

**PRESERVAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE LINFÓCITOS T CD4⁺ PD-1⁺
ESPECÍFICOS PARA *LEISHMANIA INFANTUM* PODE ESTAR ASSOCIADA À
PROTEÇÃO CONTRA RECIDIVAS DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

**PRESERVED FUNCTIONALITY OF *LEISHMANIA INFANTUM*-SPECIFIC CD4⁺
PD-1⁺ T LYMPHOCYTES MAY BE ASSOCIATED WITH PROTECTION AGAINST
VISCERAL LEISHMANIASIS RELAPSE.**

Jessica Carina Silveira da Silva^{1,2}; Manuela de Castro Gonçalves³; Daniel Azevedo-Angelo²;
Gabriela Corrêa-Castro²; Joanna Reis Santos-Oliveira^{2,3}; Maria Luciana Silva-Freitas^{1,2}

¹ Universidade Unigranrio – Afya, Duque de Caxias, Brasil; ² Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil; ³ Núcleo de Ciências Biomédicas Aplicadas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: jessica.silveira@alunos.afya.com.br

Eixo Temático: Saúde

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica potencialmente fatal, cuja imunopatogênese envolve imunossupressão específica associada à intensa ativação imune crônica, podendo culminar em exaustão celular, imunossenescência e comprometimento da resposta efetora ao parasito, favorecendo recidivas. A ocorrência de recidivas, inclusive em pacientes não coinfectados pelo HIV, reforça a necessidade de compreender os mecanismos imunológicos associados a esse desfecho. Assim, nosso objetivo foi avaliar a resposta efetora de linfócitos TCD4⁺ com perfil disfuncional associado à expressão de PD-1 frente aos antígenos de *Leishmania infantum*, em pacientes com LV redicivantes (LV-R) ou não (LV-NR). Foram avaliados 16 pacientes com LV, desde a fase ativa até 12 meses pós-tratamento (12mpt), agrupados LV-NR e LV-R, além de 9 controles negativos (CN). PBMCs foram cultivados por 72 h na ausência (BG) ou presença de antígenos de *L. infantum* ou Concanavalina A e analisados por citometria de fluxo quanto à expressão de PD-1, linfoproliferação (BrdU) e produção intracelular de IFN- γ . Embora os percentuais de PD-1 tenham sido elevados, não diferiram entre LV-R e LV-NR. Frente ao estímulo antigênico, LV-NR apresentaram maiores percentuais de linfócitos TCD4⁺ BrdU⁺ aos 12 mpt e de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ em todas as fases, sugerindo maior funcionalidade efetora. Em células TCD4⁺PD-1⁺, observou-se aumento significativo de BrdU⁺PD-1⁺ e IFN- γ ⁺PD-1⁺ em LV-NR aos 12mpt, além de aumento de BrdU⁺IFN- γ ⁺ em células TCD4 PD-1⁺, diferentemente de LV-R. A análise por *fold change*, ou seja, o Li dividido pelo BG, confirmaram

esses achados. Os resultados sugerem que, apesar da elevada expressão de PD-1, pacientes LV-NR preservam a capacidade funcional de células TCD4⁺ específicas contra *L. infantum*, o que pode estar associado ao controle parasitário e à proteção contra recidivas da LV.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; recidivas; resposta efetora; exaustão celular; PD-1.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a potentially fatal systemic disease, whose immunopathogenesis involves specific immunosuppression associated with intense chronic immune activation, which may culminate in cellular exhaustion, immunosenescence, and impaired effector responses to the parasite, favoring relapse. The occurrence of relapses, including in patients not coinfecting with HIV, reinforces the need to understand the immunological mechanisms associated with this outcome. Thus, our objective was to evaluate the effector function of CD4⁺ T lymphocytes with a dysfunctional profile associated with PD-1 expression in response to *Leishmania infantum* antigens in patients with relapsed (R-VL) or non-relapsed VL (NR-VL). Sixteen patients with VL were evaluated from the active phase through 12 months post-treatment (12 mpt), grouped into NR-VL and R-VL, in addition to 9 negative controls (NC). PBMCs were cultured for 72 h in the absence (BG) or presence of *L. infantum* antigens or Concanavalin A and analyzed by flow cytometry for PD-1 expression, lymphoproliferation (BrdU), and intracellular IFN- γ production. Although PD-1 percentages were elevated, they did not differ between R-VL and NR-VL. In response to antigenic stimulation, NR-VL patients showed higher percentages of BrdU⁺ CD4⁺ T lymphocytes at 12 mpt and IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells at all time points, suggesting greater effector functionality. In CD4⁺PD-1⁺ T cells, a significant increase in BrdU⁺PD-1⁺ and IFN- γ ⁺PD-1⁺ cells was observed in NR-VL at 12 mpt, in addition to an increase of BrdU⁺IFN- γ ⁺ in PD-1⁺ CD4 T cells, a pattern not observed in R-VL. The fold-change analysis, calculated as LI divided by BG, confirmed these findings. The results suggest that, despite the high expression of PD-1, NR-VL patients preserve the functional capacity of *L. infantum*-specific CD4⁺ T cells, which may be associated with parasite control and protection against VL relapse.

Keywords: visceral leishmaniasis; relapse; effector response; cellular exhaustion; PD-1.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma zoonose causada pela *Leishmania infantum* (Li) nas Américas, atribuído como *L. chagasi* por muitos autores.¹ Sua transmissão ocorre através da picada do flebotomíneo infectado da espécie *Lutzomyia longipalpis*. A LV é considerada a forma mais grave dentre as leishmanioses,² levando a diferentes desfechos clínicos como a forma grave, óbito, cura clínica e a recidiva. As recidivas, por sua vez, tem emergido como um desafio adicional entre pacientes não coinfectados pelo HIV, sendo consideradas fatores de risco para óbito por LV.³ De fato, as recidivas têm sido um desfecho clínico cada vez mais reconhecido em indivíduos com LV, variando de 3 a 5%,⁵ embora sejam mais comuns e mais estudadas entre PVHIV.⁴⁻⁷ Quanto aos aspectos

imunopatogênicos, já se sabe que a LV cursa para uma imunossupressão específica e como parte deste complexo cenário imunológico, sabe-se que a ativação imune crônica e status inflamatório exacerbado resultam no fenômeno de imunossenescência e de exaustão imune crônica, muito bem elucidados na infecção pelo HIV-1, porém ainda pouco estudados na LV. Embora a exaustão linfocitária constitua um importante mecanismo regulatório, este fenômeno pode desempenhar papel patogênico em infecções crônicas como a LV. O aumento da expressão da proteína 1 de morte celular (PD-1) já foi observado na infecção por *Leishmania*,⁸ contribuindo para o processo de exaustão linfocitária. O cenário atual de evolução clínica da LV possui um desafio adicional: as frequentes recidivas da doença, as quais são consideradas fatores de risco para óbito por LV.⁹ Acredita-se que a suscetibilidade às recidivas esteja relacionada com diversas alterações imunológicas associadas, por sua vez, a fatores atrelados a presença do parasito. A distinção entre indivíduos redicivantes (LV-R), e não-redicivantes (LV-NR) torna-se fundamental para a compreensão dos mecanismos imunológicos associados ao controle ou a progressão da infecção e, diante disso, a via PD-1 emerge como potencial biomarcador de persistência da exaustão linfocitária e comprometimento funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Nosso grupo tem se dedicado a entender os aspectos imunológicos relacionados às recidivas da LV em pacientes brasileiros, e umas das nossas perguntas atualmente é: “A ocorrência de recidivas da LV em pacientes brasileiros está associada ao comprometimento funcional de linfócitos T cronicamente ativados e potencialmente exaustos (PD-1⁺)?”. Com isso, o objetivo deste trabalho é: avaliar a resposta efetora de linfócitos T CD4⁺ com um perfil disfuncional associado à expressão de PD-1⁺ frente aos antígenos de *Leishmania infantum*, em pacientes com LV que recidivaram ou não a doença.

MÉTODO

Esse estudo avaliou uma coorte de pacientes admitidos no Hospital Eduardo de Menezes, em Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais. Foram recrutados 16 pacientes com LV e 9 indivíduos controles negativos, podendo ser de áreas endêmicas para LV ou não. Os pacientes com LV foram acompanhados prospectivamente da fase ativa aos 12 meses pós-tratamento (mpt) e foram então separados em dois grupos, conforme a evolução clínica da LV. O grupo dos LV-NR continha aqueles que apresentaram apenas um episódio da doença (n=9). O grupo LV-R, continha aqueles que apresentaram mais de um episódio ativo da LV ao longo da vida (n=7), seja antes ou durante o acompanhamento clínico. Este projeto está vinculado ao protocolo “Reconstituição imune em pacientes com leishmaniose visceral e sua relação com

cura clínica, gravidade e recidiva da doença (CAAE: 39634120.5.0000.5248/2020) aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fundação Oswaldo Cruz.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) destes pacientes foram cultivadas *in vitro* sob 3 condições: com antígenos *L. infantum*, com mitógeno ConA e na ausência de estímulo (BG). As células permaneceram em cultura por 72 horas à 37 graus e na presença de 5% de CO₂. Posteriormente, foi realizada a imunofenotipagem com marcação extra e intracelular e as células foram adquiridas no citômetro Cytoflex da Plataforma Multiusuários da Fiocruz RJ e as amostras foram analisadas no software Kaluza.

RESULTADOS

Avaliação dos níveis de expressão da molécula inibitória PD-1 na subpopulação de células T CD4⁺ frente ou não (BG) ao estímulo com antígenos de *L. infantum*. (A) Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de PD-1⁺ em células T CD4⁺ e (B) MFI integrado (iMFI – multiplicação do MFI de PD-1⁺ em células T CD4 pelos % de PD-1⁺ nesta mesma população):

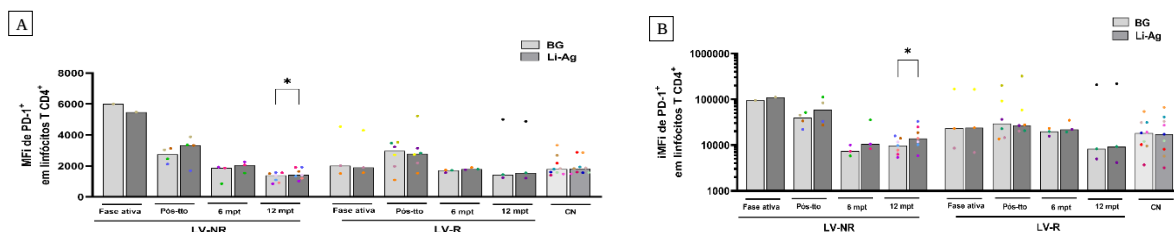


Figura 1: observa-se que todos os grupos avaliados apresentam níveis de expressão de PD-1 similares, sejam entre eles ou seja em comparação ao BG. Um discreto aumento significativo foi observado aos 12 mpt do grupo NR frente ao estímulo em comparação ao BG.

Avaliação da capacidade linfoproliferativa e/ou de produção de IFN- γ em células T potencialmente exaustas, através dos fenótipos BrdU⁺PD-1⁺; IFN- γ ⁺PD-1⁺ e BrdU⁺IFN- γ ⁺ em PD-1⁺, frente ou não (BG) ao estímulo com antígenos de *L. infantum*:

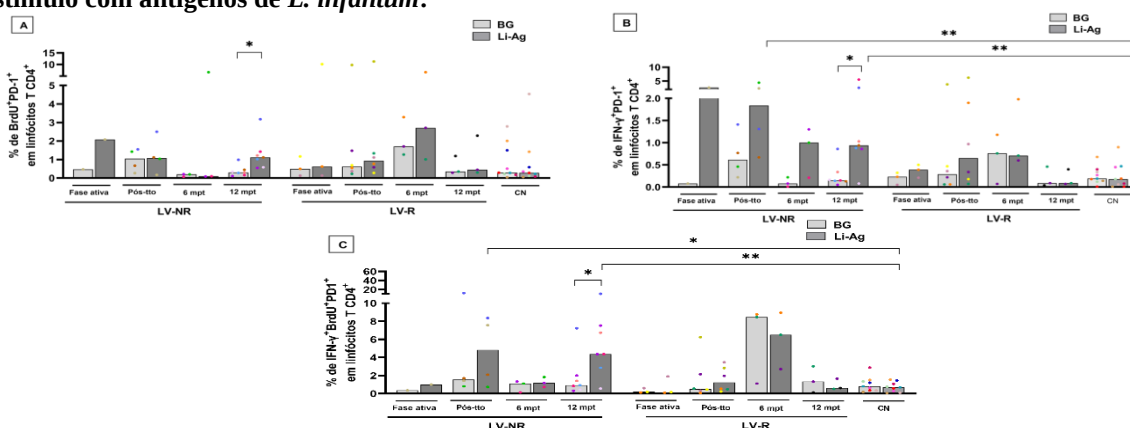


Figura 2: avaliando os percentuais de células BRDU⁺PD-1⁺ (A), observamos um aumento significativo no grupo NR aos 12mpt frente ao estímulo comparado pelo BG. Na figura B, um resultado similar pode ser visto nos percentuais de células IFN- γ ⁺PD-1⁺, que embora não significativo, foi mais alto que o BG em todas as fases. Um aumento significativo frente ao estímulo também foi observado no pós-tto e aos 12 mpt do grupo NR em comparação ao CN. Esse mesmo resultado se mantém quando avaliamos a dupla funcionalidade de células exaustas, ou seja, BRDU⁺IFN- γ ⁺ dentro das células TCD4⁺ PD-1⁺, frente ao estímulo, observado na figura C.

Avaliação da capacidade linfoproliferativa e/ou de produção de IFN- γ em células T potencialmente exaustas, através dos fenótipos BrdU⁺PD-1⁺; IFN- γ ⁺PD-1⁺ e BrdU⁺IFN- γ ⁺ em PD-1⁺, frente ou não (BG) ao estímulo com antígenos de *L. infantum* (Li) pela estratégia de *fold change* (Li/BG):

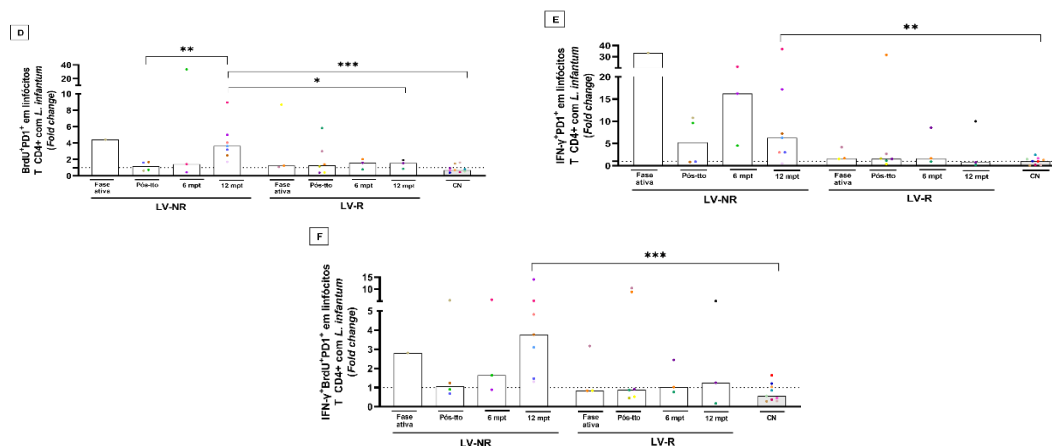


Figura 3: os resultados dentro da subpopulação de células T CD4⁺ foram confirmados pela estratégia de *fold change* (Li/BG). Sobretudo aos 12mpt do grupo LV-NR em comparação ao grupo CN.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que, dentre os pacientes LV-NR, os linfócitos T CD4⁺ potencialmente exaustos (PD-1⁺) específicos aos antígenos de *Leishmania infantum* parecem preservar a sua funcionalidade, mesmo diante do contexto de ativação imune crônica característico da leishmaniose visceral. Esse achado é relevante diante de evidências anteriores que associam o aumento da expressão de PD-1 à redução da resposta efetora de células T, mais especificamente quanto a diminuição da produção de IFN- γ durante a infecção por *L. infantum*, em células T CD8⁺ como demonstrado nos estudos de Gautam *et al.*¹⁰ De maneira semelhante, estudos mais recentes conduzidos por Takele *et al.*,¹¹ observaram alterações relacionadas à expressão de PD-1 em pacientes coinfectados (HIV-*Leishmania*), especialmente entre aqueles que apresentavam recidivas da doença. No presente estudo, a preservação da funcionalidade dos linfócitos T CD4⁺ PD-1⁺, observada entre pacientes que se mantêm em remissão clínica, pode indicar que essas células, ainda que potencialmente exaustas e mesmo diante da exposição antigênica persistente, são capazes de proliferar e produzir IFN- γ . Assim, a manutenção da capacidade efetora dos linfócitos T CD4⁺ PD-1⁺ pode representar um componente da resposta imune associado à proteção contra a ocorrência de recidivas.

CONCLUSÃO

Diante dos achados, podemos concluir que os resultados indicam que, apesar da expressão elevada do marcador inibitório PD-1⁺, coerente com o grau de ativação crônica,

pacientes LV-NR mantêm uma resposta funcional de células T CD4⁺ específicas contra *L. infantum*, sugerindo que a preservação da capacidade efetora pode estar associada ao controle parasitário e à proteção contra recidivas da LV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. REY, L. - **Parasitologia**, 4^a ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008. *E-book*. p.397. ISBN 978-85-277-2027-4
2. OPAS. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. Disponível em: <https://iris.paho.org/items/6051e084-f2f5-4592-982d-d8e6ca5195b2>. Acesso em abril de 2026.
3. MS. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania/HIV**. Brasília, 2011.
4. COTA, G.F; Sousa MR de, Rabello A 2011. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: A systematic review. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5: 1–8.
5. SILVA-FREITAS, M. L. *et al.* Immune activation and bacterial translocation: A link between impaired immune recovery and frequent visceral leishmaniasis relapses in HIV-infected patients. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 11, no. 12, p. 1–18, 2016. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0167512.
6. SILVA-FREITAS, M. L. *et al.* Impaired thymic output can be related to the low immune reconstitution and t cell repertoire disturbances in relapsing visceral leishmaniasis associated HIV/AIDS patients. **Front Immunol.** 2020. 11:953.
7. SILVA-FREITAS, M. L. *et al.* Insights to the HIV-associated visceral leishmaniasis clinical outcome: lessons learned about immune mediated disorders. **Front Immunol.** 2025. 16:1516176. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1516176.
8. MACIEL, P. E. **Via inibitória PD-1 PD-L1 na resposta imune humana a *Leishmania spp.*** Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/51080/1/ElanePriscilaMaciel_TESE.pdf.
9. KUSCHNIR, R. C. *et al.* High levels of anti-Leishmania IgG3 and low CD4⁺ T cells count were associated with relapses in visceral leishmaniasis. **BMC Infect Dis.** 2021 Apr 2021(1):369. DOI: 10.1186/s12879-021-06051-5.
10. GAUTAM, S. *et al.* CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 290–299, 6 ago. 2013. DOI: 10.1093/infdis/jit401.
11. TAKELE, Y. *et al.* Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 1, p. 100487, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100487.