovani* e *L. L. infantum*) têm ressaltado que a resposta celular do hospedeiro frente a estes parasitos difere significativamente da infecção com *L. L. major*. Em modelos murinos, o paradigma Th1/Th2 é importante na determinação da gravidade da infecção por *L. L. major* (MIRALLES et al, 1994). Por outro lado, este quadro não é tão determinante na doença durante a infecção com *L. L. donovani* e *L. L. infantum*, onde a resposta protetora referente ao Th1 é suprimida por IL-10 e TGF- β .

Na LV humana ativa, células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) exibem uma fraca resposta proliferativa a antígenos do parasito e falham na produção de IFN- γ *in vitro* (SACKS et al, 1987; WHITE et al, 1992). Esta deficiência na produção de IFN- γ parece promover a progressão da infecção para a doença fulminante (CARVALHO et al, 1989).

Embora pacientes não apresentem resposta cutânea durante esta fase pelo teste de Montenegro, uma forte resposta é observada de 6 a 12 meses após o tratamento (COSTA et al, 1999). Entretanto, linfócitos de pacientes curados por terapia ou casos subclínicos, determinados pelo mesmo teste cutâneo, demonstraram uma forte resposta proliferativa e alta produção de IFN- γ , IL-2 e IL-12 na estimulação com antígenos do parasito *in vitro* (CARVALHO et al, 1994).

Sabe-se que a imunidade protetora contra *L. L. donovani*, é dependente de uma resposta Th1 direcionada por IL-12 e consequente produção de IFN- γ e TNF- α , os quais resultam na indução da morte de parasitos por macrófagos via produção de reativos de oxigênio (revisto por BOGDAN et al, 1993). Foi demonstrado que IL-12 induz a produção de IFN- γ em camundongos infectados por *Leishmania* e em PBMCs de pacientes. Em indivíduos infectados, a IL-12 aumenta a resposta Th1, restaura a resposta linfoproliferativa, produção de IFN- γ e resposta citotóxica (GHALIB et al, 1995; BACELLAR et al, 1996). A IL-12 também diminui a apoptose espontânea ou induzida em PBMCs de pacientes. A IL-12 em combinação com antígeno de *Leishmania* restaura a proliferação de PBMC de indivíduos com LV com maior eficiência quando comparado ao uso de anticorpos monoclonais anti-IL-4 ou anti-IL-10, ou mesmo a combinação de ambos (revisto por BARRAL-NETTO et al, 1998).

Uma forte evidência de que IFN- γ está envolvida no controle da infecção por *Leishmania* veio de um estudo longitudinal que avaliou a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ por PBMCs de crianças vivendo em área endêmica para a doença. Foi observado que crianças infectadas por *L. L. infantum*, que apresentavam produção de IFN- γ por PBMCs estimuladas com *Leishmania*, podiam controlar a infecção e crianças cuja produção de IFN- γ era fraca progrediram para a doença (CARVALHO et al, 1992).

O papel da IL-4 e da resposta Th2 na LV, entretanto, é mais complexo, não havendo evidências de uma regulação negativa da resposta Th1 na LV, no entanto, os linfócitos de pacientes com LV ativa demonstram maior expressão de mRNA para IL-4 e, da mesma forma, o soro de pacientes com LV tem níveis elevados de IL-4 (BOGDAN et al, 1993; WILSON et al, 2005; SAMANT et al, 2021). Foi observado que adição de mAb contra IL-4 não restaura a resposta linfoproliferativa ou a produção de IFN- γ em PBMCs estimuladas por *L. L. infantum* em pacientes com LV. A IL-4 também não suprime a resposta linfoproliferativa ou produção de IFN- γ em indivíduos curados (RIBEIRO DE JESUS et al, 1998). Desta forma, o proeminente papel da IL-4 observado em modelos murinos não é consistente com o que é observado na LV humana.

A IL-10 parece ser a principal citocina com ação inibitória de macrófagos em contraste com o IFN- γ . Indivíduos com LV apresentam aumento na expressão de mRNA de IL-10 na

medula óssea e em células de linfonodos e altos níveis de IL-10 em sobrenadantes de PBMCs estimuladas por antígeno de *L. infantum* (D`OLIVEIRA et al, 1997). A adição de anticorpos monoclonais anti IL-10 restaura a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ em PBMCs de pacientes com a doença (HAILU et al, 2005). O fato de que a IL-10 inibe o efeito da IL-12 na indução da produção de IFN- γ em PBMCs estimuladas por *L. infantum* sugere que a IL-10 seja a principal citocina responsável pela progressão da doença visceralizante (BACELLAR et al, 1996).

Tem sido mostrado que a IL-10 bloqueia a ativação de Th1 e conseqüentemente a resposta citotóxica pela supressão da produção de IL-12 e IFN- γ . A capacidade desta citocina de inibir a ativação de macrófagos também diminui a capacidade destas células de destruir o parasito (revisto por RIBEIRO DE JESUS et al, 1998). A medula óssea e células de linfonodos de indivíduos Sudaneses com LV aguda expressam simultaneamente transcritos de IL-10 e IFN- γ e mRNA de IL-10, os quais diminuem após a resolução da doença (GHALIB et al, 1993). Várias populações de células expressam IL-10 durante a infecção por Leishmania, incluindo células T regulatórias (Tregs) (BELKAID et al, 2002), células Th1 (STAGER et al, 2006; ANDERSON et al, 2007), células NK, macrófagos, células B (MAROOF et al, 2008), células Th2 e CD (SVENSSON et al, 2004). Entretanto ainda não se sabe qual tipo de célula é responsável pela progressão da doença e persistência do parasito.

Em humanos, a dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMCs ativadas por antígenos de Leishmania e clones de células T, tem auxiliado na determinação do papel de Th1 e Th2 na infecção. Estudos na expressão tecidual de mRNA de IL-10 têm revelado seu papel na regulação de respostas de célula T e no envolvimento desta citocina na patologia da infecção por *L. donovani*. Entretanto, a LV ativa, também apresenta correlação com níveis de IFN- γ , IL-2, IL-10 e IL-4. Após a cura, níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 persistem elevados, sugerindo uma coexistência de Th1 e Th2 em indivíduos com LV assim como nos curados (CALDAS et al, 2005). Devido ao papel inibitório na ativação de macrófagos pela IL-10, altos níveis desta citocina podem representar um contrabalanço necessário a uma resposta imune extremamente polarizada, limitando o dano tecidual (TRICHERI, 2001). Outras citocinas como IL-13 (BABALOO et al, 2001) e TGF- β (GANTT et al, 2003) têm sido observadas na LV, entretanto seu papel biológico na modulação da resposta anti-leishmania ainda não está bem definido. Estudos em células T regulatórias (Tregs), as quais produzem IL-10 e TGF- β , podem ajudar no entendimento do papel do TGF- β . Entretanto, é evidente que a sobrevivência do parasito é favorecida na conversão de TGF- β latente em TGF- β ativa por alguns fatores derivados do parasito (GANTT et al, 2003).

Nas últimas décadas foram descritas células do tipo Th17. Estas células produzem as citocinas IL-17 (Também chamada IL-17A), IL-17F e IL-22. Dentre elas, a IL-17 tem sido mais estudada e é considerada a principal citocina efetora deste grupo de células. Células Th17 participam de respostas inflamatórias e possuem funções críticas na defesa do hospedeiro contra bactérias e fungos, principalmente entre aqueles encontrados em mucosas (AUJLA et al, 2007; AUJLA et al, 2008). A diferenciação *in vitro* de células Th17 de células *naive* requer a ação coordenada de múltiplas citocinas, incluindo TGF- β , IL-6, IL-21 e IL-23 (BETTELLI et al, 2006; VELDHOEN et al, 2006; KORN et al, 2007; NURIEVA et al, 2007; ZHOU et al, 2007). Tem sido descrito que estas citocinas também são necessárias para a diferenciação de células Th17 *in vivo* em respostas protetoras a patógenos de mucosa ou reações inflamatórias (KORN et al, 2007; NURIEVA et al, 2007).

Alguns trabalhos vêm mostrando o papel de citocinas do tipo Th17 na LV. STAGER et al. (2006) observaram que CD de medula óssea de camundongos selvagens, estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), têm efeito benéfico quando transplantadas em camundongos infectados por *L. L. donovani*. Este efeito benéfico, devido ao aumento da resistência e diminuição de carga parasitária, foi associado à diminuição de células T CD25⁻ FoxP3⁻ IL-10⁺ CD4⁺ e é dependente de produção de IL-6, necessária na diferenciação de células Th17. PITTA et al. (2009) mostraram que antígenos de *L. L. donovani* estimulam a diferenciação de células Th17 as quais passam a produzir IL-17, IL-22 e IFN- γ . Análise de produção de citocinas por PBMCs de indivíduos que desenvolveram o *Kalazar* e indivíduos que não desenvolveram durante um surto no Sudão mostrou que IL-17 e IL-22 estão altamente e independentemente associadas com proteção à doença.

Além disso, as células Th17 atuam no controle da infecção promovendo o sinergismo entre a produção de INF- γ e o aumento da produção de NO pelos macrófagos ativados e aumentando o influxo de neutrófilos para órgãos afetados (COSTA-MADEIRA et al, 2022).

No curso da LV ocorre hipergamaglobulinemia devido à grande produção de imunoglobulinas, especialmente as da classe IgG, entretanto, clinicamente, esta elevação da resposta humoral não se traduz em regressão da doença (NEVES, 2003). A deficiência de resposta de hipersensibilidade tardia ao teste de Montenegro, dependente de padrão Th1, associada à elevada produção de IgG, têm sido associados à progressão da doença (GONCALVES; CHRISTENSEN; MOSSER, 2020). Todavia, a intensa produção de imunoglobulinas tem efeitos deletérios, devido à intensa formação de imunocomplexos na circulação que ligam o complemento às células sanguíneas diminuindo sua meia vida. Além disso, podem estar associadas a fenômenos patológicos como trombocitopenia,

glomerulonefrite e anemia imunomediada (FEITOSA et al, 2000). MILES et al. (2005), demonstraram em camundongos BALB/c infectados com *L. L. major* que a administração passiva de IgG anti-leishmania resulta em aumento de lesões e de produção de IL-10.

Estudos realizados nos últimos anos têm demonstrando uma variação de subclasses de IgG na LV humana. O aumento de IgG1 específico para Leishmania e níveis de IgG3 foram encontrados em pacientes com LV ativa, quando comparados a controles não infectados. Por outro lado, altos níveis de IgG2 e IgG4 antiparasitários foram encontrados em pacientes tratados e curados (PORTELA et al, 2018).

Portanto, a atuação de uma resposta humoral no combate ao protozoário parece não apresentar grande influência, no entanto, sabe-se que as células T exercem um controle na diferenciação dos isotipos de imunoglobulinas, e um dos mecanismos por trás desse equilíbrio, se dá pela produção de citocinas. Nesse contexto, a IL-10 induz um aumento na produção de IgG1 e IgG3, enquanto IL-4 e IL-13 de células T ativadas, pode induzir a mudança para IgG4 e IgE. A citocina IFN- γ , bem como a IL-6, pode induzir um aumento na produção de IgG2 (PORTELA et al, 2018).

2.3 MOLÉCULAS ANALISADAS E RELACIONADAS À REPOSTA CELULAR

2.3.1 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 4 (CD4)

A glicoproteína CD4 atua como co-receptor do TCR (receptor de células T) que se liga especificamente à molécula de histocompatibilidade de classe II (MHC II), que é principalmente expresso na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas e macrófagos, mas também, expressa em linfócitos B. Para a ativação de células T, serão necessárias moléculas co-estimulatórias: CD27 e seu ligante CD70 e CD28 e seus ligantes B7-1 e B7-2, responsáveis por emitir sinais que promovem a sobrevivência celular, sua proliferação e diferenciação. Células TCD4⁺ naive, conhecidas como células T auxiliares, podem se diferenciar em várias classes de células efetoras produtoras de citocinas específicas que promovem diferentes perfis de resposta imune (NGUYEN et al, 2019).

Os perfis Th1 e Th2 foram os primeiros descritos, sendo as células Th1 produtoras de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 promovendo resposta imune celular e a produção de IL-4, IL-10, IL-5 e IL-13 produzidas por células Th2 estimulando um padrão de resposta humoral baseada na produção de anticorpos, amplamente difundida em resposta contra helmintos e processos

alérgicos. Posteriormente, vários outros perfis foram descritos como Th17 produtores de citocinas IL-17, IL-21 e IL-22, Treg (regulatórias) produtoras de citocinas IL-10 e TGF- β , Th9, Th22 e Tfh (foliculares), que produzem essencialmente, citocinas IL-21 e IL-4 (TANG et al, 2021).

As interações parasito-hospedeiro podem gerar estímulos que direcionam a diferenciação de células TCD4⁺ naive em células auxiliares efetoras que garantem um padrão de resposta específica para cada mecanismo de virulência representado pelo agente agressor (TANG et al, 2021).

Portanto, as células T auxiliares CD4⁺, que participam da imunidade mediada por células, são consideradas um dos principais componentes da imunidade adaptativa.

2.3.2 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 8 (CD8)

A glicoproteína CD8 presente em células T atua como co-receptor, promovendo ação citotóxica após sua ativação e subsequente produção de proteínas efetoras denominadas perforinas e granzimas com ação proteolítica no controle de células infectadas ou crescimento tumoral, acompanhadas de citocinas IFN- γ e TNF- α pró-inflamatórias. Os linfócitos TCD8⁺ expressam como marcadores fenotípicos as moléculas de superfície CD3 e CD8, sendo que a molécula CD3 é responsável por desencadear uma sinalização intracelular após a ligação do receptor de linfócitos T (TCR - *T-cell receptor*) com o complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I - *Major Histocompatibility Complex Class I*), no caso dos linfócitos T CD8⁺.

Já a molécula CD8 atua como um co-receptor para o MHC-I, facilitando assim a sua ligação com o TCR dos linfócitos TCD8⁺. As células TCD8⁺ naive são ativadas pelo reconhecimento entre o TCR (receptor de células T) e peptídeos específicos apresentados pela molécula de histocompatibilidade de classe I (MHC I) presentes em células dendríticas, apresentadoras de antígenos (APCs) em órgãos linfóides secundários associados à co-estimulação pela molécula de superfície celular linfocitária CD28 e seus ligantes B7-1 e B7-2, expressas em APCs ativadas (MITTRÜCKER, VISEKRUNA, HUBER, 2014).

Como células efetoras, os linfócitos TCD8⁺ deixam os órgãos linfóides secundários e percorrem os tecidos para exercer suas funções imunológicas. A partir deste momento, os linfócitos TCD8⁺ têm vida curta, mas são capazes de contribuir para a eliminação de patógenos por mecanismos efetores (MITTRÜCKER, VISEKRUNA, HUBER, 2014).

2.3.3 CD28

O CD28 é uma proteína transmembrana, membro da superfamília de moléculas co-estimulatórias, caracterizadas pelo domínio extracelular variável ligado à imunoglobulina. O CD28 é expresso em 80% de células TCD4⁺ e em 50% de células TCD8⁺ em humanos, havendo declínio com a idade (ESENSTEN et al, 2016).

Para ativação de células T, são necessários dois sinais principais, a interação entre o TCR e MHC e a interação com a molécula CD28 constitutivamente expressa em células T, com ação co-estimulatória, e seus ligantes, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), ambos de superfície celular (RIEDER et al, 2021).

O CD80 está presente na forma predominantemente dimérica na superfície celular, enquanto o CD86 é monomérico. O CD86, possui maior relevância na iniciação da resposta imune, pois, é expresso constitutivamente durante a apresentação antigênica e é rapidamente regulado via estímulos inatos por células apresentadoras de antígenos (APC), enquanto o outro ligante, CD80, tem sua expressão aumentada posteriormente. A partir desses mecanismos haverá ativação, seguido por produção de citocinas e proliferação celular (RIEDER et al, 2021).

O CD28 libera sinais que facilitam a manutenção da sobrevivência celular, produção de citocinas como a IL-2 e diferenciação de células naive em efetoras. Além da molécula de superfície celular CD27, que a partir de seu ligante, o CD70, atuam na co-estimulação promovendo proliferação e diferenciação celular. Após sua ativação, estes linfócitos respondem ao antígeno entrando em fase de expansão clonal, gerando uma população numerosa de células T antígeno-específicas (MITTRÜCKER, VISEKRUNA, HUBER, 2014).

2.3.4 CD27

A molécula CD27 é uma glicoproteína transmembrana membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) expressa em células TCD4⁺, TCD8⁺, células B, Treg e natural killers (NK). Atua como co-estimulador em células T e B. Tem como ligante natural o CD70 transitoriamente expresso em células T, células B ativadas, NK e células dendríticas. Portanto, a co-estimulação CD27/CD70 potencializa a imunidade por ativação de células T, aumenta a expansão clonal, diferenciação de células T citotóxicas (CD8⁺) e de memória antígeno-específicas (STARZER e BERGHOFF, 2019).

Além disso, o CD27/CD70 também tem a capacidade de influenciar o sistema imune inato por induzir proliferação e citotoxicidade pelo aumento da produção de IFN- γ em células NK. Estudos *in vitro* demonstraram que células T que expressam CD27 e CD70 atuam na regulação e ativação de células B e produção de anticorpos (STARZER e BERGHOFF, 2019).

2.3.5 PD-1 (CD279)

O Receptor de Morte Celular Programada - PD-1 (*programmed death-ligand-1*) (CD279) e seus ligantes, PD-L1 (B7-H1 ou CD274) e PD-L2 (B7-DC ou CD273), participam de importantes vias na manutenção de tolerância periférica, mecanismo este, que mantém a quiescência de células T autoreativas maduras e que eventualmente escapam de mecanismos de tolerância central durante seu desenvolvimento no timo. O PD-1 é considerado membro da superfamília CD28 e foi inicialmente identificado preferencialmente expresso em células apoptóticas, e mais tarde, estudo conclui que sua atividade fisiológica não estaria relacionada a morte celular. Além de ser expresso em células T maduras ativadas, o PD-1 é expresso em baixos níveis em células T duplo negativas (CD4-/CD8-) no timo, natural killers (NK) ativadas, células T, células B, monócitos e células de Langerhans imaturas (JAFARZADEH et al, 2022).

Em células T exaustas, os níveis de expressão não apenas de PD-1, mas de outros receptores inibitórios que, como PD-1, são induzidos durante a ativação das células T, são persistentemente elevados, o que leva a uma profunda incapacidade de T células em responder a sinais de ativação (JAFARZADEH et al, 2022).

Posteriormente, compreendeu-se que os sinais co-estimulatórios negativos também existem e fornecem sinais co-inibitórios funcionando como pontos de controle imunológico apresentando um papel decisivo na manutenção da tolerância periférica e na prevenção de autoimunidade. A via envolvendo B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) é determinada por efeito co-estimulatório em CD28 e CTLA-4 (CD152) sendo a via co-estimulatória mais bem caracterizada, sendo crucial na ativação de células T e tolerância (JAFARZADEH et al, 2022).

2.3.6 TIM-3 (CD366)

A proteína TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain 3*), foi originalmente encontrada expressa em superfície de células Th1 agindo como molécula de ação regulatória co-inibitória, ligando-se ao receptor galectina-9 (Gal-9) aumentando o influxo de cálcio

intracelular para mediar apoptose em células Th1, no entanto, não sendo observado em células Th2. Mas atualmente foi encontrado na superfície de células natural killers (NK), monócitos, macrófagos, células dendríticas, TCD8⁺, TCD4⁺ e Th17. A interação de TIM-3 e seu ligante também pode causar tolerância imunológica periférica, e o bloqueio de TIM-3 pode eliminar o desenvolvimento de tolerância em células Th1 estando envolvido em mecanismos autoimunes e desenvolvimento tumoral (ZHAO et al, 2021).

Todavia, quando estimulado reduz a atividade pró-inflamatória relacionada a produção de citocinas, principalmente por células Th1, induzindo mecanismo de exaustão celular estando relacionado a regulação e preservação tecidual em doenças crônicas.

2.3.7 LAP (Latency-Associated Peptide)

O fator de crescimento transformador β -1 (TGF β -1) faz parte da grande família TGF- β , sendo considerado um potente polipeptídeo com ação regulatória envolvendo o crescimento e proliferação celular otimizando os perfis de imunidade. Devido à sua constante presença nos processos biológicos, as células necessitam manter um delicado equilíbrio na expressão e atividade de TGF β -1 (STACHOWSKI, SNELL, SNELL, 2020).

Muitas proteínas da família TGF- β estimulam a proliferação celular, embora muitas vezes modestamente em comparação com outros fatores de crescimento, dependente do tipo celular e ambiente. Por outro lado, o TGF- β , inibe fortemente a proliferação de vários tipos de células, incluindo epiteliais, endoteliais, células hematopoiéticas e do sistema imune (DERINCK & BUDI, 2019), caracterizada como citocina anti-inflamatória. O peptídeo associado à latência (LAP) participa como molécula fundamental na regulação da atividade do TGF β -1 por meio de sua co-secreção e interação em pró-domínio do TGF β -1 que, quando interrompida, contribui para estados de doença (STACHOWSKI, SNELL, SNELL, 2020).

O LAP é um dímero ligado por ligações dissulfeto que interage não covalentemente com o TGF β -1 (*Transforming Growth Factor β -1*) e bloqueia os respectivos sítios de ligação com seus receptores de superfícies celulares reprimindo vias de sinalização. A glicosilação da parte N-terminal do polipeptídeo é o mecanismo que promove a latência, ou seja, a inatividade do recém-sintetizado TGF β -1, levando ao conceito de que para a ativação funcional, é necessário um estágio posterior (TZAVLAKI & MOUSTAKAS, 2020). O LAP pode ser alvo de hidrolases virais, proteases e proteínas de adesão, induzindo mudanças conformacionais entre TGF β -1 e

LAP liberando o TGF β -1 e promovendo sua ativação (STACHOWSKI, SNELL, SNELL, 2020).

2.3.8 CD25 (IL-2RA)

Como subpopulações de células T existem células com ação regulatória (Tregs) caracterizadas pela alta expressão de CD25 na superfície sendo o FoxP3 seu respectivo fator transcricional, expresso por estas populações que se tornam produtoras de Interleucina - 10 (IL-10) e TGF- β , atuando na atividade supressora da resposta imune (ZOHOURI et al, 2021).

A Interleucina - 2 (IL-2) possui um receptor heterodímero com três subunidades: subunidade- α (CD25), subunidade- β (CD122) e a cadeia γ (CD132). Dentre essas três, a CD25 é a subunidade com a maior afinidade pela IL-2, mas não transmite sinais de forma independente, pois não possui uma cauda citoplasmática. Todavia, o CD25 coopera com as outras duas subunidades para transmitir sinais por IL-2. A sinalização de IL-2 mantém a sobrevivência e função supressora, mas não a estabilidade de Tregs maduras, por outro lado, estudos em humanos, mostraram que o CD25 é necessário para a função supressora de Treg, mas não para sua sobrevivência (ZOHOURI et al, 2021).

A IL-2 induz um sinal via transdutor e ativador de transcrição 5 (STAT5) que mantém a expressão de FoxP3. Estudos demonstram que a sinalização via PD-1 em um ambiente inflamatório crônico, reduziu a fosforilação de STAT5 e diminuiu a função supressiva de CD25, FoxP3, CTLA-4 e Treg, demonstrando a importância do estímulo via IL-2 para na diferenciação de células com ação regulatória (ZOHOURI et al, 2021).

2.3.9 CD127 (IL-7R α)

A sinalização pelo receptor IL-7R α (CD127) via IL-7 é essencial para o desenvolvimento de células T e regulação e homeostase de células naive e células T de memória, mantendo sua sobrevivência, induzindo a expressão de Bcl-2 e Bcl-xL (fatores anti-apoptóticos) e suprimindo a expressão de Bax (fator pró-apoptótico), facilitando a proliferação de células T (VRANJKOVIC et al, 2007).

O receptor funcional de IL-7 é composto pela cadeia IL-7 específica, IL-7R α (CD127) e pela cadeia γ comum (γ c ou CD132), que é compartilhada com uma série de outras citocinas que incluem IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21. O receptor CD127 é um complexo proteico

heterodimérico, composto pela cadeia específica IL-7R α e o receptor CD132. Em contraste com a expressão de CD132, a expressão de IL-7R α é dinamicamente regulada durante o desenvolvimento e diferenciação de células T, de modo que a expressão de IL-7R α é o principal determinante da capacidade de resposta de IL-7 (VRANJKOVIC et al, 2007; PARK et al, 2019).

Poucas células TCD8⁺ de pacientes infectados pelo vírus HIV expressam CD127 em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo que fatores endógenos de alguns indivíduos e/ou mecanismos virais regulam a expressão do receptor de IL-7.

Além de estimular a proliferação de células TCD8⁺, a IL-7 aumenta as respostas antivirais, alorreativas e antitumorais. Além disso, a responsividade das células TCD8⁺ à IL-7, influencia na manutenção da célula naiva e populações de memória, expansão e diferenciação de células efetoras (PARK et al, 2019).

2.3.10 CXCR-3 (CD183)

As quimiocinas são membros de uma família de pequenas proteínas entre 8 e 15kDa que regulam a migração e ativação de leucócitos. As quimiocinas têm sido implicadas na quimiotaxia e regulação da resposta imune na inflamação, alergia, autoimunidade e doenças infecciosas bem como em certos processos fisiológicos, incluindo hematopoese e angiogênese (SATO et al, 2001; ANTONELLI et al, 2014).

Existem duas classes de quimiocinas principais, subfamílias (CC e CXC), dependendo do número de cisteínas e espaçamento entre as duas primeiras cisteínas. Estudos sugerem que a interação entre quimiocinas e seus receptores é crucial para a migração seletiva de células T circulantes do sangue periférico para locais de inflamação ou órgãos linfóides secundários, incluindo gânglios linfáticos e placas de Peyer (SATO et al, 2001; ANTONELLI et al, 2014).

CXCL9, CXCL10 e CXCL11 possuem homologia estrutural e seus genes são altamente induzíveis por IFN- γ sendo que as três quimiocinas, compartilham a capacidade de promover a migração direcional de células T ativadas e de memória, mas não de células T naiva. (ANTONELLI et al, 2014).

A expressão do receptor comum para essas quimiocinas, CXCR3, é encontrado em níveis elevados em células T ativadas, células T de memória e células natural killers (NK) (ANTONELLI et al, 2014).

Finalmente, estudos experimentais em vários modelos de doenças indicam que deficiência de CXCR3 ou seus ligantes prejudica significativamente a imunidade mediada por células (ANTONELLI et al, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Observando a evolução e o comportamento da doença em vários indivíduos e em diferentes regiões, pôde-se constatar que a LV não apresenta clínica uniforme. A importância de se estudar os mecanismos de patogenicidade em diferentes grupos populacionais, se torna essencial para o entendimento aprofundado dos processos fisiopatológicos da leishmaniose visceral.

4 HIPÓTESE

De acordo com o comportamento do parasito em áreas endêmicas, indivíduos que vivem em contato frequente com o vetor e possivelmente com o parasito, podem apresentar perfis variados de resposta imune, gerando um ambiente equilibrado, tornando a maioria dos infectados de áreas de intensa transmissão, assintomáticos, no entanto, as variáveis genéticas e ambientais podem tornar alguns indivíduos vulneráveis ao protozoário, apresentando um comportamento imunológico inconsistente durante o controle do parasitismo.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de moléculas de superfície celular em linfócitos T de pacientes tratados após infecção por leishmaniose visceral e pacientes controle de área endêmica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

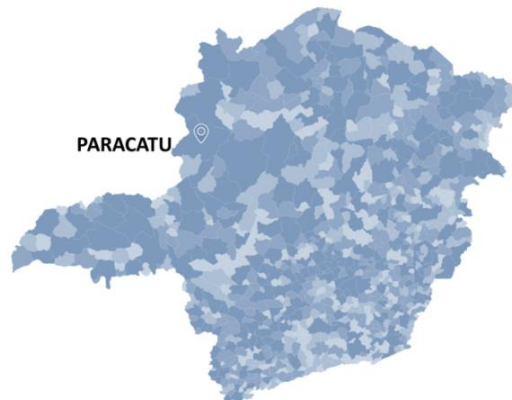
- Analisar a expressão de moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 em populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de pacientes tratados e pacientes controle de área endêmica;
- Analisar a expressão de molécula de exaustão PD-1 em populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de pacientes tratados e pacientes controle de área endêmica;
- Analisar populações de linfócitos TCD8⁺ de memória (TCD8⁺ CD127^{high} CXCR-3⁺) e exaustão celular (TCD8⁺ CD127^{low} TIM-3⁺) em pacientes tratados e pacientes controle de área endêmica;
- Analisar populações de linfócitos TCD4⁺ quanto à expressão de moléculas CD27 e CD28 e populações de células T regulatórias (TCD4⁺ CD25⁺ LAP⁺) de pacientes tratados e pacientes controle de área endêmica;
- Analisar populações de linfócitos TCD8⁺ quanto à expressão de moléculas CD27 e CD28 e populações de células T regulatórias (TCD4⁺ CD25⁺ LAP⁺) de pacientes tratados e pacientes controle de área endêmica.

6 PACIENTES E MÉTODOS

6.1 CASUÍSTICA

O estudo foi conduzido no município de Paracatu, localizado no noroeste de Minas Gerais. O município é considerado área de transmissão intensa de leishmaniose visceral pela média anual acima de 4,4 casos evidenciado entre 2013 e 2015 pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016). Possui 94.539 habitantes (IBGE, 2021) e tem apresentado números de importância epidemiológica de casos caninos e humanos. A primeira notificação de caso humano ocorreu em 2002. Em 2004 e 2005 houve um aumento expressivo no número de casos (73 e 45 casos respectivamente), seguido de uma ligeira diminuição entre 2006 e 2011 (variando entre 21 a 38 casos). Nos anos de 2012 e 2013, 22 casos foram registrados na cidade (SINAN, 2022). No total, de 2010 a 2020, foram registrados 104 casos (SINAN, 2022).

Figura 2: Área de estudo



Fonte: IBGE, 2022. Adaptado pelo autor.

Foram selecionados pacientes tratados para leishmaniose visceral (LV) entre 2014 e 2019 e indivíduos assintomáticos da mesma área endêmica, totalizando 21 participantes. Os indivíduos foram divididos em dois grupos:

Indivíduos tratados para leishmaniose visceral (LV) (n=10)

Indivíduos que evidenciaram quadro clínico de LV, confirmados por método parasitológico ou sorológico associado à resposta terapêutica específica após tratamento e cura clínica. Todos pacientes avaliados eram procedentes do município de Paracatu-MG.

Indivíduos assintomáticos com sorologia negativa (controles) (n=11)

Indivíduos procedentes de mesma área endêmica que os indivíduos tratados para LV, sem características clínicas ou histórico de tratamento para leishmaniose, com sorologia negativa (Kalazar Detect™ - InBios).

As coletas de sangue foram realizadas entre os meses de janeiro e dezembro de 2019 diante da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM com parecer número 1.846.584. Os mesmos foram entrevistados e informados, incluindo os pais ou responsáveis pelos menores que participaram. Após aceitação em colaborar com o estudo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foi realizada uma avaliação clínico-laboratorial dos pacientes tratados a partir de seus prontuários. Foram colhidas amostras de sangue em sistema Vacutainer® utilizando tubos com anticoagulante (*Ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA) e processadas em protocolo *ex vivo* para a realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Os critérios de inclusão para os pacientes tratados foram: exame sorológico por Imunofluorescência indireta positiva (IFI > 1:40) ou Kalazar Detect™ - InBios positivo, demonstração do parasito em esfregaço após punção de medula óssea ou ainda, remissão dos sintomas após tratamento de acordo com o protocolo indicado para cada caso. Pacientes tratados e controles de área endêmica com doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas, portadores do vírus HIV ou de quaisquer imunodeficiências, foram excluídos do estudo.

6.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO A PARTIR DE PROTOCOLO *EX VIVO*

Cada indivíduo participante do experimento foi submetido à coleta de amostras de sangue por acesso venoso periférico. Após a punção, utilizando tubos a vácuo contendo

anticoagulante EDTA, cada participante, contribuiu com quatro tubos de 4mL ou aproximadamente 16ml de sangue total. Foram transportados em caixa térmica até o laboratório de apoio sediado no campus do Centro Universitário Atenas - UniAtenas, em Paracatu-MG, e cuidadosamente adicionaram-se as amostras em tubos plásticos de 15mL contendo 6mL de Ficoll-Hystopaque[®]. Os tubos foram centrifugados cuidadosamente à 400g por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a centrifugação, os tubos foram retirados cuidadosamente da centrífuga e foi pipetado o plasma dos pacientes em microtubos, refrigerando-os a -20°C. Coletou-se a camada de células mononucleares do sangue periférico em um novo tubo plástico de 15mL e adicionou-se 10mL de solução de Hanks 1% SFB, centrifugando-os a 400g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante de cada tubo foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão, sendo adicionado mais 5mL de solução de Hanks 1% SFB. Os tubos foram centrifugados novamente a 400g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante dos tubos centrifugados, foram ressuspensos e ao sedimento celular, adicionados mais 10mL de solução de Hanks 1% SFB.

6.3 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após a separação de células, foi realizada a contagem das mesmas em câmara de Neubauer, distribuindo 5×10^5 células por tubo de citometria. Centrifugaram-se os tubos por 600g, 5 minutos a 4°C, desprezando o sobrenadante dos tubos centrifugados e ressuspensão do sedimento celular. Foram adicionados 100µL de PBS soro humano tipo AB, Rh positivo 10%, inativado, em cada tubo, deixando-os incubados por 30 minutos à 4°C.

Após a incubação, foram adicionados os respectivos anticorpos em cada tubo na diluição indicada pelo fabricante (BD Pharmingen[™]) de acordo com a Tabela 1. Utilizou-se um tubo controle sem anticorpos denominado de branco e um tubo com o isotipo MsIgG1, k (BD Pharmingen[™]), para compensação.

Foram incubados por 30 minutos a 4°C no escuro. Os sedimentos foram ressuspensos e adicionou-se mais 3mL de solução de Hanks 1% SFB. Centrifugaram-se os tubos por 600g, 5 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante do tubo centrifugado foi desprezado e o sedimento celular foi ressuspensão adicionando-se 250µL de paraformaldeído a 2%. Os tubos foram mantidos a 4°C no escuro até a leitura no citômetro de fluxo (BD FACSCanto[™] II).

A aquisição de 50.000 eventos por tubo foi visualizada através do software CellQuest (BD Biosciences, EUA) e a análise da aquisição observada na **figura 2 (I-III)**, **figura 3 (IV-**

VI), figura 6 (M) e figura 7 (P) foi realizada no software FlowJo versão 10.6.1 (BD 4 Biosciences, EUA). Realizou-se o “gate” avaliando o tamanho (*forward scatter* – FSC) e granulosidade (*side scatter* – SSC) celular, buscando linfócitos. O painel referente às moléculas analisadas e suas respectivas fluorescências nos diferentes tubos estão representadas na Tabela 1. Foram analisadas populações celulares que expressavam as seguintes moléculas de superfície: CD4, CD8, CD27, CD28, CD127, CD25, CD183 (CXCR-3), CD366 ou TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and main-domain containing-3*), CD279 ou PD-1 (*programmed death-ligand-1*) e LAP (*latency-associated peptide*).

Tabela 1: Painel referente às moléculas de superfície de células T, isotipos e seus respectivos fluorocromos de acordo com as concentrações usadas e suas funções.

Tubo	Moléculas	Fluorocromos	Isotipos	Diluição	Função
Tubo 6	CD25 (IL-2RA)	FITC	MsIgG1, k	1:12	Ativação e Treg
	CD4	PeCy-7	MsIgG1, k	1:120	T auxiliares
	LAP	Alexa 647	MsIgG1, k	1:120	Treg (TGF- β)
Tubo 5	CD8	BB515	MsIgG1, k	1:60	T citotóxicos
	TIM-3 (CD366)	PE	MsIgG1, k	1:120	Exaustão
	CXCR-3 (CD183)	PeCy-7	MsIgG1, k	1:24	Ativação e memória
	CD127 (IL-7R α)	Alexa 647	MsIgG1, k	1:6	Memória
Tubo 4	CD8	BB515	MsIgG1, k	1:60	T citotóxicos
	PD-1	PE	MsIgG1, k	1:24	Exaustão
	CD27	PeCy-7	MsIgG1, k	1:120	Co-estimulatória
	CD28	APC	MsIgG1, k	1:24	Co-estimulatória
Tubo 3	CD27	FITC	MsIgG1, k	1:24	Co-estimulatória
	PD-1	PE	MsIgG1, k	1:24	Exaustão
	CD4	PeCy-7	MsIgG1, k	1:120	T auxiliares
	CD28	APC	MsIgG1, k	1:24	Co-estimulatória
Tubo 2	Isotipo	FITC	MsIgG1, k	1:60	Controle
Tubo 1	Branco	-	-	-	Controle

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. BB515, azul brilhante 515; PE, ficoeritrina; PE-Cy7, ficoeritrina cianina 7; APC, alofocianina; FITC, isotiocianato de fluoresceína; Alexa 647.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando os softwares EXCEL 2010 for WINDOWS (MICROSOFT, EUA) e STATVIEW (ABACCUS-EUA).

Foi utilizado o teste de Correlação de *Spearman* para a realização das análises por correlação. Valores de p e r foram determinados pelo teste de correlação de *Spearman*, onde r expressa o coeficiente de correlação. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

ALVAR J, CANAVATE C, GUTIÉRREZ-SOLAR B, JIMÉNEZ M, LAGUNA F, LÓPEZVÉLEZ R, MOLINA R, MORENO J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Review* 10: 298-391, 1997.

AMATO NETO, V. Leishmaniose Visceral Com período De incubação De, Pelo Menos, Quatro Anos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.20, p.312-314, 1978.

ANDERSON C. F.; OUKKA. M.; KUCHROO. V. J.; SACKS, D. CD4 CD25 Foxp3 Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.*;204:285– 97, 2007.

ANTONELLI, Alessandro et al. CXCR3, CXCL10 and type 1 diabetes. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 25, n. 1, p. 57-65, 2014.

AUJLA, S. J.; CHAN, Y. R.; ZHENG, M.; FEI, M.; ASKEW, D. J.; POCIASK, D. A.; REINHART, T. A.; MCALLISTER, F.; EDEAL, J.; GAUS, K.; HUSAIN, S.; KREINDLER, J. L.; DUBIN, P. J.; PILEWSKI, J. M.; MYERBURG, M. M.; MASON, C. A.; IWAKURA, Y.; KOLLS, J. K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 14:275–281, 2008.

AUJLA, S. J.; DUBIN, P. J.; KOLLS, J. K. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol.* 19:377–382, 2007.

BABALOO, Z.; KAYE, P. M.; ESLAMI, M. B. Interleukin-13 in Iranian patients with visceral leishmaniasis: relationship to other Th2 and Th1 cytokines. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien.* 95: 85–88, 2001.

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRALNETTO, M.; COSTA, C. H.; COFFMAN, R. L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases.* 173:1515-1518, 1996.

BADARÓ R, JONES TC, CARVALHO EM, SAMPAIO DP, REED SG, BARRAL A, TEIXEIRA R, JOHNSON WD. New perspectives on a sub clinical form of visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 154: 1003-1011, 1986.

BAHRAMI, Fariborz et al. FOXP3 expression and frequency of regulatory T cells in healed individuals from *Leishmania major* infection and the asymptomatic cases. *Human immunology*, v. 75, n. 10, p. 1026-1033, 2014.

BAMIGBOLA, Ifeoluwa E.; ALI, Selman. Paradoxical immune response in leishmaniasis: The role of toll-like receptors in disease progression. *Parasite Immunology*, v. 44, n. 4-5, p. e12910, 2022.

BĂNICĂ, Leontina et al. Exhaustion and senescence of CD4 and CD8 T cells that express co stimulatory molecules CD27 and CD28 in subjects that acquired HIV by drug use or by sexual route. *Germs*, v. 11, n. 1, p. 66, 2021.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. *Brazilian journal of medical and biological research*. 31: 149–155, 1998.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 420:502–7, 2002.

BELO, Vinicius Silva et al. Risk factors for adverse prognosis and death in American visceral leishmaniasis: a meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, n. 7, p. e2982, 2014.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 8:345–350, 2007.

BI, Kaiming et al. Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study. *BioMed research international*, v. 2018, 2018.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; ROLLINGHOFF, M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology*. 189: 356–396, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis—authors' reply. *The Lancet*, v. 393, n. 10174, p. 872-873, 2019.

CALDAS, Arlene et al. Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC infectious diseases*, v. 5, n. 1, p. 113, 2005.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARO, R.; JOHNSON, W. D. JR. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *The Journal of Clinical Investigation*. 83: 860–864, 1989.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; RÉGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 152: 5949–5956, 1994.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W. D. JR. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *Journal of Infectious Diseases* 165: 535–540, 1992.

CAVALCANTE, Kellyn Kessiene de Sousa et al. Epidemiological and clinical factors associated with lethality from Human Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil, 2007 to 2018. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 64, 2022.

CHAPMAN, Lloyd AC et al. Age trends in asymptomatic and symptomatic *Leishmania donovani* infection in the Indian subcontinent: A review and analysis of data from diagnostic and epidemiological studies. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 12, n. 12, p. e0006803, 2018.

COSTA, S. R.; D'OLIVEIRA, A. JR.; BACELLAR, O; CARVALHO, E. M. T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant leishmania antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94: 367–370, 1999.

COSTA-MADEIRA, Juliana C. et al. T Lymphocyte Exhaustion During Human and Experimental Visceral Leishmaniasis. *Front. Immunol.* 13: 835711. doi: 10.3389/fimmu, 2022.

D'OLIVEIRA JA, COSTA SRM, BARBOSA AB, ORGE MGO, CARVALHO EM. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 15-20, 1997.

DE ARAÚJO ALBUQUERQUE, Layana Pachêco et al. Influence of sex hormones on the immune response to leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 43, n. 10-11, p. e12874, 2021.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar no Ceará. *O Hospital*, 48: 61, 1955.

DERYNCK, Rik; BUDI, Erine H. Specificity, versatility, and control of TGF- β Family signaling. *Science signaling*, v. 12, n. 570, p. eaav5183, 2019.

ESENSTEN, Jonathan H. et al. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*, v. 44, n. 5, p. 973-988, 2016.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; McAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A. W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *The Journal Infectious Disease* 166: p. 1124-1132, 1992.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. Aspectos Clínicos de Cães com Leishmaniose Visceral no Município de Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Clínica Veterinária*. 5:28, 36-44, 2000.

GANTT, K. R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M. B.; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L.; RECKER, T. J.; MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *The Journal of Immunology*. 170: 2613–2620, 2003.

GARCIA DE MOURA R, COVRE LP, FANTECELLE CH, GAJARDO VAT, CUNHA CB, STRINGARI LL, et al. PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol.* 12:632-667, 2021.

GAUTAM S, KUMAR R, SINGH N, SINGH AK, RAI M, SACKS D, et al. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis* 209 (2):290–9, 2014.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J. A.; KUBIN, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; GRABSTEIN, K. H.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *The Journal of Immunology*. 154: 4623–4629, 1995.

GONCALVES, Ricardo; CHRISTENSEN, Stephen M.; MOSSER, David M. Humoral immunity in leishmaniasis—Prevention or promotion of parasite growth?. *Cytokine*: X, v. 2, n. 4, p. 100046, 2020.

HAILU A.; VAN BAARLE, D.; KNOL, G. J.; BERHE, N.; MIEDEMA, F.; KAGER, P. A. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clinical Immunology*. 117: 182–191, 2005.

HERMOSO, T. et al. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *The EMBO journal*, v. 10, n. 13, p. 4061, 1991.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet*. v.354, p.1191–1199, 1999.

JAFARZADEH, Abdollah et al. The expression of PD-1 and its ligands increases in *Leishmania* infection and its blockade reduces the parasite burden. *Cytokine*, v. 153, p. 155839, 2022.

JAWED, Junaid Jibrán; DUTTA, Sayanika; MAJUMDAR, Subrata. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 117, p. 109098, 2019.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JAGER, A.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K.. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature*. 448:484–487, 2007.

KUPANI, Manu; PANDEY, Rajeev K.; MEHROTRA, Sanjana. Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 236, n. 4, p. 2255-2267, 2021.

LEES, Jason R. CD8+ T cells: The past and future of immune regulation. *Cellular immunology*, v. 357, p. 104212, 2020.

MADALOSSO, Geraldine et al. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, 2012.

MAROOF, Asher et al. Posttranscriptional regulation of *Il10* gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity*, v. 29, n. 2, p. 295-305, 2008.

MESQUITA, Inês et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. *Cytokine*, v. 112, p. 16-20, 2018.

MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of experimental medicine*, v. 201, n. 5, p. 747-754, 2005.

MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D. F.; FINKELMAN, F. D.; MURRAY, H. W. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 62: 1058–1063, 1994.

MITTRÜCKER, Hans-Willi; VISEKRUNA, Alexander; HUBER, Magdalena. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, v. 62, n. 6, p. 449-458, 2014.

NEVES, D. P. Leishmaniose Visceral Americana. In: _____. *Parasitologia Dinâmica*. São Paulo: Atheneu, p 101-12, 2003.

NGUYEN, Quynh P. et al. Origins of CD4⁺ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology*, v. 157, n. 1, p. 3-12, 2019.

NURIEVA, R.; YANG, X. O.; MARTINEZ, G.; ZHANG, Y.; PANOPOULOS, A. D.; MA, L.; SCHLUNS, K.; TIAN, Q.; WATOWICH, S. S.; JETTEN, A. M.; DONG, C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 448:480–483, 2007.

OPAS. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas. n. OPAS/CDE/VT/21-0019, 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>> Acesso em: 05 de dezembro de 2022.

PARK, Jung-Hyun et al. IL7 receptor signaling in T cells: A mathematical modeling perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, v. 11, n. 5, p. e1447, 2019.

PATSOUKIS N, WANG Q, STRAUSS L, BOUSSIOTIS VA. Revisiting the PD-1 Pathway. *Sci Adv* (2020) 6(38):eabd2712.

PEARSON, R. D.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, p. 1-11, 1996.

PEIXOTO, Rephany F. et al. Characterization of Regulatory T Cells in Patients Infected by *Leishmania Infantum*. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 1, p. 18, 2022.

PETERS, Nathan C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala-azar caused by *Leishmania donovani*. *The Journal of clinical investigation*, v. 119, n. 8, p. 2379-2387, 2009.

PORTELA, Áquila SB et al. Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis. *Immunobiology*, v. 223, n. 3, p. 303-309, 2018.

PRATA, A. R. Estudo Clínico e Laboratorial do Calazar. Tese de Livre Docência, Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1957.

- REY, L. Leishmânia e Leishmanioses: O Parasito; O Complexo *Leishmania donovani* e a Leishmaniose Visceral. In: _____. *Parasitologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.182-92; 215-26, 1991.
- RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31: 143–148, 1998.
- RIEDER, Sadiye Amcaoglu et al. B7-H7 (HHLA2) inhibits T-cell activation and proliferation in the presence of TCR and CD28 signaling. *Cellular & molecular immunology*, v. 18, n. 6, p. 1503-1511, 2021.
- RODRIGUES, Lorranny Santana et al. Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8^{High} T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 773983, 2021.
- ROSENBLUM, Michael D.; WAY, Sing Sing; ABBAS, Abul K. Regulatory T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 2, p. 90-101, 2016.
- RUIZ-POSTIGO, J A. et al. Global leishmaniasis surveillance: 2021, assessing the impact of the COVID-19 pandemic. *Weekly Epidemiological Record*, v. 97, n. 45, p. 575-590, 2022.
- SACKS, DAVID L. et al. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *The Journal of immunology*, v. 138, n. 3, p. 908-913, 1987.
- SAFAVI, Moeinadin; ESHAGHI, Hamid; HAJIHASSANI, Zeinab. Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. *Diagnostic Cytopathology*, v. 49, n. 3, p. 446-448, 2021.
- SAMANT, Mukesh et al. Role of cytokines in experimental and human visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 624009, 2021.
- SATO, Katsuaki et al. Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 3, p. 1659-1666, 2001.
- SIMPLÍCIO, A.C.R.; FURTADO, J.B.V.; MONTEIRO, P.S.; GARRETT, D. Leishmaniose visceral no Brasil: análise epidemiológica nos últimos 16 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, supl. 1, p. 298, 2002.
- SINGH, Bhawana et al. A molecular signature for CD8⁺ T cells from visceral leishmaniasis patients. *Parasite immunology*, v. 41, n. 11, p. e12669, 2019.
- STACHOWSKI, Timothy R.; SNELL, Mary E.; SNELL, Edward H. Structural insights into conformational switching in latency-associated peptide between transforming growth factor β -1 bound and unbound states. *IUCrJ*, v. 7, n. 2, p. 238-252, 2020.
- STÄGER, S.; MAROOF, A.; ZUBAIRI, S.; SANOS, S. L.; KOPF, M.; KAYE, P. M. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10⁺ CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 36(7):1764-71, 2006.

STARZER, Angelika M.; BERGHOFF, Anna S. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO open*, v. 4, p. e000629, 2019.

SVENSSON, Mattias et al. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity*, v. 21, n. 6, p. 805-816, 2004.

TANASKOVIC, Sara et al. Impaired upregulation of the costimulatory molecules, CD27 and CD28, on CD4+ T cells from HIV patients receiving ART is associated with poor proliferative responses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 33, n. 2, p. 101-109, 2017.

TANG, Hairong et al. Teleost CD4+ helper T cells: Molecular characteristics and functions and comparison with mammalian counterparts. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 240, p. 110316, 2021.

TOEPP, Angela J.; PETERSEN, Christine A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in veterinary science*, v. 130, p. 19-25, 2020.

TRINCHIERI, Giorgio. Regulatory role of T cells producing both interferon γ and interleukin 10 in persistent infection. *The Journal of experimental medicine*, v. 194, n. 10, p. F53-F57, 2001.

TZAVLAKI, Kalliopi; MOUSTAKAS, Aristidis. TGF- β Signaling. *Biomolecules*, v. 10, n. 3, p. 487, 2020.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infectious Disease Clinics*, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24:179–189, 2006.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G. E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. supl II, p. 85-92, 1998.

VRANJKOVIC, Agatha et al. IL-7 decreases IL-7 receptor α (CD127) expression and induces the shedding of CD127 by human CD8+ T cells. *International immunology*, v. 19, n. 12, p. 1329-1339, 2007.

WHITE J. R, CLINTON A. et al. Leishmania chagasi antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 46, n. 2, p. 123-131, 1992.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2010. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf, 2010.> Acesso em: 15 de março de 2019.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. *Microbial pathogenesis*, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

ZAMORA-CHIMAL, Jaime; HERNÁNDEZ-RUIZ, Joselín; BECKER, Ingeborg. NKT cells in leishmaniasis. *Immunobiology*, v. 222, n. 4, p. 641-646, 2017.

ZHAO, Lizhen et al. TIM-3: An update on immunotherapy. *International Immunopharmacology*, v. 99, p. 107933, 2021.

ZHOU, L.; SPOLSKI IVANOV, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY, D. E.; LEONARD, W. J.; LITTMAN, D. R. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 8:967–974, 2007.

ZIJLSTRA, E. E.; ALI, M. S.; EL-HASSAN, A. M.; EL-TOUM, I. A.; SATTI, M.; GHALIB, H. W.; SONDORP, E.; WINKLER, A. Kala-azar in displaced people from southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 85(3):365-9, 1991.

ZIJLSTRA, E.E.; EL-HASSAN, A.M. Leishmaniasis in Sudan: 3. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, suppl. 1, p. 27 58, 2001.

ZOHOURI, Mahshid et al. CD4+ CD25-FoxP3+ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population?. *International Reviews of Immunology*, v. 40, n. 4, p. 307-316, 2021.

APÊNDICE A – Artigo Científico**PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF T LYMPHOCYTE
REPERTOIRE IN HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS**

Márden Estêvão Mattos Júnior¹; Marcos Vinicius da Silva¹; Thiago Alvares da Costa¹;

Fernanda Bernadelli de Vito²; Virmondes Rodrigues da Silva Júnior^{1, 3, *}

¹Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba 38025-180, MG, Brazil; marden.professor@uniatenas.edu.br; marcos.silva@uftm.edu.br; thiagoac1@outlook.com.

²Hematological Research Laboratory, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba 38025-180, MG, Brazil; fernanda.vito@uftm.edu.br.

³Department of Immunology, Medical School, University of Uberaba, Uberaba 38010-200, MG, Brazil.

* Correspondence: virmondes.rodrigues@uftm.edu.br; Tel.: +55-34-99198-0249.

Support: This study was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Brazil - Financial Code 001.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a chronic systemic infectious disease affecting organs of the mononuclear phagocytic system, caused by a trypanosomatid of the genus *Leishmania*. In recent years, it has become a serious public health problem, and when left untreated, it can be fatal. To contain the progression of the disease caused by the intracellular parasite, an immune response with a predominantly Th1 profile is necessary. However, other response profiles (Th2, Treg, and Th17) can establish a regulatory environment, interfering with the prognosis. The study evaluated the immunological behavior of treated patients and control individuals from

endemic areas through phenotypic and functional analysis of the T lymphocyte repertoire. The results demonstrated a strong positive correlation between T lymphocyte populations expressing molecules (CD27 and CD28) in both analyzed groups, also observed in populations of T cells expressing the PD-1 molecule. Among memory TCD8⁺ lymphocyte populations (CD8⁺ CD127^{high} CXCR-3⁺) and exhausted TCD8⁺ lymphocyte populations (CD8⁺ CD127^{low} TIM-3⁺), a strong positive correlation was also evident in both analyzed groups. The correlation between regulatory T cells (Treg) and populations of TCD4⁺ (CD27⁺ and CD28⁺) and TCD8⁺ (CD27⁺ and CD28⁺) lymphocytes demonstrated a positive correlation only in the treated patient group. It is concluded that there may be a balanced environment, constituted by different populations of T cells, both by the expression of co-stimulatory molecules in memory populations and by the expression of exhaustion molecules and the presence of Treg lymphocyte populations, mainly in the treated patient group, enabling the individual to control the progression of the disease or clinically recover after treatment.

Keywords: Visceral leishmaniasis; Immune response; Phenotypic analysis; T lymphocyte repertoire; Functional analysis.

INTRODUCTION

Leishmaniasis are anthroponosis representing a group of tropical diseases with a wide clinical diversity, caused by different species of protozoa from the genus *Leishmania*. They are vector-borne diseases transmitted by various species of female sandflies, with several animals serving as wild or domestic reservoirs, with dogs being of major relevance in urban environments.⁽²⁹⁾

Visceral leishmaniasis (VL), also known as *Kalazar*, is considered the most severe clinical form, caused by the protozoan species *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*,

the latter being observed in countries of the Old World (East Africa, Bangladesh, India, and Nepal). It is clinically characterized by irregular periods of fever, weight loss, hepatosplenomegaly, and anemia with pancytopenia.⁽¹⁸⁾

In the Americas, approximately 90% of human cases have been recorded in Brazil, where there has been a progressive increase in the number of notifications over the last 20 years. This increase is due to several factors, including population growth with migration to the outskirts of large cities and the absence of sanitary and housing structures, directly impacting the quality of life associated with the increasing number of domestic animals, mainly dogs. Visceral leishmaniasis has been occurring in an endemic-epidemic manner, presenting different transmission patterns, constituting a significant public health problem due to its epidemiological magnitude and high vulnerability to control measures.⁽¹⁸⁾

Cellular immunity is the prime mechanism responsible for controlling infection; in contrast, the profile of the immune response directed by cytokine production must be appropriate. T cells are a crucial point in the immune system when it comes to infections caused by intracellular microorganisms and are capable of differentiating into various forms according to the cytokine profile produced.⁽¹⁴⁾

The importance of a balanced cellular immune response, evidenced by the intensification of cytokine production by Th1 cells, in protection against *Leishmania* is well known in humans, and there is strong evidence suggesting that IFN- γ is involved in the regulation during infection. The stability of the clinical condition after infection and the possible control of VL entirely depend on cellular immunity, particularly the Th1 response, initiated by the production of IL-12 by dendritic cells and macrophages.⁽²⁴⁾

IL-10 appears to be the primary cytokine with inhibitory action in macrophages and perform a potential antagonistic role in the presence of IFN- γ . Individuals with VL show increased mRNA expression of IL-10 in the bone marrow and in cells from lymph nodes, as

well as high levels of IL-10 in supernatants of PBMCs stimulated by *L. infantum* antigen.⁽⁸⁾ On the other hand, active VL also correlates with levels of IFN- γ , IL-2, IL-10, and IL-4. After cure, levels of IFN- γ , IL-4, and IL-10 persist, suggesting a coexistence of Th1 and Th2 responses in individuals with VL as well as those who have recovered.⁽⁵⁾

The action of Th2 cells and Tregs, producers of IL-10 and TGF- β , during VL, facilitates the survival of the parasite and promotes the suppression of the immune response.⁽¹⁴⁾ Gantt et al. reported that some factors derived from the parasite may facilitate the conversion of latent TGF- β into active TGF- β .⁽⁹⁾

In human VL caused by *L. donovani*, TCD8⁺ cells producing perforins and granzymes and high levels of IFN- γ conferred protection against the parasite.⁽¹⁴⁾ Previous studies in patients with VL showed that TCD8⁺ cells exhibiting an exhausted phenotype, characterized by high levels of expression of IL-10, CTLA-4, and PD-1, decreased after antiparasitic drug treatment.⁽²⁵⁾

The TIM-3 molecule is considered an immune “checkpoint” expressed on the cell surface of many lymphocyte populations, capable of inducing apoptosis or suppressing responses in Th1 and Th17 cells, which may interfere with parasitic control.⁽²⁵⁾

Although, this study aims to analyze the immunological behavior of treated patients and controls from endemic areas through immunophenotyping in the repertoire of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes, based on the expression of surface molecules that may modulate different response profiles during contact with the parasite.

MATERIALS AND METHODS

CASE SERIES

The study was conducted in the municipality of Paracatu, located in the northwest of the state of Minas Gerais (**Figure 1**), Brazil. It has a population of 94,017 inhabitants⁽³⁾ and has

presented epidemiologically significant numbers of canine and human cases. In total, from 2010 to 2020, 104 human cases were recorded.⁽¹⁷⁾

Patients treated for visceral leishmaniasis (VL) between 2014 and 2019 and asymptomatic individuals from the same endemic area were selected, totaling 21 participants. The individuals were divided into two groups:

Subjects treated for visceral leishmaniasis (LV) (n=10)

Subjects who presented clinical symptoms of VL, confirmed by parasitological or serological methods associated with specific therapeutic response after treatment and clinical cure. All evaluated patients were from the municipality of Paracatu, Minas Gerais.

Asymptomatic subjects with negative serology (controls) (n=11)

Subjects from the same endemic area as the subjects treated for VL, without clinical characteristics or history of treatment for leishmaniasis, with negative serology (Kalazar Detect™ - InBios).

As blood samples were collected between January and December 2019 following approval from the Research Ethics Committee of the Federal University of Triângulo Mineiro - UFTM, with protocol number 1,846,584. The participants, including parents or guardians of minors, were interviewed and informed. After agreeing to participate in the study, upon signing the informed consent form (ICF), a clinical-laboratory evaluation of the treated patients was conducted based on their medical records. Blood samples were collected using Vacutainer® system tubes with anticoagulant (*Ethylendiamine tetraacetic acid* - EDTA) and processed *ex vivo* according to a protocol for flow cytometry immunophenotyping.

The inclusion criteria for treated patients were: positive serological test by Indirect Immunofluorescence (IFI > 1:40) or positive in the Kalazar Detect™ - InBios test, demonstration of the parasite in bone marrow smear after puncture, or symptom remission after treatment according to the protocol indicated for each case. Treated patients and controls from the endemic area with autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases, HIV-positive status, or any immunodeficiencies were excluded from the study.

OBTAINMENT OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS THROUGH AN *EX VIVO* PROTOCOL

Each subject in the experiment underwent blood sample collection via peripheral venous access. After puncture, using vacuum tubes containing EDTA anticoagulant, each participant contributed four tubes of 4mL or approximately 16mL of total blood. They were transported in a thermal box to the support laboratory located on the campus of - Athens University Center - UniAtenas, in Paracatu, MG, and the samples were carefully added to 15mL plastic tubes containing 6mL of Ficoll-Hypaque®. The tubes were centrifuged carefully at 400g for 30 minutes at room temperature.

After centrifugation, the tubes were carefully removed from the centrifuge, and the patients' plasma was pipetted into microtubes, then stored at -20°C. The layer of peripheral blood mononuclear cells was collected in a new 15mL plastic tube, and 10mL of 1% FBS Hank's solution was added, followed by centrifugation at 400g for 10 minutes at room temperature. The supernatant from each tube was discarded, and the sediment was resuspended, with an additional 5mL of 1% FBS Hank's solution added. The tubes were centrifuged again at 400g for 10 minutes at room temperature. The supernatant from the centrifuged tubes was

resuspended, and to the cell sediment, an additional 10mL of 1% FBS Hank's solution was added.

FLOW CYTOMETRY IMMUNOPHENOTYPING

After cell separation, the cells were counted using a Neubauer chamber, with 5×10^5 cells distributed per cytometry tube. The tubes were centrifuged at 600g for 5 minutes at 4°C, discarding the supernatant from the centrifuged tubes and resuspending the cell sediment. Then, 100µL of PBS 10% AB human serum, Rh positive, inactivated, was added to each tube, which were then incubated for 30 minutes at 4°C.

After incubation, the respective antibodies were added to each tube at the dilution indicated by the manufacturer (BD Pharmingen™) according to Table 1. A tube without antibody pipetting, called "blank," was used as a control, and in each tube, the respective isotypes (BD Pharmingen™) were pipetted according to the analyzed molecules for compensation.

After incubation for 30 minutes at 4°C in the dark, the sediments were resuspended, and an additional 3mL of 1% FBS Hank's solution was added. The tubes were then centrifuged at 600g for 5 minutes at 4°C. Finally, the supernatant from the centrifuged tube was discarded, and the cell sediment was resuspended by adding 250µL of 2% paraformaldehyde. The tubes were kept at 4°C in the dark until reading on the flow cytometer (BD FACSCanto™ II).

The acquisition of 50,000 events per tube was visualized using CellQuest software (BD Biosciences, USA), and the acquisition analysis observed in figure 2 (I-III), figure 3 (IV-VI), figure 6 (M) and figure 7 (P) was performed using FlowJo version 10.6.1 software (BD Biosciences, USA). A gate was performed evaluating cell size (forward scatter - FSC) and granularity (side scatter - SSC) to identify lymphocytes. The panel of analyzed molecules and

their respective fluorescence in the different tubes are represented in **Table 1**. The following cell populations were analyzed according to CD (cluster of differentiation): CD4, CD8, CD27, CD28, CD127, CD25, CD183 (CXCR-3), CD366 or TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), CD279 or PD-1 (programmed cell death protein-1), and LAP (latency-associated peptide).

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using the software programs STATVIEW (ABACCUS-USA), GRAPHPAD PRISM 5.0 (GRAPHPAD SOFTWARE – USA), and EXCEL 2010 for WINDOWS (MICROSOFT, USA). Correlation analyses were performed using the Spearman's rank correlation test. Values of p and r were determined by the Spearman correlation test, where r expresses the correlation coefficient. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF ACTIVATION AND EXHAUSTION MARKERS IN TCD4⁺ CELLS

During flow cytometry immunophenotyping, cells were labeled to assess the percentage of TCD4⁺ lymphocytes regarding cellular activation by the CD27 molecule (member of the tumor necrosis factor superfamily receptor - TNF) and CD28 (receptor for CD80 - B7.1 and CD86 - B7.2 present on APCs), and the percentage of TCD4⁺ lymphocytes regarding cellular exhaustion, represented in this analysis by the PD-1 molecule (programmed death-ligand-1).

After statistical analysis by Spearman correlation test between populations of TCD4⁺ lymphocytes PD-1⁺ and TCD4⁺ lymphocytes CD27⁺ in the groups of treated patients and controls, a positive and statistically significant correlation was observed between both populations, with $r=0.686$ and $p=0.002$ (**Figure 2A**).

However, the analysis between populations of TCD4⁺ lymphocytes PD-1⁺ and TCD4⁺ lymphocytes CD28⁺ in the groups of treated patients and controls showed a weak positive correlation between them, which was not statistically significant ($r=0.244$ and $p=0.275$) (**Figure 2B**).

Finally, two populations of TCD4⁺ lymphocytes were compared by the expression of co-stimulatory molecules in the groups of treated patients and controls, represented by TCD4⁺ lymphocytes CD27⁺ and TCD4⁺ lymphocytes CD28⁺, showing a positive correlation between them, which was statistically significant ($r=0.647$ and $p=0.0038$) (**Figure 2C**).

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF ACTIVATION AND EXHAUSTION MARKERS IN TCD8⁺ CELLS

TCD8⁺ lymphocytes were also evaluated for the expression of activation molecules (CD27 and CD28) and exhaustion molecule (PD-1) through flow cytometry immunophenotyping.

After statistical analysis by Spearman correlation test between populations of TCD8⁺ lymphocytes CD27⁺ and TCD8⁺ lymphocytes PD-1⁺ in the groups of treated patients and controls, a weak positive correlation was observed, which was not statistically significant, however, indicating a strong tendency ($r=0.422$ and $p=0.059$) (**Figure 3D**).

The analysis conducted between the populations of TCD8⁺ lymphocytes CD28⁺ and TCD8⁺ lymphocytes PD-1⁺ in the groups of treated patients and controls showed a weak positive correlation, which was not statistically significant ($r=0.204$, $p=0.361$) (**Figure 3E**).

In contrast, the analysis conducted between the populations of TCD8⁺ lymphocytes CD27⁺ and TCD8⁺ lymphocytes CD28⁺ in the groups of treated patients and controls showed a positive correlation that was statistically significant ($r=0.500$, $p=0.0253$) (**Figure 3F**).

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF ACTIVATION AND EXHAUSTION MARKERS BETWEEN TCD4⁺ AND TCD8⁺ CELLS

Statistical analysis was performed by Spearman correlation test comparing populations of TCD4⁺ and TCD8⁺ cells regarding the expression of activation molecules (CD27 and CD28) and exhaustion molecule (PD-1).

After analysis between populations of TCD4⁺ TCD27⁺ and TCD8⁺ CD27⁺ lymphocytes in the treated patient and control groups, a strong positive correlation was observed, which was statistically significant ($r=0.882$, $p<0.0001$), demonstrating the important role of this co-stimulatory molecule (CD27) in activated populations in both TCD4⁺ and TCD8⁺ cells (**Figure 4G**).

The analysis between populations of TCD4⁺ CD28⁺ and TCD8⁺ CD28⁺ lymphocytes in the treated patient and control groups also showed a strong positive correlation, which was statistically significant ($r=0.787$, $p=0.0004$) (**Figure 4H**).

After the analysis between populations of TCD4⁺ PD-1⁺ and TCD8⁺ PD-1⁺ lymphocytes in the treated patient and control groups, a strong positive correlation was also observed, which was statistically significant ($r=0.821$, $p=0.0002$) (**Figure 4I**).

ANALYSIS OF MEMORY AND EXHAUSTION MARKERS EXPRESSION IN TCD8⁺ CELLS PERFORMED.

The profile of memory TCD8⁺ lymphocytes were evaluated for the presence of the molecules CD127 and CXCR-3, and again, the profile of TCD8⁺ lymphocyte populations in exhaustion was evaluated, this time for the presence of the molecules CD127 and TIM-3. During the flow cytometry immunophenotyping analysis, the memory TCD8⁺ lymphocyte populations were separated into CD8⁺ CD127^{high} CXCR-3⁺, and the exhausted TCD8⁺ lymphocyte populations were separated into CD8⁺ CD127^{low} TIM-3⁺.^(19,13,7,4)

After performing the correlation analysis using the Spearman test between the TCD8⁺ memory lymphocyte populations and the TCD8⁺ exhausted lymphocyte populations in the treated and control groups, a statistically significant positive correlation was observed between the analyzed populations ($r=0.591$; $p=0.0082$) (**Figure 5J**).

ANALYSIS OF ACTIVATION MARKER EXPRESSION IN TCD4⁺, TCD8⁺ AND REGULATORY T CELLS

The comparative analysis was conducted on the populations of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes, regarding the presence of CD27 and CD28 molecules, and on regulatory T cell (Treg) populations, regarding the presence of the interleukin-2 receptor alpha subunit or CD25 and latency-associated peptide (LAP). During flow cytometry immunophenotyping, the activated TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocyte populations were separated into CD4⁺ CD27⁺/CD4⁺ CD28⁺ and CD8⁺ CD27⁺/CD8⁺ CD28⁺ subsets, respectively, while the Treg cell population was separated into CD4⁺ CD25⁺ LAP⁺ subset.

After the correlation analysis by Spearman's test between populations of TCD4⁺ CD27⁺ lymphocytes and Treg populations in the treated patient group, a positive and statistically significant correlation was observed among the individuals analyzed ($r=0.685$, $p=0.0399$). In contrast, no positive and statistically significant correlation was observed between the treated patient and control groups (**Figure 6K**). Conversely, after the analysis between populations of TCD4⁺ CD28⁺ lymphocytes and Treg populations in the treated patient group, a positive correlation was observed, but it was not statistically significant ($r=0.636$, $p=0.0563$). Similarly, no positive and statistically significant correlation was observed after Spearman's test analysis between the treated patient and control groups (**Figure 6L**).

Between populations of TCD8⁺ CD27⁺ lymphocytes and Treg populations in the treated patient group, a strongly positive and statistically significant correlation was evident among the analyzed individuals ($r=0.879$, $p=0.0084$). Although, it was not statistically significant after the analysis in both patient groups simultaneously (**Figure 6N**).

The same analysis conducted between populations of TCD8⁺ CD28⁺ lymphocytes and Treg populations in the treated patient group also showed a positive correlation, which was statistically significant ($r=0.721$, $p=0.0305$). However, a positive correlation was not observed and was not statistically significant after analysis in both groups (**Figure 6O**).

DISCUSSION

CD28 is a co-stimulatory molecule expressed in populations of naive T cells and activated T cells, correlating with pro-inflammatory or anti-inflammatory signals, potentially favoring the proliferation and differentiation of T cells with suppressive functions in regulatory T cell (Treg) populations.⁽²⁾ The results showed a strong positive correlation between populations of CD4⁺ CD28⁺ and CD8⁺ CD28⁺ T cells ($r=0.787$) in both treated patient and

control groups, which was statistically significant ($p=0.0004$), indicating the possible role of this molecule (CD28) during cellular activation and differentiation processes in helper and cytotoxic T cells (**Figure 4H**). A similar correlation was observed between populations of CD4⁺ CD27⁺ and CD8⁺ CD27⁺ T cells in both treated patient and control groups, showing a strong positive correlation ($r=0.882$) that was statistically significant ($p<0.0001$) (**Figure 4G**). In contrast, CD27/CD70 co-stimulation potentiates immunity by activating T cells, increasing clonal expansion, and differentiation of antigen-specific memory cytotoxic T cells (CD8⁺).⁽²⁶⁾

When comparing populations of TCD4⁺ CD28⁺ and TCD4⁺ PD-1⁺ cells in both treated patient and control groups using the Spearman test, a weak positive correlation ($r=0.244$) was demonstrated, which was not statistically significant ($p=0.275$), despite PD-1 being part of the CD28 family and considered an inhibitory receptor that promotes cellular exhaustion in T cells.⁽²⁾ (**Figure 2A**).

Although, between the populations of TCD4⁺ CD27⁺ and TCD4⁺ PD-1⁺ cells in both treated patient and control groups, there was a positive correlation ($r=0.686$), which was statistically significant ($p=0.002$) (**Figure 2B**). Knowing that the CD27 molecule provides co-stimulatory signals for naive T cells and its expression is temporarily increased on the cell surface after stimulation via the TCR (T cell receptor), it becomes an important mechanism in the formation of antigen-specific memory T cells and in the survival of T cells after activation.⁽²⁷⁾

The correlation between populations of TCD4⁺ CD27⁺ and TCD4⁺ PD-1⁺ cells possibly demonstrate a regulatory mechanism that leads to a balanced environment, with varying degrees of inflammatory activity as inhibitory molecules may help in this balance. This is related to the individual's immune behavior and variables such as frequent contact with the parasite in endemic regions. Although the PD-1/PD-L1 or PD-L2 pathway plays a role in regulation

involving the magnitude of the immune response, it may limit protective immunity against persistent antigens, a response observed both in cancer and chronic infection.⁽²⁰⁾

According to Costa-Madeira et al., persistent exposure to antigens in endemic areas or chronic inflammation can alter various functions of T cells, especially memory cells, a process known as cellular exhaustion⁽⁶⁾. Rodrigues et al. reported that TCD8⁺ lymphocytes subjected to continuous antigenic stimulation can differentiate into central memory T cells (T_{CM}), which secrete IL-2, TNF- α , and IFN- γ .⁽²²⁾ These T_{CM} cells can further differentiate into effector memory T cells (T_{EM}) that produce both TNF- α and IFN- γ , and ultimately into single producers of IFN- γ , which may undergo apoptosis, similar to what happens with TCD4⁺ lymphocytes when antigenically stimulated persistently.⁽²²⁾

Garcia de Moura et al. reported that patients infected with *L. braziliensis* showed increased expression of exhaustion markers in TCD4⁺ cells and TCD8⁺ cells in both the skin and bloodstream.⁽¹⁰⁾ However, the extent of the lesion is not related to the expression of inhibitory molecules such as PD-1, suggesting that exhausted T cells do not interfere with the pathogenesis of tegumentary disease. In contrast, our results showed a strong correlation by Spearman's test between populations of TCD4⁺ PD-1⁺ cells and TCD8⁺ PD-1⁺ cells ($r=0.821$) in both treated and control groups, which was statistically significant ($p=0.0002$) (**Figure 4I**), possibly indicating the presence of helper and cytotoxic T cell populations undergoing exhaustion in the studied groups.

The persistence of residual parasites, partly controlled by TCD4⁺ CD25⁺ cells, after *L. major* infection with spontaneously healing lesions, appears to be crucial for maintaining short-lived effector TCD4⁺ cells, protecting the individual from reinfection. This protection is lost when parasites are controlled, suggesting that antigen persistence is necessary for lasting immunity, although it may induce an exhaustion phenotype in antigen-specific cells.⁽⁶⁾

In VL, the persistence of parasites within infected cells promotes dysfunction in the response of TCD8⁺ cells, which stimulates parasite survival and replication. Although TCD8⁺ cells are increased in the blood and lesions of chronically infected patients, individuals with severe VL exhibit impaired cell proliferation and cytokine production such as IL-2 and IFN- γ by these cells.^(25,6) According to Gautam et al., the presence of the parasite for a long period induces exhaustion of TCD8⁺ cells, generating cells with limited capacity to produce IFN- γ , ultimately leading to cell death.⁽¹¹⁾

Conversely, our results did not show a positive correlation between populations of TCD8⁺ cells expressing CD27⁺ and PD-1⁺ ($r=0.422$, $p=0.059$) (**Figure 3D**), nor between populations of TCD8⁺ cells expressing CD28⁺ and PD-1⁺ ($r=0.204$, $p=0.361$) (**Figure 3E**), in both treated and control groups.

However, the evaluation by the Spearman test revealed a positive, statistically significant correlation between populations of TCD4⁺ cells expressing CD27⁺ and CD28⁺ ($r=0.647$, $p=0.0038$) (**Figure 2C**), and between populations of TCD8⁺ cells expressing CD27⁺ and CD28⁺ ($r=0.500$, $p=0.0253$) (**Figure 3F**), demonstrating a strong trend for both populations of T cells to express molecules with co-stimulatory action, acting in cellular activation processes during the modulation of an efficient immune response in both cured patients and control patients from endemic areas.

The involvement of TCD8⁺ cells has been considered not only in protection, natural resistance, and cure but also in the immunopathogenesis of human VL. When naive TCD8⁺ cells are activated, they can exhibit three distinct behaviors: they can secrete TNF- α and IFN- γ , release cytotoxic granules, or induce apoptosis in infected cells through the Fas/FasL pathway.⁽²²⁾

During *L. donovani* infection, TCD8⁺ cells have been shown to provide resistance early on and during the dissemination of infection by secreting IFN- γ , perforin, and granzyme. Cured

and asymptomatic patients exhibited higher proportions of TCD8⁺ cells. Furthermore, cured patients had higher levels of TNF- α and IFN- γ , higher proportions of activated TCD8⁺ cells, and increased levels of granzymes.⁽²²⁾

Singh et al. reported that the gene expression of IL-10 in TCD8⁺ lymphocytes was more pronounced in patients with VL compared to the same population after drug treatment, suggesting similar mechanisms may exist for the transcriptional regulation of IL-10 in both TCD8⁺ and TCD4⁺ lymphocytes.⁽²⁵⁾ According to Mesquita et al., IL-10 has the ability to diminish the inflammatory potential against Leishmania, promoting visceral infection by compromising the Th1 response pattern and reducing host phagocytic activity.⁽¹⁶⁾

Effector memory T cells (T_{EM}) constitute a subset of memory cells ready for rapid effector responses, such as target cell cytolysis upon antigen recognition. T_{EM} cells express high levels of cytolytic molecules, such as granzyme B and perforin.⁽⁴⁾ Conversely, according to Rodrigues et al. T_{EM} cells may undergo apoptosis.⁽²²⁾ Typically, T_{EM} cells are considered to have low or absent expression of CD28, CD27, CD127, and high levels of effector mediators, whereas most central memory TCD8⁺ cells (T_{CM}) express the CXCR3 molecule. While T_{EM} cells disappear upon infection clearance, T_{CM} cells persist, suggesting that these cells may serve as markers of VL cure.⁽⁴⁾

Populations expressing CD28 also exhibited high levels of CD127 and low levels of effector mediators, such as granzyme B, suggesting that these cells are more akin to central memory T cells (T_{CM}).⁽⁴⁾ According to the findings, the profile of memory TCD8⁺ lymphocytes regarding the presence of CD127 and CXCR-3 molecules was evaluated, and correlation analysis was performed using *Spearman's* test between memory TCD8⁺ lymphocyte populations (CD8⁺ CD127^{high} CXCR-3⁺) and exhausted TCD8⁺ lymphocyte populations (CD8⁺ CD127^{low} TIM-3⁺) in treated and control groups, revealing a statistically significant positive correlation ($r=0.591$, $p=0.0082$) (Figure 5J). According to Gorman & Colgan, it is known that

the inhibitory molecule TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain 3) is expressed on exhausted TCD8⁺ lymphocytes, with its ligand being galectin-9 expressed on various cells.⁽¹²⁾ When activated, the complex is capable of inducing apoptosis in the cell expressing the TIM-3 molecule. Therefore, based on our results, there is a possible trend of central memory TCD8⁺ cell populations entering exhaustion or undergoing cellular apoptosis according to the immunological behavior in treated patients and endemic area controls, reducing pro-inflammatory activity related to cytokine production.⁽³⁰⁾

Regulatory T cells (TCD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) are widely known as maintainers of tolerance and homeostasis with a preventive action against damage during the inflammatory process, producing cytokines IL-10 and TGF- β primarily.⁽¹⁾ IL-10 plays a central role in the course of the immune response present in VL, contributing to the chronicity of the disease through mechanisms that compromise the migration and activation of leukocytes by metabolites such as prostaglandins (E and J) and adenosine. Adenosine, for example, reduces the production of pro-inflammatory cytokines, decreases nitric oxide, and induces the synthesis of IL-10.⁽²¹⁾

There may be failures in the balance between different profiles of immune response in the balanced production of cytokines necessary for the control of Leishmania infection, especially during prolonged exposure to the parasite. Excessive production of IL-10 can reduce Th1 cell activity, decreasing macrophage action by reducing IFN- γ production. This level of disease can be evidenced by high antibody titers produced during laboratory investigation. However, a reduction in Th1 cell stimulation, associated with increased humoral response, can result in T cell exhaustion and parasite survival.⁽²⁸⁾

According to Peixoto et al., a significant increase in the frequency of Treg cells (TCD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺) in groups of patients with VL, regardless of antigenic stimulation, was observed, which may suggest an attempt to modulate the established immune response in the disease.⁽²¹⁾ In contrast, in the absence of antigenic stimulation, a decrease in the frequency of

IL-10 produced by Treg cells in patients with VL was observed compared to the control group. However, IL-10 production was restored by Treg cells after antigenic stimulation. It is known that peripheral Treg cells are capable of responding rapidly in cases of antigenic reexposure, producing IL-10 amounts, restoring immune balance.⁽²³⁾

After analysis using the Spearman test, our results showed a positive correlation ($r=0.685$), statistically significant ($p=0.0399$), between populations of TCD4⁺ CD27⁺ cells and Treg cells (CD4⁺ CD25⁺ LAP⁺) (**Figure 6K**) in the treated patient group, but not in the control group. Similarly, a positive correlation ($r=0.636$) was observed between populations of TCD4⁺ CD28⁺ cells and Treg cells (CD4⁺ CD25⁺ LAP⁺) (**Figure 6L**) in the treated patient group. This indicates a strong tendency for activated TCD4⁺ lymphocyte populations to act concomitantly with regulatory T cells, which in turn interfere with the production of pro-inflammatory cytokines such as INF- γ , contributing to the necessary balance for clinical cure of the disease.

This trend was also observed between populations of TCD8⁺ CD27⁺ lymphocytes and Treg cells (CD4⁺ CD25⁺ LAP⁺) after analysis using the Spearman test, which showed a strong positive correlation ($r=0.879$), statistically significant ($p=0.0084$) in the treated patient group (**Figure 7N**), and between populations of TCD8⁺ CD28⁺ cells and Treg cells (CD4⁺ CD25⁺ LAP⁺), also demonstrating a positive correlation ($r=0.721$), statistically significant ($p=0.0305$) in the treated patient group (**Figure 7O**). This indicates the possibility of Treg cells interfering with cytotoxic activity involving the production of INF- γ by antigen-specific TCD8⁺ cell populations.

Conversely, regulatory T cells have been shown to be indispensable for maintaining homeostasis, establishing a balance in controlling parasitic growth and preventing inflammatory exacerbation, thereby reducing damage and alleviating symptoms.⁽¹⁵⁾

ACKNOWLEDGEMENTS

To Athens University Center - UniAtenas, represented by Prof. Delander Neiva, for providing the necessary infrastructure for the assays preceding the flow cytometry analysis.

CONFLICT OF INTERESTS

There is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bahrami, F. et al. FOXP3 expression and frequency of regulatory T cells in healed individuals from Leishmania major infection and the asymptomatic cases. Human immunology. 2014; 75(10): 1026-1033.
2. Bănică, L. et al. Exhaustion and senescence of CD4 and CD8 T cells that express co stimulatory molecules CD27 and CD28 in subjects that acquired HIV by drug use or by sexual route. Germs. 2021. 11(1): 66.
3. Brazilian Institute of Geography and Statistics - IBGE [database on the Internet]. 2022 Brazilian census. c2022. [cited 2023 Mar 18]. Available from: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/paracatu.html>.
4. Brummelman, J; Pilipow, K; Lugli, E. The single-cell phenotypic identity of human CD8+ and CD4+ T cells. International review of cell and molecular biology. 2018. 341(1): 63-124.

5. Caldas, A. et al. Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC infectious diseases*. 2005. 5(1): 113.
6. Costa-Madeira, J. et al. T Lymphocyte Exhaustion During Human and Experimental Visceral Leishmaniasis. *Front. Immunol.* 2022. 13(1): 835711.
7. Cox, M.; Kahan, S; Zajac, A. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology*, 2013. 435(1): 157-169.
8. D'oliveira JA, Costa SRM, Barbosa AB, Orge MGO, Carvalho EM. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1997. 92: 15-20.
9. Gantt, K. R.; Schultz-Cherry, S.; Rodriguez, N.; Jeronimo, S. M. B.; Nascimento, E. T.; Goldman, T. L.; Recker, T. J.; Miller, M. A.; Wilson, M. E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *The Journal of Immunology*. 2003. 170(5): 2613–2620.
10. Garcia de Moura R, Covre LP, Fantecelle CH, Gajardo VAT, Cunha CB, Stringari LL, et al. PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2021. 12: 632-667.

11. Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2014. 209(2): 290–9.
12. Gorman, JV; Colgan, J D. Regulation of T cell responses by the receptor molecule Tim-3. *Immunologic research.* 2014. 59: 56-65.
13. Groom, JR; Andrew DL. "CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions." *Immunology and cell biology.* 2011. 89(2): 207-215.
14. Jawed, JJ; Dutta, S; Majumdar, S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019. 117: 109098.
15. Lees, JR. CD8+ T cells: The past and future of immune regulation. *Cellular immunology.* 2020. 357: 104212.
16. Mesquita, I et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2018. 112: 16-20, 2018.
17. Ministry of Health (MH). DATASUS. Tabnet. Brasília, DF: 16. Ministry of Health, 2022. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/>.
18. Pan American Health Organization (PAHO). Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. c2020 - [cited 2022 Dez 5]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>.

19. Parish, IA.; Kaech, SM. Diversity in CD8+ T cell differentiation. *Current opinion in immunology*. 2009. 21(3): 291-297.
20. Patsoukis, N et al. Revisiting the PD-1 pathway. *Science advances*. 2020. 6(38): eabd2712.
21. Peixoto, RF. et al. Characterization of Regulatory T Cells in Patients Infected by *Leishmania Infantum*. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2022. 8(1): 18.
22. Rodrigues, LS et al. Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8^{High} T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*. 2021. 12: 773983.
23. Rosenblum, MD.; Way, SS; Abbas, AK. Regulatory T cell memory. *Nature Reviews Immunology*. 2016. 16(2): 90-101.
24. Samant, M et al. Role of cytokines in experimental and human visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021. 11: p. 624009.
25. Singh, B et al. A molecular signature for CD8+ T cells from visceral leishmaniasis patients. *Parasite immunology*. 2019. 41(11): e12669.
26. Starzer, AM.; Berghoff, AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO open*. 2019. 4: e000629.

27. Tanaskovic, S et al. Impaired upregulation of the costimulatory molecules, CD27 and CD28, on CD4+ T cells from HIV patients receiving ART is associated with poor proliferative responses. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2017. 33(2): 101-109.
28. Toepp, AJ.; Petersen, CA. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in veterinary science*, 2020. 130: 19-25.
29. Van Griensven, J; Diro, E. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infectious Disease Clinics*. 2019. 33(1): 79-99.
30. Zhao, L et al. TIM-3: An update on immunotherapy. *International Immunopharmacology*. 2021. 99: 107933.

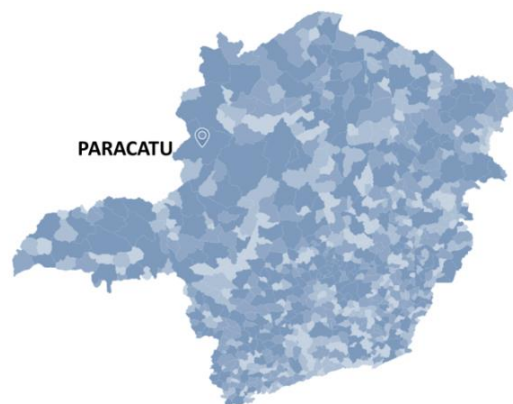
Supplemental material

Table 1: Panel of T cell surface molecules and their respective fluorochromes according to the concentrations used and their functions.

	Molecules	Fluorochromes	Isotypes	Dilution	Function
Tube 6	CD25 (IL-2RA)	FITC	MsIgG1, k	1:12	Activation and Treg T helper Treg (TGF- β)
	CD4	PeCy-7	MsIgG1, k	1:120	
	LAP	Alexa 647	MsIgG1, k	1:120	
Tube 5	CD8	BB515	MsIgG1, k	1:60	T cytotoxics Exhaustion Activation and memory Memory
	TIM-3 (CD366)	PE	MsIgG1, k	1:120	
	CXCR-3 (CD183)	PeCy-7	MsIgG1, k	1:24	
	CD127 (IL-7R α)	Alexa 647	MsIgG1, k	1:6	
Tube 4	CD8	BB515	MsIgG1, k	1:60	T cytotoxics Exhaustion Co-stimulatory Co-stimulatory
	PD-1	PE	MsIgG1, k	1:24	
	CD27	PeCy-7	MsIgG1, k	1:120	
	CD28	APC	MsIgG1, k	1:24	
Tube 3	CD27	FITC	MsIgG1, k	1:24	Co-stimulatory Exhaustion T helper Co-stimulatory
	PD-1	PE	MsIgG1, k	1:24	
	CD4	PeCy-7	MsIgG1, k	1:120	
	CD28	APC	MsIgG1, k	1:24	
Tube 2	Isotype	FITC	MsIgG1, k	1:60	Control
Tube 1	White	-	-	-	Control

Source: Developed by the author, 2019. BB515, Brilliant Blue 515; PE, Phycoerythrin; PE-Cy7, Phycoerythrin Cyanine 7; APC, Allophycocyanin; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; Alexa 647.

Figure 1: Study Area



Source: Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2022.

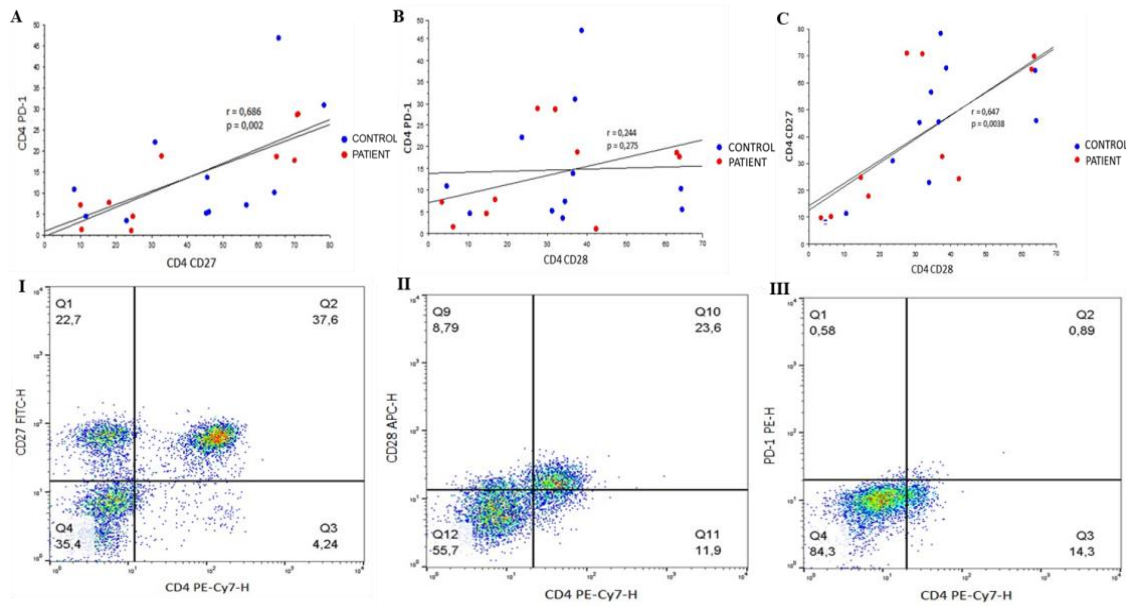


Figure 2: Evaluation of TCD4⁺ lymphocyte populations regarding the expression of PD-1, CD27, and CD28 molecules. (A) Correlation between populations of TCD4⁺ lymphocytes PD-1⁺ and TCD4⁺ lymphocytes CD27⁺, in the groups of treated patients and controls. (B) Correlation between populations of TCD4⁺ lymphocytes PD-1⁺ and TCD4⁺ lymphocytes CD28⁺, in the groups of treated patients and controls. (C) Correlation between populations of TCD4⁺ lymphocytes CD27⁺ and TCD4⁺ lymphocytes CD28⁺, in the groups of treated patients and controls. (I) Selection of CD4⁺ CD27⁺ cells (Q2). (II) Selection of CD4⁺ CD28⁺ cells (Q10). (III) Selection of CD4⁺ PD-1⁺ cells (Q2). Values of p and r determined by the Spearman correlation test, where r expresses the correlation coefficient. Considered significant at $p < 0.05$.

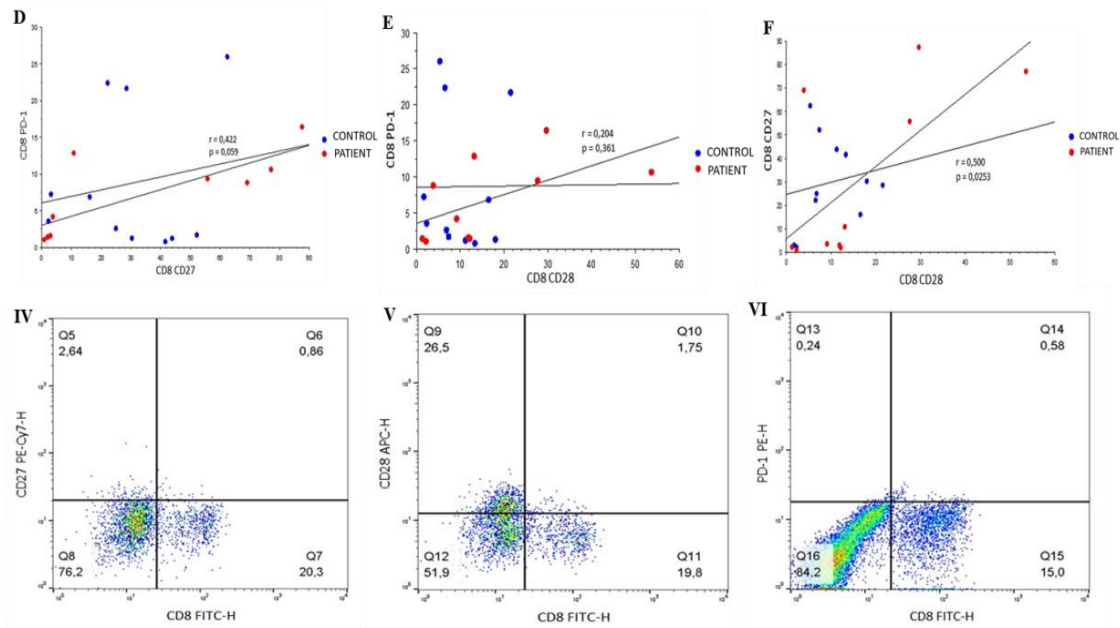


Figure 3: Evaluation of TCD8⁺ lymphocyte populations regarding the expression of PD-1, CD27, and CD28 molecules. (D) Correlation between populations of TCD8⁺ lymphocytes PD-1⁺ and TCD8⁺ lymphocytes CD27⁺, in the groups of treated patients and controls. (E) Correlation between populations of TCD8⁺ lymphocytes PD-1⁺ and TCD8⁺ lymphocytes CD28⁺, in the groups of treated patients and controls. (F) Correlation between populations of TCD8⁺ lymphocytes CD27⁺ and TCD8⁺ lymphocytes CD28⁺, in the groups of treated patients and controls. (IV) Selection of CD8⁺ CD27⁺ cells (Q6). (V) Selection of CD8⁺ CD28⁺ cells (Q10). (VI) Selection of CD8⁺ PD-1⁺ cells (Q14). Values of p and r determined by the Spearman correlation test, where r expresses the correlation coefficient. Considered significant at $p < 0.05$.

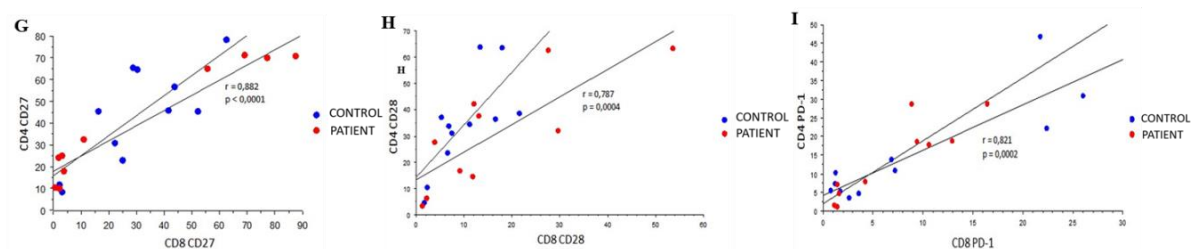


Figure 4: Evaluation of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocyte populations regarding the expression of CD27, CD28, and PD-1 molecules. (G) Correlation between TCD4⁺ CD27⁺ lymphocyte populations and TCD8⁺ CD27⁺ lymphocytes in the treated patient and control groups. (H) Correlation between

TCD4⁺ CD28⁺ lymphocyte populations and TCD8⁺ CD28⁺ lymphocytes in the treated patient and control groups. (I) Correlation between TCD4⁺ PD-1⁺ lymphocyte populations and TCD8⁺ PD-1⁺ lymphocytes in the treated patient and control groups. Values of p and r determined by Spearman's correlation test, where r expresses the correlation coefficient. $p < 0.05$ is considered statistically significant.

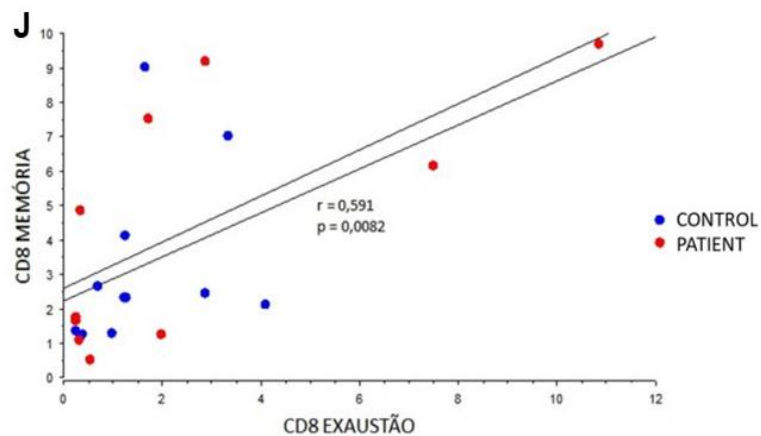


Figure 5: Assessment of TCD8⁺ memory lymphocyte populations regarding the expression of CD127 and CXCR-3 molecules and exhaustion regarding the expression of CD127 and TIM-3 molecules. (J) Correlation between TCD8⁺ CD127^{high} CXCR-3⁺ (memory) lymphocyte populations and TCD8⁺ CD127^{low} TIM-3⁺ (exhaustion) lymphocyte populations in the treated and control groups. p and r values determined by Spearman correlation test, where r expresses the correlation coefficient. $p < 0.05$ is considered significant.

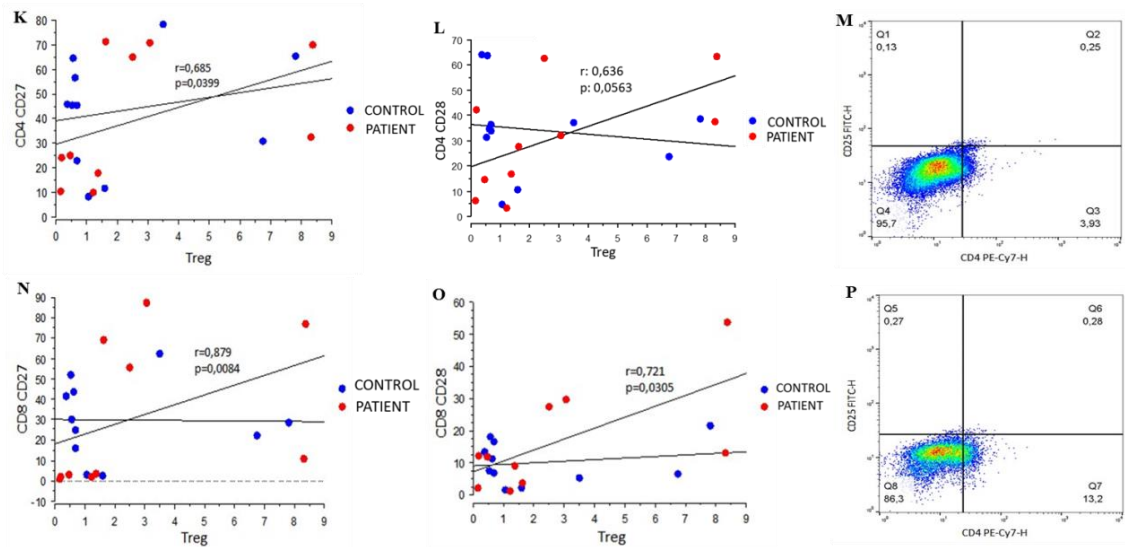


Figure 6: Evaluation of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocyte populations regarding the expression of molecules CD27, CD28, CD25, and LAP. (K) Correlation between TCD4⁺ CD27⁺ lymphocyte populations and TCD4⁺ CD25⁺ LAP⁺ lymphocyte populations in treated patient and control groups. **(L)** Correlation between TCD4⁺ CD28⁺ lymphocyte populations and TCD4⁺ CD25⁺ LAP⁺ lymphocyte populations in treated patient and control groups. **(M)** Selection of TCD4⁺ CD25⁺ cells (Q2). **(N)** Correlation between TCD8⁺ CD27⁺ lymphocyte populations and TCD4⁺ CD25⁺ LAP⁺ lymphocyte populations in treated patient and control groups. **(O)** Correlation between TCD8⁺ CD28⁺ lymphocyte populations and TCD4⁺ CD25⁺ LAP⁺ lymphocyte populations in treated patient and control groups. **(P)** Selection of TCD4⁺ CD25⁺ cells (Q6). Values of p and r determined by Spearman's correlation test, where r expresses the correlation coefficient. $p<0.05$ was considered statistically significant.

APÊNDICE B – Comprovante de Submissão de Artigo Científico.

14/10/2024, 15:12

ScholarOne Manuscripts

 Memórias do Instituto Oswaldo Cruz[Home](#)[Author](#)[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Manuscript ID

MIOC-2024-0231

Title

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF T LYMPHOCYTE REPERTOIRE IN HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS

Authors

Mattos Júnior, Márden

Silva, Marcos Vinícius

Alvares da Costa, Thiago

Bernadelli de Vito, Fernanda

Rodrigues Jr, Virmondes

Date Submitted

14-Oct-2024