



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

PARTICIPACIÓN DE LA APOPTOSIS EN LA  
INTERACCIÓN CD8<sup>+</sup> - MACRÓFAGO INFECTADO  
CON *L. mexicana*, PROVENIENTES DE  
PACIENTES CON LCL Y LCD.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M.C. JOSELÍN HERNÁNDEZ RUIZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. INGEBORG BECKER

COMITÉ TUTOR: DRA. IVONNE ROSENSTEIN

DR. ALEJANDRO ZENTELLA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



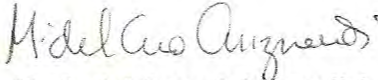
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**P r e s e n t e**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **HERNÁNDEZ RUÍZ JOSELÍN** con número de cuenta **503450801** con la tesis titulada: **“PARTICIPACIÓN DE LA APOPTOSIS EN LA INTERACCIÓN CD8- MACROFAGO INFECTADO CON LEISHMANIA MEXICANA PROVENIENTES DE PACIENTES CON LCL Y LCD.”**, realizada bajo la dirección de la: **DRA. INGEBOR DOROTEA BECKER FAUSER.**

Presidente:	DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal:	DRA. EDDA SCIUTTO
Vocal:	DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Vocal:	DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ
Secretario:	DRA. INGEBOR DOROTEA BECKER FAUSER
Suplente:	DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR
Suplente:	DRA. IVONNE ROSENSTEIN AZOULAY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”**  
Cd. Universitaria, D.F. a 02 de febrero de 2011

  
**Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga**  
**Coordinadora del Programa**

En primera instancia debo agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el acompañamiento que me brindaron en el programa de Doctorado, al apoyo académico, económico y logístico, y sobre todo, a la gran disposición para encontrar la mejor solución en pro de la calidad de mi formación y de la investigación.

Así mismo, quiero agradecer a la Dirección General de Estudios de Posgrado por la beca sin la cual habría sido imposible realizar el Doctorado. También a CONACYT, a través del proyecto 45052, que apoyó el tiempo de redacción del artículo y la escritura de la tesis.

También agradezco inmensamente el apoyo brindado por los miembros del Comité Tutorial, que guiaron mis pasos en la investigación con sus frecuentes sugerencias, correcciones y comentarios, sin los cuales no habría logrado los objetivos planteados.

Finalmente, quiero expresar mi deuda con la Dra. Ingeborg Becker por su constante apoyo, tanto académico como humano. También a su grupo de investigación, a la Dra. Norma Salaiza, el Dr. José Delgado, la Dra. Miriam Berzunza, la M. en C. Rocely Cervantes, la M. en C. Adriana Ruiz y la M. en C. Cristina Cañeda, por su apoyo y amistad.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.1. Epidemiología .....	9
1.2 Infección por <i>Leishmania</i> .....	11
1.3 Respuesta inmune en la leishmaniasis. ....	14
1.4 Células T citotóxicas CD8 <sup>+</sup> .....	17
1.5 Participación de las células T CD8 <sup>+</sup> en la leishmaniasis.....	20
1.6 Rutas de activación de células T CD8 <sup>+</sup> en leishmaniasis.....	23
1.7 Función efectora de células T CD8 <sup>+</sup> .....	26
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>33</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.4 Linfocitos T CD8 productores de INF $\gamma$ . ....	45
5.5 Apoptosis en tejidos.....	45
5.6 Efecto de la apoptosis del macrófago infectado sobre la sobrevivencia de los parásitos recuperados. ....	47
5.7 Evaluación del estímulo de TLR2 en células CD8 de pacientes LCD.....	49
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>59</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>61</b>
<b>ARTÍCULOS GENERADOS</b> .....	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de Leishmaniasis cutánea..	8
Figura 2. Reportes de casos de leishmaniasis en México.	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> ..	11
Figura 4. Respuesta inmune a <i>Leishmania</i> .....	15
Figura 5. Interacción DC-CD4-CD8.....	19
Figura 6. Procesamiento de antígenos de <i>Leishmania</i> vía MHC I.....	23
Figura 7. Procesamiento de antígenos de <i>Leishmania</i> vía MHC I.....	25
Figura 8. Posibles mecanismos efectores de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> en la leishmaniasis..	26
Figura 9. Ensayo citotóxico de linfocitos CD8 <sup>+</sup> con macrófagos autólogos infectados en pacientes LCL y LCD..	40
Figura 10. Mecanismo citotóxico.....	42
Figura 11. Proliferación de linfocitos de pacientes LCL y DCL.	43
Figura 12. Linfocitos CD8 productores de IFN $\gamma$ .....	45
Figura 13. Apoptosis en la lesión de pacientes LCL y LCD.....	46
Figura 14. Muerte de MOi y su efecto sobre la recuperación de parásitos.....	47
Figura 15. Restauración de las funciones efectoras de los linfocitos T CD8 con ligandos de TLR2.....	48
Figura 16. Expresión de PD1 sobre linfocitos CD8 activados con ligandos de TLR2.....	48

## RESUMEN

La leishmaniasis es una zoonosis parasitaria multifacética que resulta de la infección por un protozoo del género *Leishmania* y puede afectar humanos y otras especies de mamíferos. En el trópico se encuentra como una de las enfermedades más importantes. En México, los estados más afectados son Chiapas y Tabasco. La leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana* es la más frecuente y se presenta en dos cuadros clínicos opuestos, leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea difusa, la segunda de mal pronóstico, usualmente incurable. Por tanto, aún se requiere de estrategias para el control de la enfermedad y la relación hospedero-parásito es motivo de estudio en la búsqueda de tales estrategias. La respuesta inmune a *Leishmania* se ha estudiado en modelos murinos. La eliminación del parásito depende de la respuesta mediada por IFN $\gamma$  con activación de macrófagos y producción de óxido nítrico. Sin embargo poco se sabe de la respuesta citotóxica y su papel en el control de la infección.

El presente trabajo abordó el estudio de la respuesta citotóxica de linfocitos T CD8 de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD), contra macrófagos autólogos infectados *in vitro* con *L. mexicana*, además de la capacidad proliferativa y producción de IFN $\gamma$ . Adicionalmente se buscó si también existía alguna diferencia en la muerte celular en las lesiones de los pacientes. Se demostró un patrón diferencial de respuesta de los linfocitos CD8 entre los dos cuadros clínicos así como en el número de células en apoptosis de las lesiones. Los pacientes con LCD exhiben

*in vitro* una condición de anergia funcional específica de antígeno y presentan menos células en apoptosis en las lesiones.

Se ha demostrado que el estado anérgico linfocitario puede ser revertido con bloqueadores de la señal de PD-L1 o con un ligando de TLR9. Considerando que los linfocitos CD8 expresan TLR2, y que este receptor media funciones de activación, evaluamos la posibilidad de revertir el estado anérgico a través de su activación *in vitro* con lipofosfoglicano o Pam3Cys. Se encontró que esta activación confiere un incremento en la respuesta citotóxica, producción de IFN $\gamma$  y proliferación de los linfocitos T CD8 provenientes de pacientes con LCD, retados con macrófagos autólogos infectados, mediado al parecer por la disminución en la expresión de PD-1.

Los resultados indican que la respuesta de CD8 se asocia al control de la infección por *L. mexicana* en pacientes con LCL y el agotamiento funcional de células CD8, a la propagación de la infección en la LCD. Este es el primer reporte que señala la presencia de linfocitos T CD8 exhaustos en pacientes con LCD y su posible reactivación a través de TLR2.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a multifacetic parasitic zoonosis caused by *Leishmania* spp. and can affect humans and other mammals. Leishmaniasis is one of major diseases in the tropic land. In Mexico, Chiapas and Tabasco are the more affected states. Cutaneous leishmaniasis caused by *L. mexicana* is the most frequent and have two opposite outcomes: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), the second outcome have bad prognostic and is usually hopeless. Therefore, further strategies are needed to control the disease and host-parasite relationship is being studied in the search for such strategies

The immune response to *Leishmania* has been extensively studied in murine models. It recognizes that parasite clearance depends on the response mediated by IFN $\gamma$ -activated macrophages and nitric oxide production. However, little is known of the cytotoxic response and its role in infection control. The present study first addressed the cytotoxic response of CD8 T lymphocytes from LCL and DCL patients against autologous macrophages infected *in vitro* with *L. mexicana*. Then assessed proliferation and IFN $\gamma$  production. Additionally, we sought whether there is also some difference in cell death in lesions of patients. This analysis showed that exist a differential pattern of CD8 cell response between the two clinical outcomes and even the number of apoptotic cells in the lesions. DCL patients display a condition of antigen-specific functional anergy, similar to that described in chronic viral infections; also have fewer apoptotic cells in the lesions, which could indicate that such functional anergy may be responsible, at least in part, for the low apoptosis in the lesions and more importantly, the inability to control the parasite.

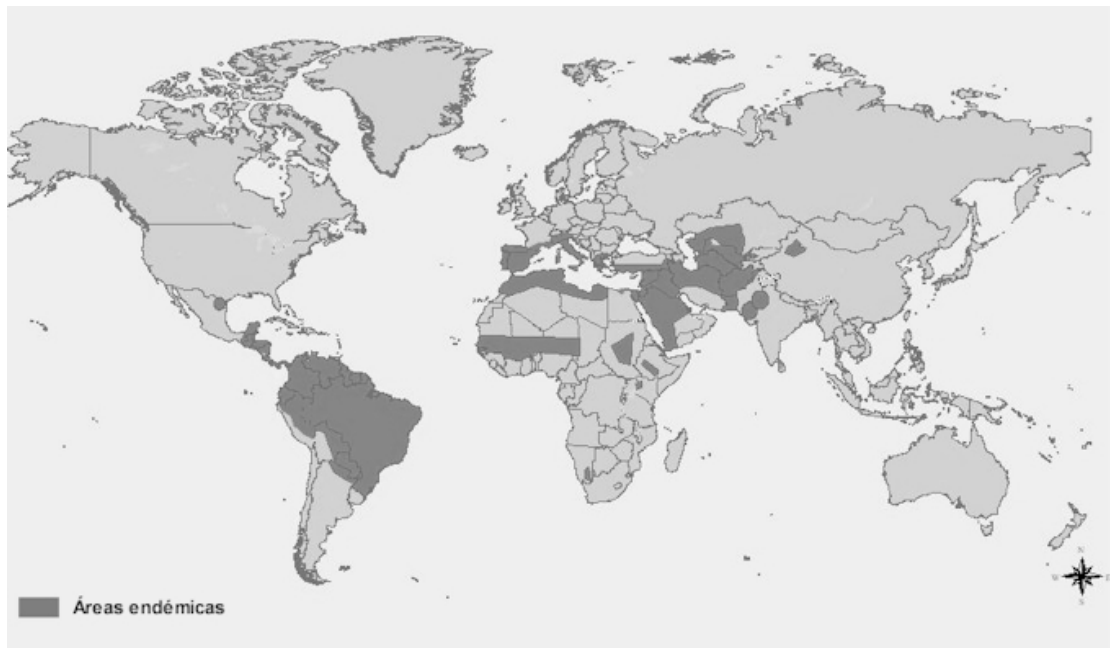
Recently it was shown that this exhausted condition can be reversed by blocking of PD-L1 or by TLR9 ligand. This last fact prompted us to ask if we could reverse the condition observed in DCL patients *in vitro* with the use of TLR2 ligands. We found that *in vitro* prestimulation with Pam3Cys or lipophosphoglycan, confers an increased cytotoxic response, IFN $\gamma$  production and proliferation of CD8 T cells challenged with autologous infected macrophages, apparently mediated by decreased expression of PD-1.

Our work suggests that CD8 response is associated with control of *L. mexicana* infection in LCL patients and that chronic infection in DCL patients leads to a state of CD8 functional exhaustion, which could facilitate disease spread. This is the first report that shows the presence of functionally exhausted CD8 T lymphocytes in DCL patients and, additionally, that prestimulation with TLR2 ligands can restore the effector mechanisms of CD8 T lymphocytes from DCL patients against *Leishmania mexicana*-infected macrophages.

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. Epidemiología

La leishmaniasis es considerada por la Organización Mundial de la Salud como la cuarta enfermedad más importante en el trópico. 350 millones de personas se encuentran viviendo en áreas endémicas (figura 1) y se estiman 12 millones de personas infectadas con el parásito, de las cuales 1,5 millones son casos reportados recientemente (WHO, 2009).



**Figura 1. Distribución mundial de Leishmaniasis cutánea (WHO, 2009).**

En México, la leishmaniasis se ha reportado en gran parte del país, aunque principalmente en el sureste, siendo los estados de Chiapas y Tabasco los más afectados (figura 2). Desde 1981 hasta la semana 40 del 2005, se reportó un total de 16673 casos de pacientes con leishmaniasis, de los cuales el 99.31% corresponden a LCL, 0.14% a LCD y 0.55% a LV. En el estado de Tabasco se informaron 11 de los 23 pacientes con LCD, y en segundo lugar se encuentra Veracruz con 6 casos (Becker et al, 2006).



**Figura 2. Reportes de casos de leishmaniasis en México (Becker et al, 2006). \* Estados más afectados.**

Aunque se han realizado progresos en el diagnóstico y se han desarrollado una variedad de inmunoterapias y quimioterapias para el tratamiento de esta enfermedad, en los últimos años se ha observado incremento en la incidencia de leishmaniasis en América Latina y existen nuevos reportes en zonas no endémicas constituyendo un problema creciente (Murray et al, 2005). La ausencia de estrategias de control de la enfermedad además del surgimiento de resistencia a las drogas antimoniales Pentostam® y Glucantime® (Hepburn, 2003; Singh & Sivakumar, 2004), sumado al alto costo de implementación de medidas de control de los vectores que transmiten estos parásitos y el riesgo ecológico a que ello puede conllevar, demanda esfuerzos dirigidos a desarrollar un conocimiento más profundo de la relación hospedero – parásito para determinar posibles estrategias de control.

## 1.2 Infección por *Leishmania*.

La forma promastigote del parásito es transmitida por la saliva de dípteros del género *Lutzomyia* para el nuevo mundo y *Phlebotomus* para el viejo mundo, los cuales inoculan los parásitos al picar la piel de mamíferos. En el hospedero vertebrado, las especies de *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados, que principalmente viven y se multiplican dentro de un compartimento fagolisosomal de macrófagos, aunque también son fagocitados por células dendríticas, neutrófilos y queratinocitos. Para sobrevivir en este espacio ácido, la forma amastigote debe: 1) resistir la digestión por múltiples hidrolasas y peptidasas activas, 2) asegurar la consecución de nutrientes; y 3) evitar alertar al sistema inmune (Alexander & Rusell, 1992; Denkers & Butcher, 2005); lo cual no solo consigue sino también logra multiplicarse por división simple y sale del fagocito para infectar otras células. Otra mosca, al picar el mamífero, ingiere fagocitos parasitados. Posteriormente los amastigotes se liberan, se transforman a promastigotes y se desarrollan en el intestino proximal para el subgénero *Viannia* y el intestino medio para el subgénero *Leishmania*. Por último, migran a la probóscide del insecto para esperar que pique a otro mamífero y continuar el ciclo (Maurer et al, 2009) (figura 3).

## En el insecto

## En el humano

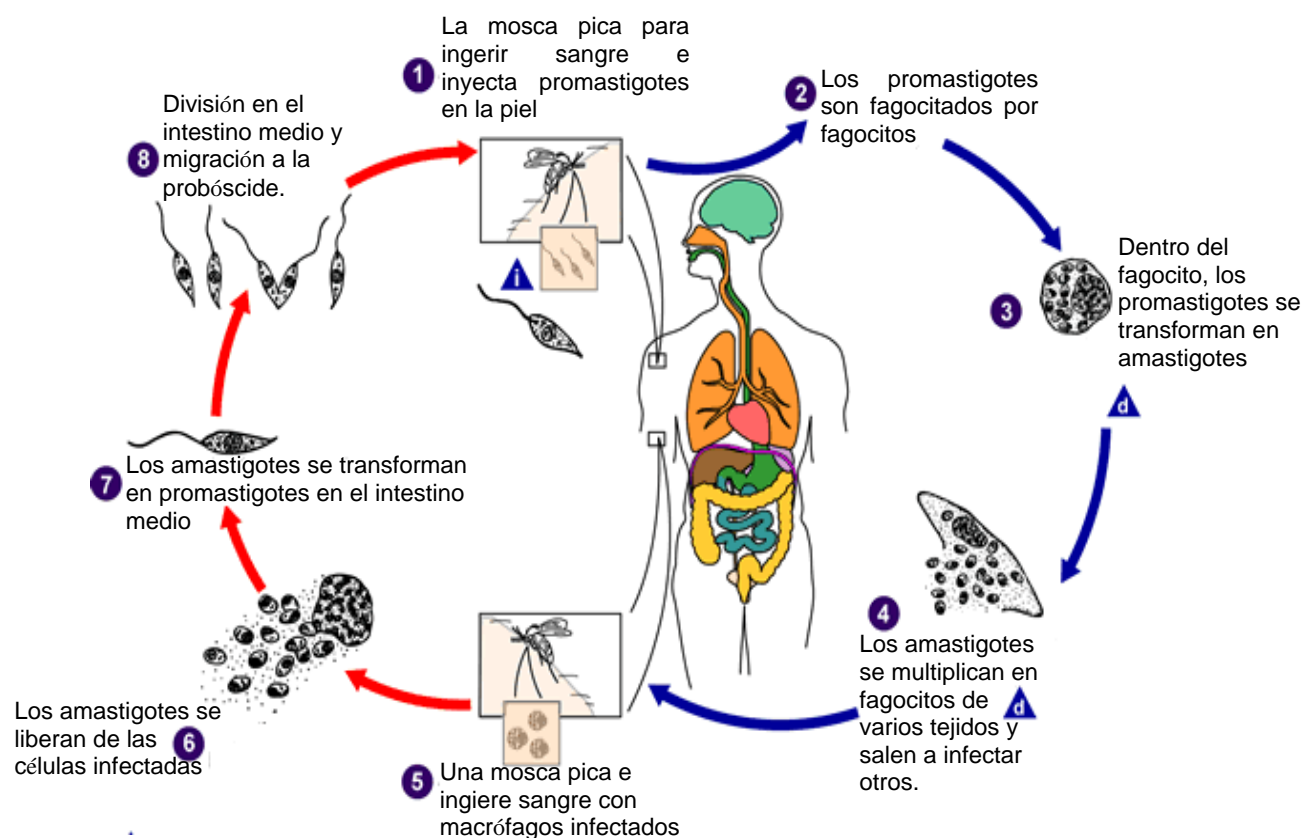


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*. Adaptado de “Center of Disease Control and Prevention” ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

Dependiendo de la especie, el parásito o macrófago parasitado puede diseminarse y llevar la infección a distintos órganos, produciendo varias entidades clínicas: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), cutánea difusa (LCD), mucocutánea (LMC) y visceral (LV) (Murray et al, 2005). La leishmaniasis cutánea es el resultado de la multiplicación de *Leishmania* en los fagocitos de la piel y es causada principalmente por los miembros del complejo *L. mexicana* (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) venezuelensis*) y por los del complejo de *L. braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.)*

*guyanensis*) en el nuevo mundo, y por *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica* en el viejo mundo (revisado por Ruiz & Becker, 2007).

La leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. aethiopica*, puede presentarse en forma bipolar, dando como resultado las formas cutánea localizada (LCL) y cutánea difusa (LCD). La primera se considera la forma benigna, se caracteriza por una ulceración pequeña y única (dependiendo del número de picaduras del vector) que tiende a la curación espontánea; el polo opuesto lo representan pacientes con LCD, donde el parásito se disemina por vía linfática generando múltiples nódulos (Velasco, 1970) y genera la forma más severa y progresiva de la enfermedad. Los pacientes LCD resultan negativos a la prueba cutánea de reactividad a antígenos de *Leishmania* (prueba de Montenegro) y el tratamiento con antimoniales o nuevas sustancias como la hexadecilfosfocolina solo producen remisión transitoria (Calvopina et al, 2006).

Adicionalmente, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. amazonensis*, pueden generar una tercer forma de leishmaniasis denominada mucocutánea (LMC), la cual involucra lesiones metastásicas severas en las membranas mucosas del rostro (Lessa et al, 2007). Al parecer, el contraste de los cuadros clínicos radica en diferencias en la respuesta inmune generadas en el hospedero. Es sugerido que la LCD ocurre en individuos con defectos en la respuesta inmune mediada por células (Desjeux, 2004), sin embargo estos pacientes solo presentan la infección por *Leishmania* y no por otros patógenos con mayor presencia en el ambiente como *M. tuberculosis*. Por tanto es posible que tal deficiencia sea específica de *Leishmania* e inducida por su presencia persistente (Ruiz & Becker, 2007).

### 1.3 Respuesta inmune en la leishmaniasis.

El trauma ocasionado por la picadura del vector induce en el hospedero una respuesta inflamatoria que involucra la migración de diferentes células, principalmente macrófagos y linfocitos, los cuales participan en la eliminación del agente extraño, reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de reparación. La infección por *Leishmania* generalmente induce una respuesta inmune muy compleja que varía dependiendo de diferentes factores. Según la especie de *Leishmania* implicada en el proceso infeccioso, la forma clínica de la enfermedad y la cronicidad de la enfermedad, se genera un espectro de respuestas inmunes que incluyen desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específica a través de células y de anticuerpos. La respuesta de células T se ha evidenciado a través reacciones de hipersensibilidad tardía y proliferación de linfocitos *in vitro* en presencia de antígenos de *Leishmania* (Ruiz & Becker, 2007). En términos generales, se ha observado una fuerte respuesta mediada por células T para la forma LCL y ausencia de ella en la forma LCD (Agudelo & Robledo, 2000), aunque ambos padecimientos desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la infección, se mantiene durante el curso de la enfermedad y desaparece únicamente después de la eliminación de la mayoría de los parásitos (Convit et al, 1993).

Luego del contacto con los antígenos del parásito, presentados por las moléculas de MHC sobre la membrana del macrófago infectado, y dependiendo del tipo de célula presentadora de antígeno (CPA), de los niveles de citocinas y de la naturaleza del antígeno reconocido, las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> proliferan y secretan un patrón definido de citocinas con funciones efectoras diferentes. Las citocinas de tipo Th1 como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , participan en



la regulación del granuloma y en la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta humoral con isotipos IgG1 e IgG3 en humanos (IgG2a en ratones) mientras que las citocinas de tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de respuestas de tipo hipersensibilidad inmediata e inducen freno a la respuesta Th1 (Rossi-Bergman et al, 1993; Cox & Liew, 1992; Sacks & Noben-Trauth, 2002, Murray et al, 2005).

En la leishmaniasis, la eliminación del parásito parece depender de la activación de la célula hospedera y se ha observado que la producción de citocinas activadoras de macrófagos correlaciona con la curación, mientras que las citocinas que desactivan al macrófago correlacionan con la enfermedad (Kemp et al, 1992). Es por esto que se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la respuesta inmune hacia protección y curación o susceptibilidad y progresión de la enfermedad (Figura 1).

Por otro lado, en LMC se ha descrito el patrón de citocinas como una mezcla de tipo Th1 y Th2 con buenos niveles séricos de IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-5 (Convit et al, 1993). Se ha señalado que el padecimiento en realidad se presenta por una sobreactivación de la respuesta inmune al presentar bajos niveles de IL-10 y que la curación depende más de la relación entre las citocinas producidas más que de la sola presencia o ausencia de citocinas en particular (Desjeux, 2004).

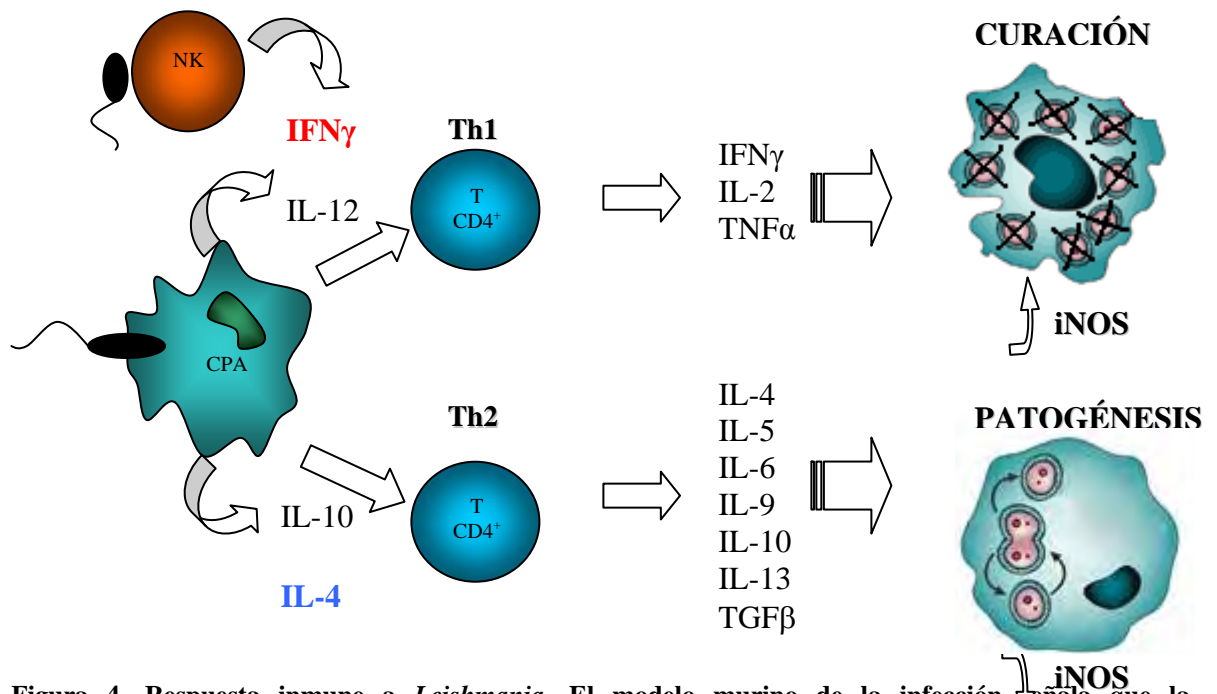


Figura 4. Respuesta inmune a *Leishmania*. El modelo murino de la infección señala que la susceptibilidad y resistencia al patógeno depende del patrón de citocinas expresado por los linfocitos T (ver texto).

En contraste a la idea de funciones antagónicas del IFN $\gamma$  y la IL-4 como determinantes en la protección o la progresión de la enfermedad, recientes estudios enfatizan en el balance de dos citocinas reguladoras de la inflamación, IL-12 e IL-10. Por lo tanto, la participación de las células de la respuesta inmune innata, como células dendríticas (DC), células asesinas naturales (NK) y macrófagos actualmente es estudiada intensamente. Se sabe que la producción de IFN $\gamma$ , IL-12, IL-10 y TGF $\beta$  por estas células en respuesta a *Leishmania* de manera temprana, puede influenciar fuertemente el curso de la infección (Tripathi et al, 2007).

#### 1.4 Células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>.

Las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> cumplen un papel central en la defensa inmune, especialmente contra células infectadas por virus, bacterias y protozoos (Harty et al, 2000), además han sido relacionados con la eliminación de algunas células tumorales y células con MHC I incompatible en trasplantes. Adicionalmente, las células T CD8<sup>+</sup> participan en la patogenia de una amplia variedad de enfermedades (Kägi et al, 1996; Wood et al, 2009). Su función efectora es realizada a través de dos mecanismos básicos: citotoxicidad y liberación de citocinas. Para lograr su función citotóxica, las células T CD8<sup>+</sup> emplean dos mecanismos complementarios, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como perforina, la cual es capaz de insertarse en la membrana lipídica y formar poros, lo que puede resultar en el colapso del potencial de membrana; sin embargo, su papel más importante es el de servir de paso a otras moléculas de los gránulos líticos de la familia de las catepsinas; una de ellas, la granzima B, activa directamente la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasas. El otro mecanismo citotóxico es mediado por la expresión en membrana de FasL/CD95L, el cual induce la trimerización de su receptor Fas/CD95 en las células blanco para inducir apoptosis a través de la activación de la caspasa 8 (Trapani & Smyth, 2002; Chávez-Galán et al, 2009).

Aunque en menor magnitud de lo que ocurre con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, otro mecanismo de participación de las células T CD8<sup>+</sup> es la liberación de citocinas como IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10 (Wooland & Dutton, 2003). El patrón de citocinas así como diferencias en la capacidad migratoria, han señalado la existencia de dos tipos de linfocitos T CD8<sup>+</sup>: Tc1 y Tc2, similar a lo observado con linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 y Th2 (Jiang & Chess, 2004).

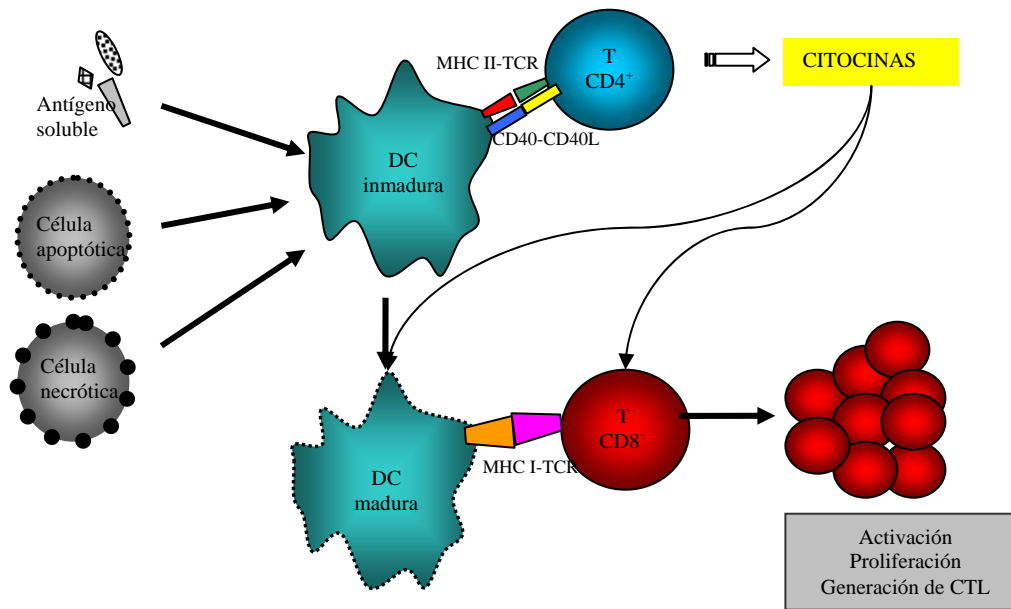
Adicionalmente, se reconoce la existencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> supresores, los cuales están involucrados en la regulación de la respuesta inmune (Billerbeck & Thimme, 2008).

La respuesta específica de las células T CD8<sup>+</sup> contra un patógeno se inicia después del reconocimiento de antígenos presentados adecuadamente por moléculas MHC I y señales derivadas de coestimulación, especialmente a través de CD40 (Bourgeois et al, 2002). Cada una de estas células lleva a cabo más de 15 divisiones celulares para producir una progenie de más de 10<sup>4</sup> en 7 días de estimulación antigénica (Doherty, 1998). Sin embargo, esta respuesta no es totalmente independiente de otros tipos celulares. Las células T CD4<sup>+</sup> y las DC han sido implicadas para una adecuada respuesta de las células T CD8<sup>+</sup>, aunque su participación no ha sido entendida del todo (Melief, 2003). Si bien solo las CPA profesionales pueden dar una adecuada coestimulación a la célula T CD8<sup>+</sup>, en la mayoría de los casos el blanco final no necesariamente son estas mismas CPA. De esta manera, se hace necesario un mecanismo que permita activar a las células T CD8<sup>+</sup> para inducir su expansión clonal, el desarrollo de su función efectora y la generación de memoria. Para ello se ha señalado que existe un proceso regulado de cooperación entre las células T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y DC.

El modelo planteado hasta el momento sobre la participación de DC en la activación de células T CD8<sup>+</sup> señala que las DC capturan el antígeno por varias vías, pueden fagocitarlo directamente si se encuentra libre en el medio extracelular o bien pueden adquirirlo de células apoptóticas o necróticas. Posteriormente lo procesan y presentan vía MHC II a las células T CD4<sup>+</sup>, las cuales sobrerregulan la expresión de CD40L y, a través de la

interacción con CD40, activan a las DC para estimular la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes que reconocen el antígeno-MHC I en las DC (Figura 5) (Smith et al, 2004).

Es posible que algunas células apoptóticas posean CD40L y de esta manera puedan activar directamente las DC sin la presencia de células CD4<sup>+</sup>. De esta forma las DC tendrían la capacidad para activar las células T CD8<sup>+</sup> específicas para los antígenos presentados. Estas células apoptóticas pueden provenir de células T CD40L<sup>+</sup> recientemente activadas que sufren apoptosis una vez que han ejercido su función efectora en un tejido inflamado, o también bajo infección con virus pro-apoptóticos como el VIH (Propato et al, 2001). Por el contrario, si estas células apoptóticas son CD40L<sup>-</sup> y no existe otra célula que provea esta señal, la DC se encontrará en un estado semi-maduro, en donde la presentación de antígeno inducirá estados de tolerancia como delección clonal, anergia o células reguladoras (Accapezzato et al, 2003). Este mecanismo está involucrado con la tolerancia hacia autoantígenos y también podría estar implicado con la baja respuesta hacia antígenos de parásitos que evaden la respuesta inmune regulando negativamente la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Wood et al, 2009).



**Figura 5. Interacción DC-CD4-CD8.** Para la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se requiere del concierto coordinado de estos tres tipos celulares.

### 1.5 Participación de las células T CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis.

Existen evidencias que sugieren un papel importante de células T CD8<sup>+</sup> en la respuesta inmune a protozoarios parásitos, directamente por mecanismos citotóxicos o a través de la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , que son citocinas activadoras de macrófagos y que por lo tanto favorecen la muerte de parásitos intracelulares (Harty et al, 2000; Overstreet et al, 2008; Tarleton, 2007).

En leishmaniasis, la activación de células T CD8<sup>+</sup> se ha asociado con curación. Inicialmente se pensó que su participación se restringía a la reinfección, ya que ratones C57BL/6 (cepa resistente) deficientes en  $\beta$ 2-microglobulina o CD8 mantienen su capacidad para resolver la infección (Huber et al, 2008), igual que los ratones tratados con anticuerpos anti-CD8 (Titus, 1987). Sin embargo, cuando se inocula el parásito en dosis bajas (~100

promastigotes) y por vía intradérmica, similar a la infección natural, las células CD8<sup>+</sup> son requeridas para el control de la infección primaria con *L. major* (Belkaid, 2002) y su papel parece estar involucrado en un cambio de respuesta temprana Th2 a Th1 (Uzonna et al, 2004). De todas formas, se reconoce que la infección por cualquier vía, conlleva a la activación de clonas específicas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Ruiz & Becker, 2007) y de manera importante en respuesta a antígenos de *Leishmania* que inducen inmunidad protectora (Pinheiro et al, 2005; Farajnia et al, 2005).

En la leishmaniasis humana se piensa que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> juegan un papel crucial. Se ha reportado un alto número de células T CD8<sup>+</sup> en lesiones y sangre periférica durante la fase aguda de la infección y el proceso de eliminación de *L. major* (Da-Cruz et al, 2005; Gaafar et al, 1999) y *L. mexicana* (Salaiza et al, 1999). Los pacientes infectados por *L. braziliensis* presentan una mayor proporción de células T CD4<sup>+</sup> que de CD8<sup>+</sup> durante la infección activa y en el proceso curativo esta relación cambia hasta casi llegar al equilibrio al incrementar el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Da-Cruz et al, 2002). En otro estudio se encontró que lesiones de pacientes con LCL infectados con *L. braziliensis*, muestran un alto porcentaje de linfocitos T en apoptosis, y con mayor frecuencia en linfocitos T CD8<sup>+</sup> que en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Por el contrario, las lesiones de pacientes con curación espontánea mostraron muy bajo porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> en apoptosis (Bertho et al, 2000). Adicionalmente se describió un alto porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> *Leishmania*- reactivos en los infiltrados inflamatorios y bajo porcentaje en sangre (Da-Cruz et al, 2005). Conjuntamente estos hallazgos demuestran que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> participan de forma activa y correlacionan con la curación. Sin embargo, en el caso de la infección por *L.*

*braziliensis*, la cronicidad de la infección parece estar definida por la exacerbación de la respuesta celular (Barral-Netto et al, 1995; Brodskyn et al, 1997). Al parecer, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> participan en la regulación de la respuesta al correlacionar alta frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> con tamaño reducido de la lesión generada en la prueba de Montenegro (Antonelli et al, 2005).

Experimentos recientes realizados con células mononucleares de sangre periférica humana, han demostrado que *L. major* induce la producción de IFN $\gamma$  e IL-12, generando así una respuesta Th1. IL-10 se presenta en baja cantidad y al parecer regula la producción de IFN $\gamma$ . El porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> no se altera luego de 7 días de exposición a *Leishmania*, sin embargo la proliferación celular así como la producción de IFN $\gamma$  son drásticamente disminuidas cuando se bloquea la presentación de antígeno vía HLA-I (Gaafar et al, 2005; Roger & Titus, 2004). Esto señalaría que la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> es vital en la producción de IFN $\gamma$ . Este modelo también demuestra la participación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> aunque falta por confirmar su proliferación frente a antígenos de *Leishmania* y determinar los mecanismos efectores que desarrollan.

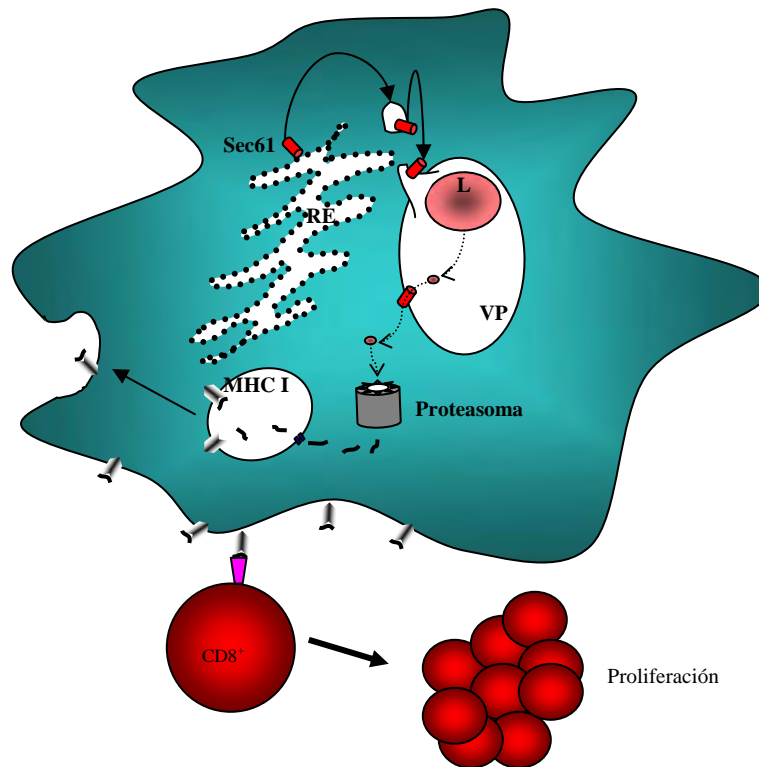
La información disponible describe la activación de clonas específicas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y evidencia su participación en las respuestas que conducen a curación, tanto en ratones como en humanos. Si se piensa en la capacidad heterogénea de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, es posible que también participen en la cronicidad de la infección, no solo exacerbando el daño en el tejido, como el caso de la LMC causada por *L. braziliensis*, sino como origen de



citocinas inhibitoras como IL-10 o TGF $\beta$  (Figura 5) que podrían generar un estado anérgico ante grandes cantidades de antígeno, como se ha sugerido en el caso de la LCD (Salaiza- Suazo et al, 1999). Se han descrito varios subtipos de linfocitos T que expresan el marcador CD8<sup>+</sup>, entre ellos los linfocitos T reguladores CD8<sup>+</sup>, que cuentan con características inhibitoras dependientes e independientes de anticuerpo (Jiang & Chess, 2004; Wang & Alexander, 2009), sin embargo estos subtipos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> aún no han sido estudiados en la leishmaniasis pero es plausible esperar que desempeñen un papel substancial. Existen reportes que describen algunos procesos desempeñados por células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Ji et al, 2005; Kariminia et al, 2005; Peters & Sacks, 2006). Estos procesos son complejos y están relacionados con la contención de respuestas patogénicas generadas por exacerbación de la respuesta celular vía IFN $\gamma$ .

#### 1.6 Rutas de activación de células T CD8<sup>+</sup> en leishmaniasis.

Uno de los puntos de discusión sobre la participación de las células CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis se sitúa en la forma de activación de este subtipo celular. Dado que es necesaria la presentación de antígenos vía MHCI para la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se ha pensado que esta vía participa en la infección por *Leishmania*. El macrófago es la célula hospedera por excelencia y es allí donde la *Leishmania* se desarrolla y prolifera. Sin embargo, existe la duda sobre la vía de presentación de antígenos del parásito.



**Figura 6. Procesamiento de antígenos de *Leishmania* vía MHC I. Mecanismo directo. Traspresentación de antígenos exógenos a través de Sec61. (RE, retículo endoplásmico; L, *Leishmania*; VP, vacuola parasitófora.)**

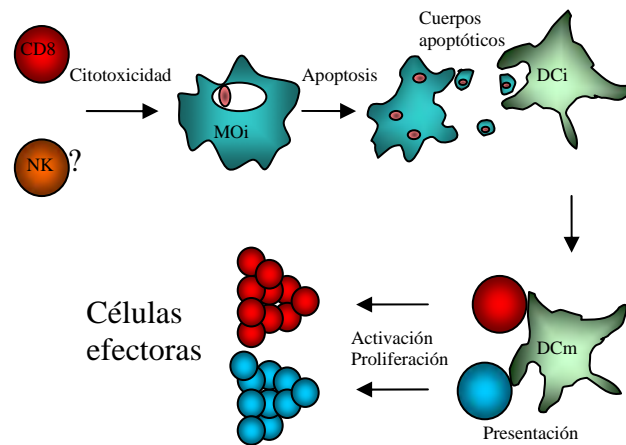
*Leishmania* se alberga dentro de la célula hospedera en un compartimiento fagolisosómico denominado vacuola parasitófora (Antoine et al, 1998; Courret et al, 2002). Aunque se desconoce si el contenido del lumen de la VP puede salir al citosol para ser degradado y transportado al retículo endoplásmico y ser acoplado a moléculas MHC I, se ha descrito en DC y macrófagos una ruta que permite la traslocación de proteínas desde el lumen del fagosoma al citosol y depende de la proteína chaperona Sec61 (Figura 6) (Houde et al, 2003). Este fenómeno se denominó traspresentación y depende de la fusión del fagosoma naciente con el RE (Guermonprez et al, 2003) y se sugirió este sistema de presentación como mecanismo de procesamiento de antígenos de bacterias que se albergan en macrófagos y permitiría la activación específica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> (Kaufmann

& Schaible, 2005). Esta vía permitiría el paso de antígenos de *Leishmania* a través de la membrana de la VP para luego ser procesados por el proteasoma. A la fecha esto es controvertido ya que un reporte describe que los macrófagos infectados con *Leishmania* transfectada con el gen de OVA o la  $\beta$ -galactosidasa, son incapaces de presentar estos antígenos a líneas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos (López et al, 1993).

Por otro lado, se describió que una línea de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos contra el antígeno de superficie de *Leishmania* GP46/M-2, es capaz de reconocer macrófagos infectados con *L. amazonensis*, y debido a que el efecto puede ser bloqueado con brefeldina A o con inhibidores del proteasoma, se sugiere que este antígeno es procesado en el citosol (Kima et al, 1997). Al parecer, sólo los antígenos externos de *Leishmania* pueden alcanzar el citosol del macrófago. Es posible que sean moléculas que el parásito secreta regularmente y no productos de degradación fagolisosomal.

Otra ruta de transpresentación de antígenos exógenos implica la fagocitosis de cuerpos apoptóticos de células infectadas por parte de las DC (Figura 7). Luego de fagocitar cuerpos apoptóticos, las DC adquieren la capacidad de presentar antígenos presentes en dichas células que pueden detectarse entre 2 y 4 horas luego de la fagocitosis (Savina & Amigorena, 2007). Los antígenos deben acceder al citosol para interceptar la vía convencional de MHC-I, lo cual puede suceder por el mecanismo descrito en la figura 6. Este proceso se identificó en la infección por *M. tuberculosis*, donde se demostró que las DC pueden fagocitar apoptosomas de macrófagos infectados y presentar antígenos de

*Mycobacterium* vía MHC-I y CD1b (Schaible et al, 2003). Se discute además que la vacuna de *M. bovis*, BCG, no induce apoptosis en los macrófagos y tal vez ésta sea la causa de la baja eficiencia de la vacunación con BCG (Kaufmann, 2001; Winau et al, 2004). Dada la similitud de esta infección con la leishmaniasis, es posible que este mecanismo también forme parte de la respuesta inmune de esta última. Adicionalmente, se sabe que son las células dendríticas y no los macrófagos, quienes tienen la capacidad de migrar a nódulos linfoides y presentar antígenos de manera eficiente (Banchereau et al, 2000).

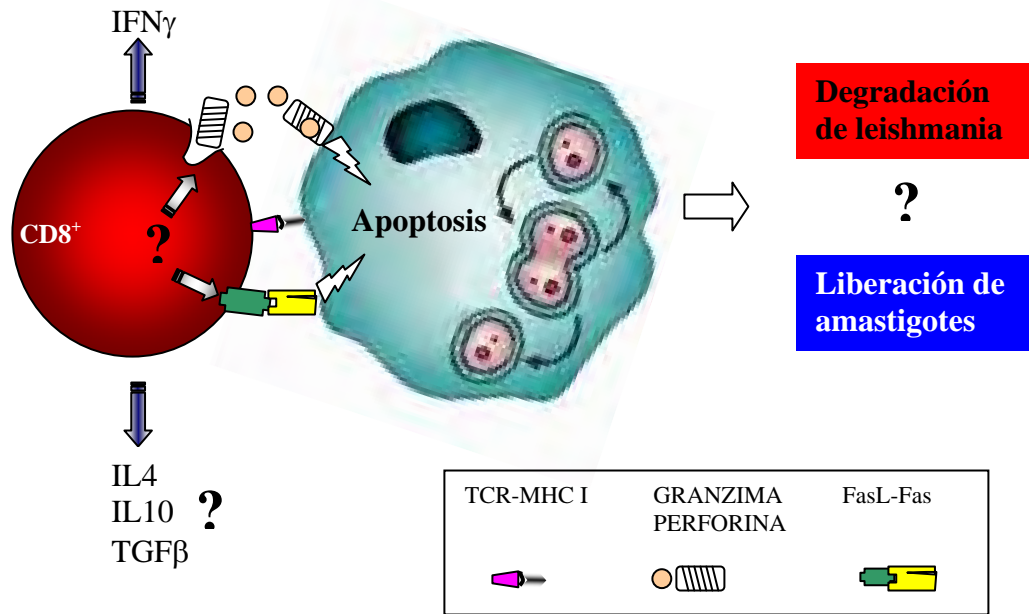


**Figura 7. Procesamiento de antígenos de *Leishmania* vía MHC I. Mecanismo indirecto. Fagocitosis de cuerpos apoptóticos.**

### 1.7 Función efectora de células T CD8<sup>+</sup>

Se ha asumido que la principal función protectora de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es contribuir a la producción de IFN $\gamma$ <sup>16</sup>. Sin embargo, se desconoce si el IFN $\gamma$  producido por los linfocitos CD8<sup>+</sup> activados es requerido para controlar la infección por *Leishmania*. Dado que *Leishmania* es un parásito intracelular, es plausible pensar que la respuesta citotóxica de los

linfocitos T CD8<sup>+</sup> podría coadyuvar a controlar la infección a través de la lisis de macrófagos infectados por la vía de granzima/perforina y/o Fas/FasL (Figura 8) (Ruiz & Becker, 2007).



**Figura 8.** Posibles mecanismos efectores de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis. Se señalan tres interrogantes que hacen referencia al mecanismo de citotoxicidad, al destino de los parásitos intracelulares y a la posibilidad de producción de citocinas inhibitoras.

Existen reportes contradictorios sobre la participación de granzima y perforina en el fenómeno citotóxico. Por un lado, el mecanismo citotóxico de granzima/perforina no parece tener una participación importante en el modelo murino ya que ratones C57BL/6 deficientes en granzima A y/o B resuelven la infección por *L. major* de igual forma que ratones silvestres, tanto en el curso de la infección como en la producción y polarización de citocinas (Conceição et al, 1998; Eisert et al, 2002), aunque se había señalado que las células T activadas en la infección de la cepa susceptible BALB/c comparada con la resistente C57BL/6 no solo diferían en el patrón de citocinas si no también en la expresión

de granzima A (Moll et al, 1991; Frischholz et al, 1994). Por otro lado, en la resolución de la infección el mecanismo de Fas/FasL pudiera estar participando activamente y en paralelo con la activación de los macrófagos. Se ha demostrado que ratones C57BL/6 deficientes en Fas y FasL exhiben un comportamiento susceptible, a pesar de montar una respuesta Th1 con producción de óxido nítrico (Conceição et al, 1998; Alexander et al, 2001; Huang et al, 1998). Además constituye una paradoja para el modelo de Th1/Th2 en susceptibilidad y resistencia, ya que se pensó que la capacidad para resolver la infección recaía en la capacidad para activar los macrófagos. Este hallazgo señala que no es suficiente esta activación y tal vez es necesario eliminar los macrófagos infectados que ya no responden a la activación.

En leishmaniasis humana son pocos los estudios enfocados a evaluar la citotoxicidad mediada por células y éstos han relacionado la citotoxicidad con daño tisular más que con protección, ya que se detectó en pacientes con LMC y no en LC causada por *L. braziliensis* (Barral-Netto et al, 1995; Brodskyn et al, 1997). También se ha descrito que es posible generar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de *Leishmania* a partir de células T vírgenes estimuladas con macrófagos infectados con *L. amazonensis* y éstos son capaces de lisar macrófagos autólogos infectados (Russo et al, 1999). En las lesiones de pacientes con LC infectados con *L. major*, se detectó sobreexpresión de FasL en macrófagos y linfocitos T activados, asociada con expresión de Fas; sin embargo, esto fue relacionado con la formación de la úlcera, ya que se encontró abundantes queratinocitos en apoptosis (Eidsmo et al, 2005). También se ha reportado una correlación entre la citotoxicidad *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de pacientes LC contra macrófagos infectados con *L. major* y

la liberación de granzima B (Boussoffara et al, 2004). Toda la evidencia señala la participación de la citotoxicidad en la respuesta inmune específica y parece relacionarla con la curación. Aún falta determinar la forma en que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> participan en la LCD, en particular si tienen capacidad citotóxica y si producen IFN $\gamma$ . También es necesario confirmar si los linfocitos T CD8 matan macrófagos infectados vía granzima/perforina y/o Fas/FasL y si esta citotoxicidad sobre macrófagos infectados ayuda a controlar la infección. El estudio del papel de la citotoxicidad en la respuesta a *M. tuberculosis* ha revelado que la apoptosis de los macrófagos infectados a través de la liberación de gránulos líticos, genera decremento en la viabilidad de los parásitos (Stenger, 2001). Por la similitud en el patrón de infección y la respuesta inmune desencadenada, cabe esperar que la citotoxicidad y la apoptosis de macrófagos correlacionen con la curación.

#### 1.8 Estado de agotamiento en linfocitos T.

El estado de agotamiento fue descrito inicialmente en ratón como una delección clonal de linfocitos T CD8 específicos de virus que ocurría durante infecciones crónicas de alto grado (Moskophidis et al, 1993). Ahora es claro que las células T no son eliminadas necesariamente bajo condiciones de persistencia antigénica aunque pueden convertirse en ineptas funcionalmente e incapaces de llevar a cabo las actividades efectoras típicamente asociadas con células efectoras y de memoria. (Yi et al, 2010).

El estudio de la condición de agotamiento en el modelo murino de infección crónica por LCMV demuestra que las células CD8 específicas del virus persisten pero carecen de funciones efectoras (Zajac et al, 1998). Las clonas de CD8 son generadas en las primeras

etapas de la infección y desarrollan la capacidad para ejecutar funciones efectoras, sin embargo estas funciones se pierden jerárquicamente conforme el paso del tiempo. La citotoxicidad y la proliferación se pierden en estados tempranos, mientras que la pérdida de la capacidad de producir IFN $\gamma$  requiere más tiempo (Wherry et al, 2003). Tanto la persistencia antigénica (Bucks et al, 2009) como IL-10 y TGF $\beta$  (Yi et al, 2010) han sido señalados como inductores de la condición de agotamiento, sin embargo aún no está definido si estas citocinas son determinantes universales.

Una de las moléculas fuertemente asociadas con la condición de agotamiento es PD-1 (Programmed Death-1/CD279). PD-1 pertenece a la familia de CD28 y su significado en la condición de agotamiento fue descubierto en un análisis de microarreglos del perfil de expresión génica de linfocitos T CD8 específicos de virus durante la infección crónica por LCMV (Barber et al, 2006). PD-1 participa en el establecimiento de la tolerancia periférica e inhibe la proliferación y función de las células T. Dado que PD-1 se expresa abundantemente sobre las células T exhaustas, mientras que sólo se expresa de manera transitoria y leve en células T efectoras durante infecciones agudas y no está presente en células T de memoria funcionalmente competentes (Yi et al, 2010), se ha usado como un marcador de células agotadas.

La restauración de las células exhaustas es una línea promisoría que apunta al desarrollo de tratamientos inmunomoduladores en diferentes patologías. En particular el uso de anticuerpos contra los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2), evitan la activación de PD1 y de



esta manera revierten la condición agotada de los linfocitos T CD8 observada en la infección por HCV (Nakamoto et al, 2008; Watanabe et al, 2010). Al parecer, es suficiente la señal de TCR y CD28 en ausencia de la señal de PD-1 para rescatar las células T CD8 de su estado de agotamiento. También en el modelo de *L. donovani* en ratón se ha utilizado el bloqueo de la unión PD-1/PD-L1 para restaurar las células CD8 exhaustas y tal método confiere protección (Joshi et al, 2009).

El uso de otros métodos para rescatar las células exhaustas está menos estudiado. El grupo de Wong y Col (Wong et al, 2009) demostró en vacunación terapéutica que el ligando de TLR9, CpG ODN, reduce la expresión de PD-1 sobre los linfocitos CD8 específicos del epítipo y aumenta la función *ex vivo*. Sin embargo aún no se ha probado en infecciones intracelulares crónicas.

En resumen, aun hay mucha controversia sobre la participación de los linfocitos CD8 en la leishmaniasis humana. Estas células han sido asociadas con protección y también con daño tisular. Adicionalmente se desconoce, si los linfocitos CD8 de pacientes con LCD, que cursan con altas cargas parasitarias e infecciones crónicas, puedan presentar alteraciones en la capacidad efectora, similar al estado exhausto descrito para otras infecciones crónicas. El estudio comparativo de los mecanismos efectores de linfocitos CD8 entre pacientes con cuadros clínicos opuestos, LCL y LCD, permitirá obtener mayor claridad sobre la participación de linfocitos TCD8 en esta parasitosis.

## **2. HIPÓTESIS**

La capacidad efectora de los linfocitos CD8 se asocia con el pronóstico de la leishmaniasis, por lo cual los linfocitos CD8 de pacientes LCL presentan mayor capacidad citotóxica contra MOi, mayor producción de IFN $\gamma$  y proliferación, que los de pacientes LCD y en las lesiones de éstos existe un mayor número de células en apoptosis, especialmente macrófagos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la función efectora de los linfocitos CD8 periféricos de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa, frente a macrófagos autólogos infectados con *L. mexicana*.

### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar y comparar la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8 contra MOi entre pacientes LCL y LCD.
2. Estudiar el posible mecanismo citotóxico involucrado.
3. Analizar y comparar la capacidad proliferativa y la producción de IFN $\gamma$  de linfocitos T CD8 retados con MOi, entre pacientes LCL y LCD.
4. Evaluar la presencia de células en apoptosis en las lesiones de pacientes LCL y LCD.

5.- Evaluar si la apoptosis de macrófagos infectados afecta la sobrevivencia del amastigote de *Leishmania*.

#### 4. METODOLOGÍA

Se estudiaron 10 pacientes con LCL y 4 con LCD. Todos provienen de la comunidad de Comalcalco – Tabasco, excepto un LCD el cual proviene de Lázaro Cárdenas – Michoacán. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado y recibieron tratamiento con Glucantime.

Los datos de la cohorte estudiada aparecen a continuación.

	LCL	LCD
N	10	4
% femenino	40%	25%
Edad promedio	34.6 ± 13.9	46 ± 12.9

El criterio de diagnóstico se basó en parámetros clínicos, presencia histopatológica de *Leishmania* e inmunorreacción positiva a la prueba de Montenegro para el caso de pacientes LCL. Los pacientes LCL se caracterizaron por la presencia de lesiones cutáneas ulcerativas con pocos parásitos y fueron positivos a la prueba de Montenegro, mientras los pacientes LCD presentaron múltiples nódulos no ulcerativos con gran carga de parásitos y fueron negativos a la prueba de Montenegro.

De cada paciente se obtuvieron 50 mL de sangre periférica en tubos con EDTA (BD Biosciencias) y una biopsia cutánea de la lesión con *punch* de 4mm (Stiefel Laboratories, Coral Gables, FL, EEUU) luego de anestesia local con 2% de xilocaína. Las biopsias fueron embebidas en OCT (Miles Scientific, Napperville, IL) y almacenadas en nitrógeno líquido.

#### 4.1 Cultivo de *Leishmania mexicana*.

Promastigotes de *L. mexicana mexicana* (MHOM/MX/92/UADY/68) se cultivaron a 28°C en medio RPMI-1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MA, EEUU) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado,. Los parásitos fueron recultivados cada 4-5 días hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^6$ /mL. Los promastigotes se cosecharon en la fase estacionaria, se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min, se lavaron 3 veces en PBS y finamente se contaron en glicerol.

#### 4.2 Purificación de linfocitos CD8 y macrófagos.

La sangre obtenida de pacientes en Tabasco fue enviada por correo certificado a 4°C hasta el Departamento de Medicina Experimental del Hospital General de México donde fue procesada para extracción de células mononucleares (PBMC), usualmente 24 horas después después de ser obtenida, 25 mL de sangre fueron puestos sobre 20 mL de Ficoll-Hipaque (Sigma), se centrifugó a 2000 rpm, 20 min a 20°C. La monocapa fue extraída con pipeta y transferida a un tubo cónico de 50 mL. El plasma se guardó para ser usado posteriormente. La monocapa se lavó dos veces con PBS y se centrifugó una vez más sobre 20 mL de plasma autólogo a 850 rpm, 10 min a 20°C. Se lavó de nuevo en PBS y se realizó conteo

celular en cámara de Neubauer. Después se procedió a extraer linfocitos CD8 mediante el protocolo descrito por el kit de separación (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania). Brevemente, se incubaron  $1 \times 10^7$  células en 40  $\mu$ L PBS con 10  $\mu$ L de anticuerpo anti-CD8 acoplado a microesferas magnetizadas por 30 min a 4°C en oscuridad. Después se lavaron en 20 volúmenes de PBS y se resuspendieron en 1 mL de PBS por cada  $1 \times 10^8$  células. Luego se pasó por una columna LS (Miltenyi). La fracción positiva fue cultivada en RPMI/SFB 10%. La fracción negativa fue procesada de nuevo para extraer macrófagos ( $1 \times 10^7$  células en 40  $\mu$ l PBS con 10 $\mu$ l anti-CD14 conjugado con perlas magnéticas). Así mismo, la fracción positiva fue cultivada en RPMI/SFB 10%. Las células purificadas fueron mantenidas en cámara de cultivo celular por 12 h sin estímulos, antes de continuar con los diferentes experimentos. La pureza se evaluó por citometría de flujo con anticuerpos contra CD3, CD8 o CD14, la que usualmente se encontró entre 85-92%.

#### 4.3 Infección de macrófagos.

$1 \times 10^6$  macrófagos purificados fueron incubados con  $1 \times 10^7$  promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* por 3h a 25°C y por 18h más a 37°C. Posteriormente se lavó tres veces con PBS para retirar los parásitos extracelulares. Estos macrófagos infectados (MOi) fueron utilizados para retos citotóxicos, activación de PBMC para ensayos de proliferación y producción de IFN $\gamma$  por células CD8, y ensayos de evaluación del efecto de la apoptosis del MOi sobre la sobrevivencia de los parásitos.

#### 4.4 Reto citotóxico.

Para evaluar la muerte de MOi inducida por los linfocitos CD8, se realizó una adaptación de la técnica descrita por Fischer et al (2002). Se co-incubaron  $1 \times 10^6$  linfocitos CD8 con  $1 \times 10^5$  MOi autólogos. Como controles se incluyeron retos CD8 + MO, o sólo MOi o MO. Se sembraron en placas de 24 pozos de baja adherencia, se centrifugaron a 600 rpm por 1 min y se incubaron a 37°C por 4h. Luego se cosecharon las células y se marcaron con anti-CD14 PE y 15 min después con anexina V- FITC y 7AAD, de acuerdo a las especificaciones técnicas del proveedor (BD Biosciences). Las células fueron analizadas en un FACSort. Se evaluó la expresión de anexina V + dentro de las células CD14+. Se registró el dato como porcentaje y se obtuvo un índice de citotoxicidad (C.I.) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$C.I. = (CD14^+ \text{ anexina } V^+) \text{ CD8+MOi} - (CD14^+ \text{ anexina } V^+) \text{ CD8+MO}$ . En un experimento paralelo, se marcó con anti-perforina – PE o anti-granzima – Alexa 647 (BD Biosciences).

#### 4.5 Ensayo de proliferación.

$1 \times 10^6$  PBMC se marcaron previamente con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA)  $2 \mu\text{M}$  (Sigma) y se lavaron tres veces. Posteriormente fueron adicionados  $2 \times 10^5$  MOi e incubados por 7 días. Como control se utilizó concanavalina A (Sigma)  $0.26 \mu\text{M}$ . Las células fueron cosechadas y marcadas con anti-CD3 Cy-Chrome y anti-CD8 PE (BD). Se evaluó en FACSort el porcentaje de células  $CD3^+CD8^+CFDA^{\text{low}}$ .

#### 4.6 Producción de IFN $\gamma$ .

1x10<sup>6</sup> PBMC se coincubaron con 2x10<sup>5</sup> MOi por 18h. Luego se adicionó GolgiPlug (BD) por 5h más. Finalmente se cosecharon las células y se marcaron con anti-CD8 PE, se permeabilizaron con Perm/Wash (BD) y se marcaron con anti-IFN $\gamma$  – PECy7. Se analizó la expresión de fluorescencia en un citómetro de flujo FACScalibur (BD). Paralelamente en los ensayos de reto citotóxico se recogió el sobrenadante y se evaluó la concentración de IFN $\gamma$  por ELISA sándwich estándar. Brevemente, una placa de 96 pozos (Costar, Corning, NY, EEUU) fue cubierta con anticuerpos anti-IFN $\gamma$  de captura (clona NIB42, 6  $\mu$ g/mL; BD PharMingen) en 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9.0 por 12 h a 4 °C, y bloqueado con PBS 0.05% de Tween 20 y 10% SFB. Los sobrenadantes y el hIFN $\gamma$  recombinante estándar (R&D Systems) fueron incubados en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB por 2 h a temperatura ambiente. El hIFN $\gamma$  fue detectado con anticuerpo biotinado anti-hIFN $\gamma$  de ratón (clona 4S.B3, 2  $\mu$ g/mL; BD Pharmingen) en 1% BSA por 1h. La placa fue revelada usando conjugado fosfatasa alcalina – estreptavidina (Life Technologies) con *p*-nitrophenil fosfato (4 mg/ml, Life Technologies) como sustrato. Se leyó la absorbancia a 405 nm usando un lector de placas y se calculó la concentración de IFN $\gamma$  a partir de la curva estándar de hIFN $\gamma$  recombinante. La concentración de IFN $\gamma$  en cada muestra fue calculada por regresión lineal usando la absorbancia media (Promedio de tres lecturas de cada muestra). El límite de detección fue de  $\sim$ 15 pg/mL.

#### 4.7 Inmunohistoquímica

Las biopsias congeladas se cortaron en criostato y se secaron toda la noche antes de la tinción. Se utilizó la técnica de TUNEL para detectar células apoptóticas en las lesiones de 7 pacientes LCL y 5 LCD con el kit *In situ cell death detection, POD* (Roche). Las secciones de 4  $\mu\text{m}$  fueron colocadas en láminas de vidrio, fijadas en paraformaldehído 4% en PBS pH 7.4 por 20 min, lavadas 30 min con PBS e incubadas con solución de permeabilización por 2 min en hielo. Las muestras se lavaron dos veces en PBS y posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción de TUNEL (Tdt polimerasa, ATP, d-UTP FITC) y se incubaron por 60 min a 37° C, 100% humedad y oscuridad. Se lavo tres veces con PBS y se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de covertedor POD (anticuerpo anti-FITC conjugado con peroxidasa) y se incubó en cámara húmeda por 30 min a 37°C. Luego se lavaron las muestras dos veces con PBS, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de sustrato DAB, se incubó por 10 min a 25°C y se lavó tres veces en PBS. Por último las muestras se montaron con cubreobjetos y se analizaron en microscopía de luz. En seis muestras de pacientes LCL se realizó doble marcaje para determinar el daño al DNA en macrófagos, para lo cual se realizó primero el procedimiento descrito para TUNEL y luego las muestras se lavaron en Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4; posteriormente se bloqueó con Blotto (leche en polvo 5%, Twin 20 0,1% en PBS, pH 7,4) por 30 min a temperatura ambiente (TA). Las muestras se incubaron con anticuerpo anti-CD68 ratón anti-humano (1:100; DAKO, Santa Bárbara, CA, EEUU) durante 1 hora en cámara húmeda a TA. Se lavó por 5 min en Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, se incubó con anticuerpo secundario cabra anti-ratón conjugado con biotina (1:50; DAKO) por 1 hora y con el complejo preformado estreptavidina-biotina fosfatasa alcalina (DAKO) por 1 hora más a temperatura ambiente.



La presencia de fosfatasa alcalina fue evidenciada por incubación con solución de sustrato AP con 1 mM de levamisol por 30 min y se lavó dos veces con agua destilada. Finalmente se realizó contratinción con H&E (Sigma) y se analizó por microscopía de luz. Las células apoptóticas se identificaron por el color café y los macrófagos en rojo.

4.8 Efecto de la apoptosis del macrófago infectado sobre la sobrevivencia de los parásitos recuperados.

$1 \times 10^5$  MOi de donadores sanos, fueron cultivados en RPMI/SFB e incubados con anti Fas (Santa Cruz Biotechnology)  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , Camptotecina (Sigma)  $5 \mu\text{M}$  o privación de suero (cultivo en RPMI 1640 sin SFB) a  $37^\circ\text{C}$ . El experimento se corrió en duplicado para evaluar tanto la apoptosis inducida en un grupo, como el efecto sobre el número de leishmanias recuperadas en el otro. Al cabo de 24 horas se cosecharon las células de un grupo y se marcaron con anexina V-FITC y 7AAD de acuerdo a las especificaciones técnicas del proveedor (BD Biosciences). Las células fueron analizadas en un FACSsort. Al otro grupo se le retiró el medio de cultivo, se lavó tres veces con PBS y se adicionó medio de cultivo de leishmanias, 1 mL por pozo, y se cultivó por 24 horas más a  $25^\circ\text{C}$ . Finalmente se resuspendió cada pozo de cultivo con pipeta, se tomaron  $10 \mu\text{L}$  del sobrenadante y se diluyeron 10 veces en glutaraldehído para realizar conteo de parásitos libres en cámara de Neubauer.

4.9 Estimulación con ligandos de TLR2.

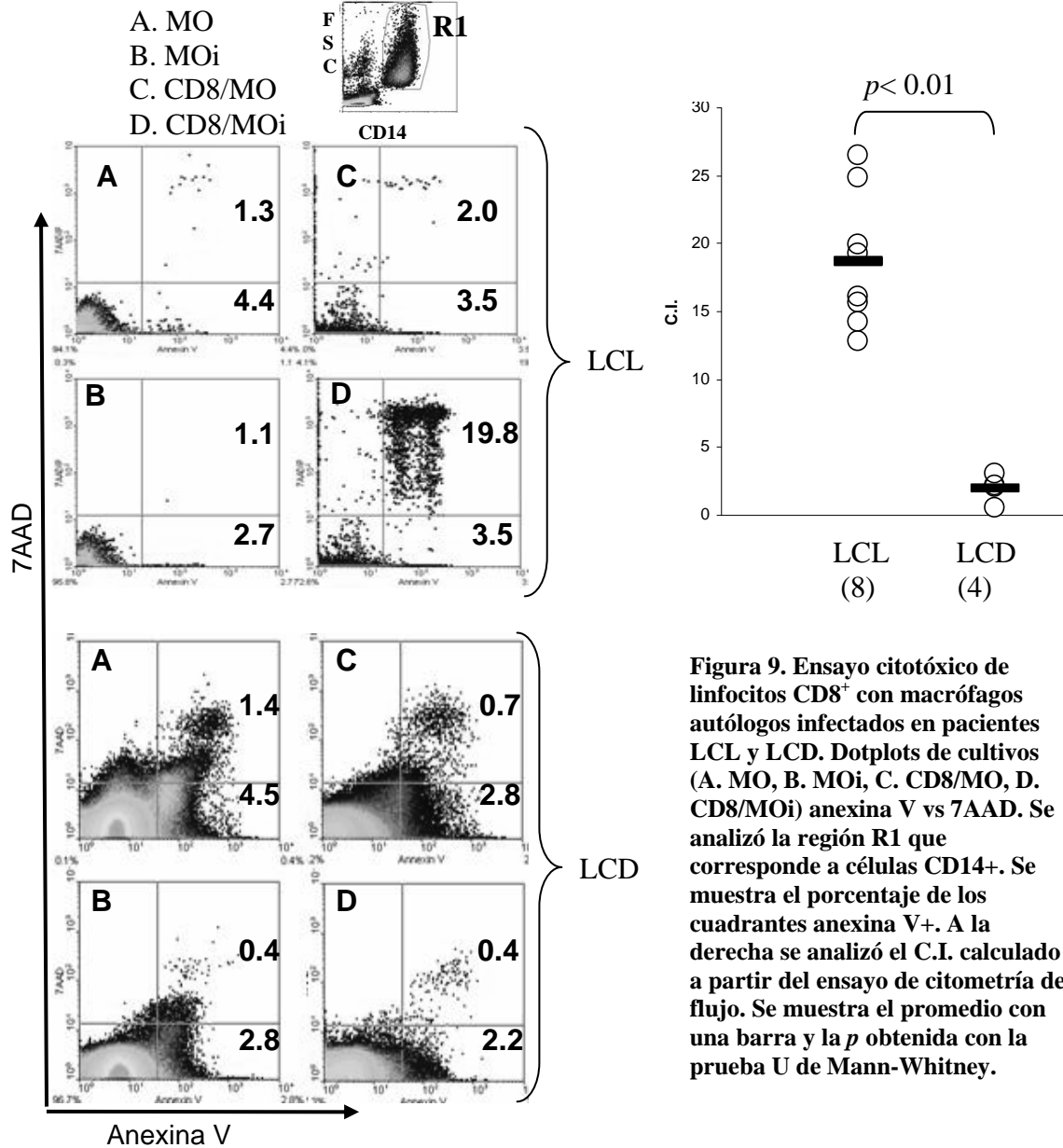
LPG de *L. mexicana* fue purificada por el método descrito en Becker et al, 2003.  $1 \times 10^6$  linfocitos CD8 purificados de pacientes LCD fueron estimulados con LPG de

promastigotes de *L. mexicana* 10  $\mu$ M o con Pam(3)Cys (EMC Microcollection GmbH, Tubingen, Alemania) 2 $\mu$ M por 18 h. Posteriormente se cosecharon y fueron utilizadas para retos citotóxicos directamente. Para los ensayos de proliferación y producción de IFN $\gamma$ , 1x10<sup>5</sup> células CD8<sup>+</sup> purificadas y preestimuladas fueron reunidas con 9x10<sup>5</sup> PBMC CD8-CD14- que se guardaron del proceso de purificación y se repitió el proceso descrito arriba. Adicionalmente se realizó un ensayo similar al de proliferación pero sin marcar con CFDA y luego de cosechar las células, se marcaron con anti-CD8 PE, anti-CD3 Cycrome y anti-PD1 FITC.

Los datos se presentan como medias con desviación estándar. El análisis estadístico utilizado fue U de Mann Whitney. Se tomó como diferencia significativa cuando la  $p < 0.01$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Los linfocitos T CD8 de pacientes con LCL tienen mayor capacidad citotóxica.



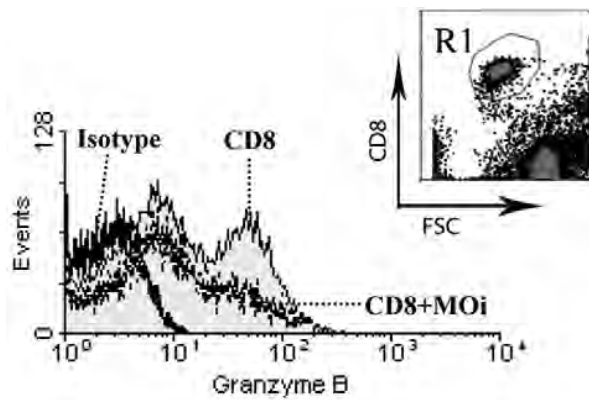
**Figura 9. Ensayo citotóxico de linfocitos CD8<sup>+</sup> con macrófagos autólogos infectados en pacientes LCL y LCD. Dotplots de cultivos (A. MO, B. MOi, C. CD8/MO, D. CD8/MOi) anexina V vs 7AAD. Se analizó la región R1 que corresponde a células CD14<sup>+</sup>. Se muestra el porcentaje de los cuadrantes anexina V<sup>+</sup>. A la derecha se analizó el C.I. calculado a partir del ensayo de citometría de flujo. Se muestra el promedio con una barra y la *p* obtenida con la prueba U de Mann-Whitney.**

Se evaluó la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8 de sangre periférica de pacientes LCL y LCD por citometría de flujo (Figura 9). El análisis permite observar cuatro subgrupos, 7AAD<sup>+</sup> anexina V<sup>-</sup>, 7AAD<sup>+</sup> anexina V<sup>+</sup>, 7AAD<sup>-</sup> anexina V<sup>-</sup> y 7AAD<sup>-</sup> anexina

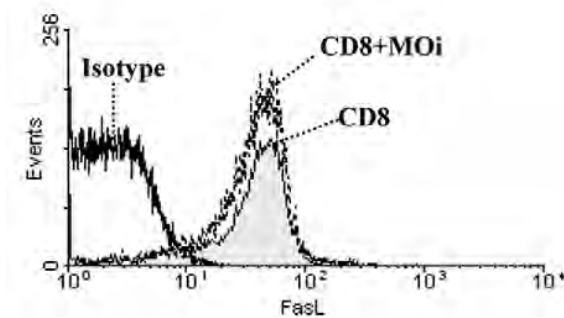
V<sup>+</sup>. Dado que 7AAD ingresa a las células necróticas y la anexina V se une a fosfatidilserina (Fisher et al, 2002), las células muertas pueden ser consideradas como 7AAD<sup>+</sup> anexina V<sup>-</sup>, 7AAD<sup>+</sup> anexina V<sup>+</sup> y 7AAD<sup>-</sup> anexina V<sup>+</sup>, sin embargo es habitual registrar solo los grupos 7AAD<sup>+</sup> anexina V<sup>+</sup> y 7AAD<sup>-</sup> anexina V<sup>+</sup> ya que ambos involucran muerte apoptótica y por lo tanto, más específica. La muerte necrótica 7AAD<sup>+</sup> anexina V<sup>-</sup> puede ser debida en mayor parte al procedimiento de cultivo y cosecha. En este estudio la capacidad citotóxica específica de las células T CD8 es tomada como el porcentaje de macrófagos infectados muertos en cocultivo con células CD8<sup>+</sup> (Figura 9D) tomando como control los macrófagos sin infección muertos en cocultivo con células CD8<sup>+</sup> (Figura 9C). De esta manera se puede observar que los linfocitos CD8 de pacientes LCL exhibieron una mayor capacidad citotóxica que los pacientes LCD ( $p < 0.01$ ), siendo la de éstos estos últimos casi nula. La muerte de macrófagos (Figura 9A) o de macrófagos infectados (Figura 9B) siempre registró valores menores al 7%.

## 5.2 Los linfocitos CD8 usan granzima B para eliminar a los macrófagos infectados.

Para determinar el mecanismo utilizado por los linfocitos CD8 para matar los macrófagos infectados, se evaluó la expresión de granzima B y de FasL en los linfocitos CD8 antes y después del reto citotóxico con macrófagos infectados en pacientes LCL (Figura 10). Sólo la expresión de granzima B se redujo luego del reto citotóxico, lo que sugiere que la citotoxicidad observada está mediada por liberación de gránulos citotóxicos.

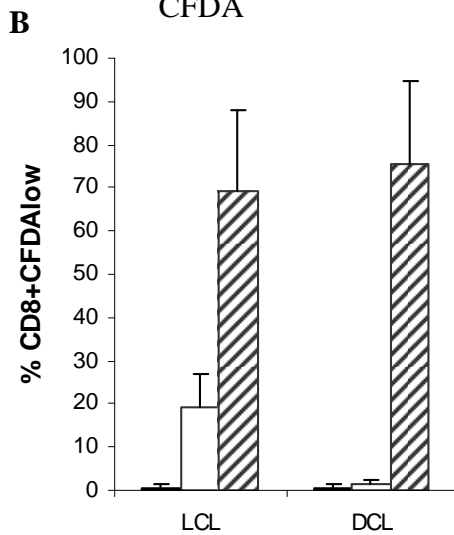
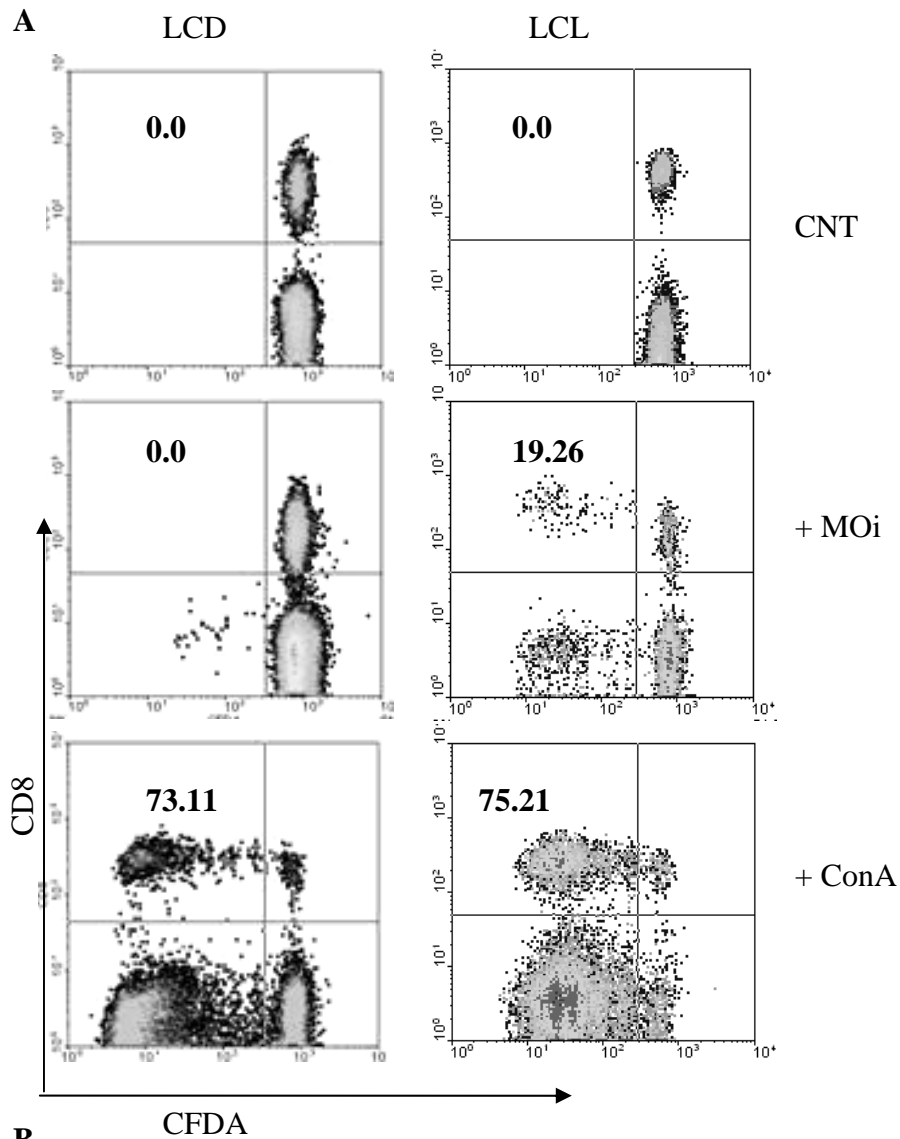


**Figura 10. Mecanismo citotóxico.** Linfocitos CD8 de pacientes LCL fueron marcados contra granzima B (arriba) o FasL (abajo) solos o en cocultivo con MOi 1:1 por 4h. Se analizó la R1 obtenida de la gráfica de puntos arriba. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.



5.3 Solo los linfocitos CD8 de patients con LCL proliferan en presencia de macrófagos infectados.

Se evaluó la proliferación de linfocitos T CD8 en cultivos de PBMC con macrófagos infectados. A los siete días de cultivo fue detectable en pacientes LCL un grupo de células



**Figura 11. Proliferación de linfocitos de pacientes LCL y DCL.** PBMC marcadas con CFDA fueron incubadas con MOi con *L. mexicana* o concanavalina A [5 $\mu$ M] o PBS por siete días. Se muestran los porcentajes de células CFDA<sup>low</sup> del total de linfocitos T CD8. Dotplots representativos (A). Análisis de proliferación de linfocitos CD8 de 7 pacientes LCL y 3 DCL estimulados con PBS (barras negras), MOi (barras blancas) o Concanavalina A (barras rayadas).

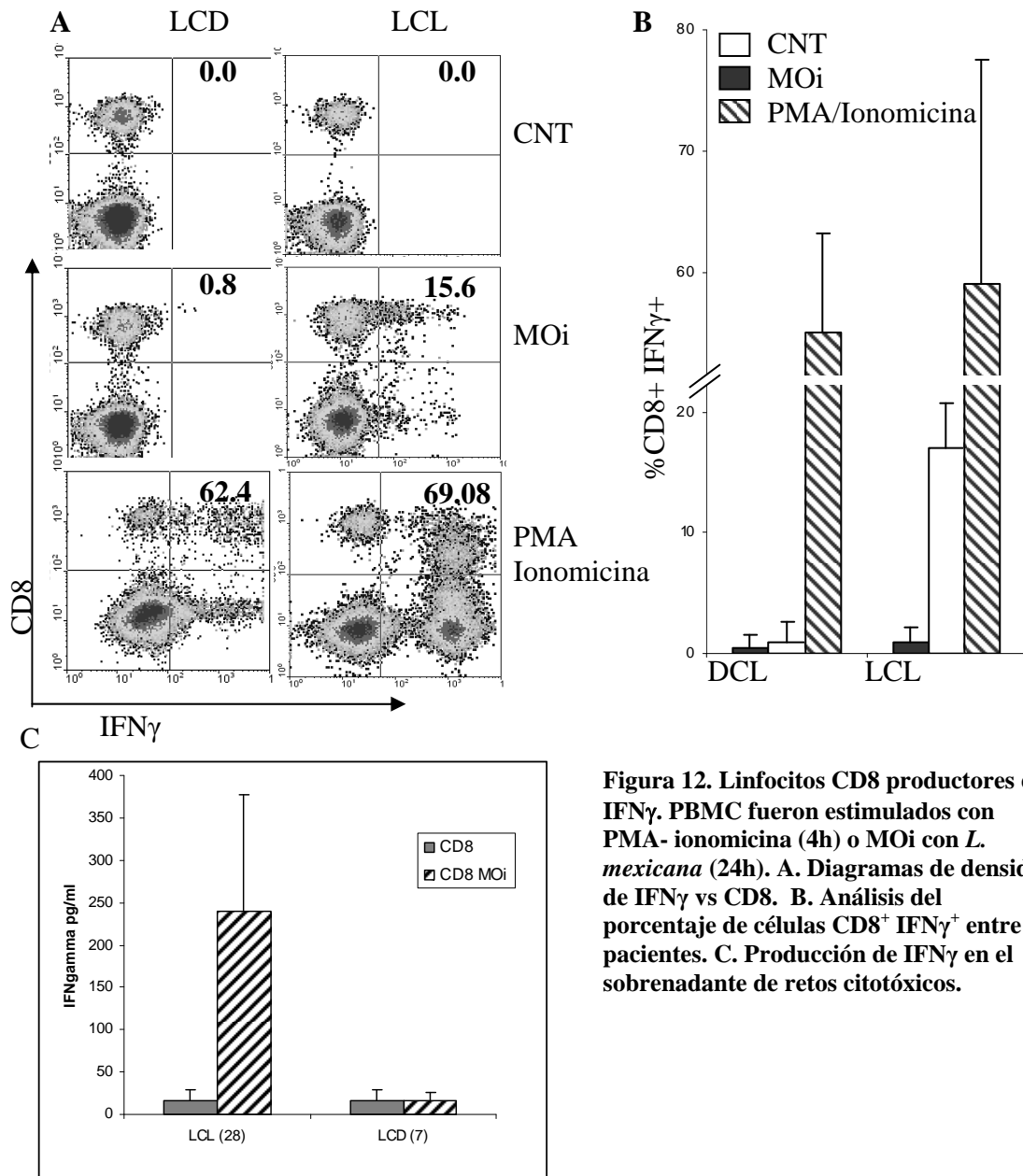
CD8<sup>+</sup>CFDA<sup>low</sup>, el cuál corresponde a células que proliferaron por el estímulo de MO infectados (Figura 11). En pacientes LCD este grupo no se encontró, aunque se registró un grupo CD8<sup>-</sup>CFDA<sup>low</sup>, lo cual puede deberse a proliferación de células CD4.

#### 5.4 Solo los linfocitos T CD8 de pacientes con LCL son productores de IFN $\gamma$ .

Para evaluar el subtipo de linfocitos T CD8 que se diferencian al estimular con MO infectados, se realizó un ensayo *in vitro* por 24 h, luego de las cuales se marcaron intracelularmente para IFN $\gamma$ . De nuevo, solo las células de los pacientes LCL mostraron una respuesta al estímulo (Figuras 12A y 12B). Este grupo de células CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> no fue detectable en pacientes LCD. También se midió IFN $\gamma$  en el sobrenadante de los cocultivos, el cual sólo se detectó en pacientes LCL (Figura 12C).

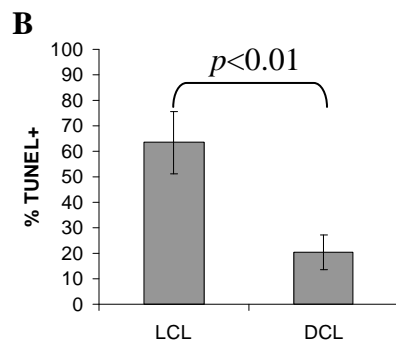
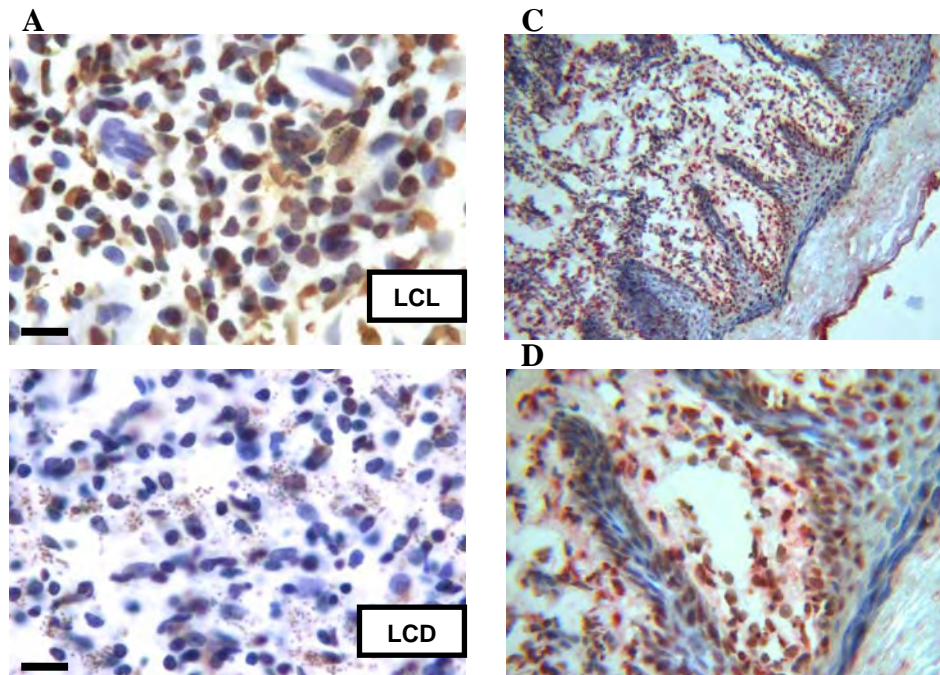
#### 5.5 Los tejidos de pacientes con LCL muestran gran proporción de células apoptóticas.

Se evaluó la presencia de células apoptóticas en lesiones de piel de pacientes LCL y LCD por inmunohistoquímica de TUNEL (Figura 13A). La tinción reveló una alta expresión de células en apoptosis en los tejidos de los pacientes LCL (63.42%, sd=12.08) y fue mayor que en pacientes LCD (20.46%, sd=6.91) (p<0.01) (Figura 13B). El doble marcaje en pacientes LCL reveló que una buena parte de los macrófagos se encuentra en apoptosis (Figuras 13C y 13D).



**Figura 12.** Linfocitos CD8 productores de IFN $\gamma$ . PBMC fueron estimulados con PMA- ionicina (4h) o MOi con *L. mexicana* (24h). A. Diagramas de densidad de IFN $\gamma$  vs CD8. B. Análisis del porcentaje de células CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> entre pacientes. C. Producción de IFN $\gamma$  en el sobrenadante de retos citotóxicos.



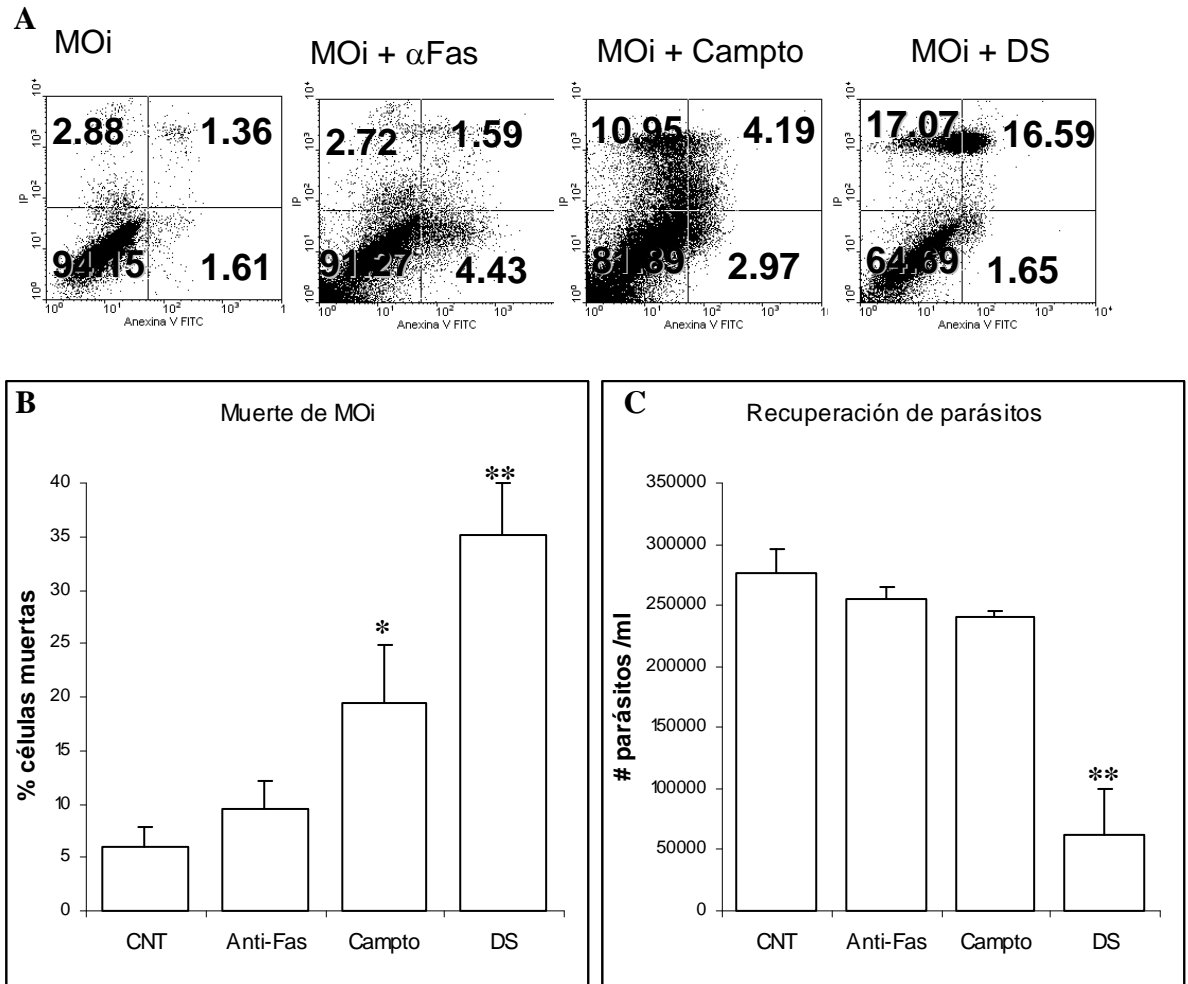


**Figura 13. Apoptosis en la lesión de pacientes LCL y LCD. Cortes de tejido congelado fueron teñidos mediante TUNEL. Se presenta dos fotos representativas. La barra corresponde a 20  $\mu$ m (A). Se contaron tres campos, 200 células en cada campo de 7 pacientes LCL y 5 DCL. Se presenta el análisis de los porcentajes positivos para TUNEL (B). C y D Doble tinción, TUNEL en peroxidada (café), CD68 en fosfatasa (rojo).**

### 5.6 Efecto de la apoptosis del macrófago infectado sobre la sobrevivencia de los parásitos recuperados.

Para indagar sobre el efecto de la apoptosis sobre el parásito, se realizó un ensayo de recuperación de parásitos en cultivos de macrófagos infectados e inducidos a sufrir muerte celular por diferentes estímulos (Figura 14). El tratamiento con anticuerpo anti-Fas no logró inducir muerte celular y el resultado con camptotecina fue leve (CNT = 6.06%  $\pm$  1.75 vs Campto = 19.4%  $\pm$  5.47,  $p = 0.021$ ) (Figuras 14A y 14B); solo la privación de suero logró

inducir un alto porcentaje de muerte (CNT = 6.06 %  $\pm$  1.75 vs DS = 35.2 %  $\pm$  4.83,  $p = 0.001$ ); de la misma forma, se observó una disminución significativa en la recuperación de parásitos sólo en el grupo con privación de suero (CNT = 275,603  $\pm$  21,130 vs DS = 62,050  $\pm$  37,416;  $p = 0.001$ ) (Figura 14C).

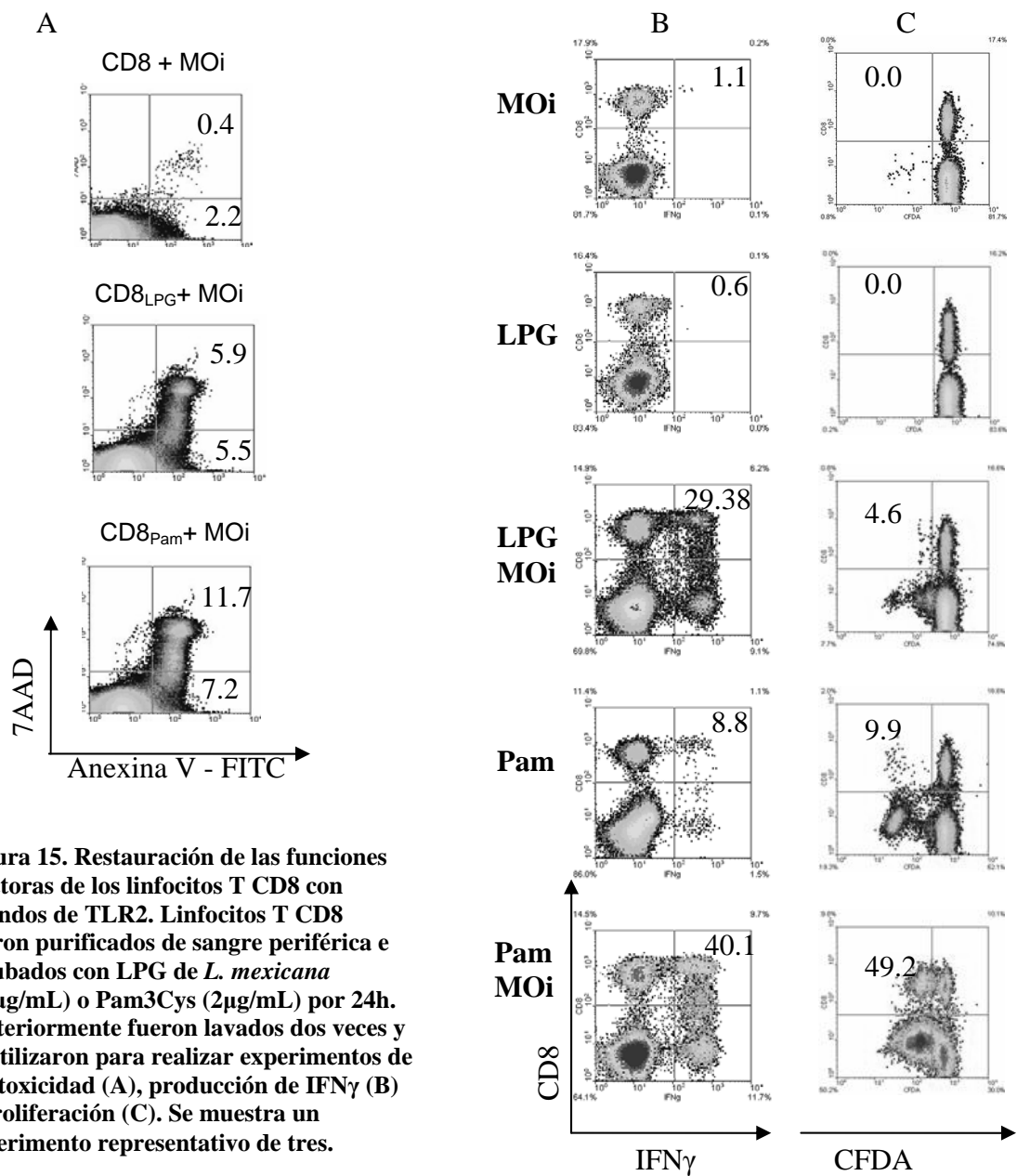


**Figura 14. Muerte de MOi y su efecto sobre la recuperación de parásitos.** MOi fueron incubados con estímulos apoptóticos (anti Fas 1 $\mu$ g/mL, Camptotecina 5 $\mu$ M o privación de suero). La muerte celular fue evaluada por anexina V e yoduro de propidio (A), se muestra el porcentaje de células en cada cuadrante. El análisis de tres experimentos independientes (B) \* Diferencia significativa entre CNT y Campto,  $p < 0.05$ . \*\* Diferencias significativas entre DS y CNT, DS y Anti-Fas, y DS y Campto,  $p < 0.01$ . La recuperación de parásitos (C) solo mostró diferencia significativa en el grupo DS, \*\*  $p < 0.01$ .

En resumen, las células CD8 de pacientes LCD no proliferaron ni fueron citotóxicas contra macrófagos autólogos infectados, ni tampoco produjeron IFN $\gamma$  en respuesta al estímulo específico. Esta condición se asemeja a la que presentan células CD8 de pacientes con cáncer o con infecciones virales crónicas como con HBV, HCV y HIV (Shin & Wherry, 2007).

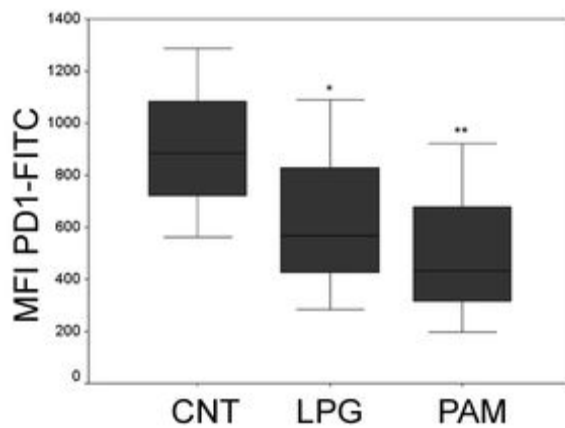
#### 5.7 Evaluación del estímulo de TLR2 en células CD8 de pacientes LCD.

Dado que en los experimentos de proliferación y de producción de IFN $\gamma$  los pacientes LCD reaccionaron positivamente al estímulo con concanavalina A o PMA/ionomicina (Figuras 11 y 12), es claro que la maquinaria celular de proliferación y producción de IFN $\gamma$  no se ve afectada por la infección. Por lo tanto, pensamos en la posibilidad de restaurar la capacidad efectora de los linfocitos CD8 con estímulos adicionales. El TLR2 es un receptor recientemente descrito en linfocitos T y se sabe que en linfocitos T CD8 desencadena una respuesta activadora similar a la mediada por CD28 (Komai-Koma et al, 2004). Puesto que nuestro grupo previamente demostró que el lipofosfoglicano (LPG), la molécula más abundante en la superficie de *Leishmania*, es ligando de TLR2 en células NK humanas y las induce a producir IFN $\gamma$  (Becker et al, 2003), se evaluó la citotoxicidad, proliferación y producción de IFN $\gamma$  en linfocitos CD8 de pacientes LCD estimulados previamente con LPG o Pam3Cys por 24h. Encontramos una recuperación significativa en la capacidad efectora, tanto en la citotoxicidad, la proliferación y en producción de IFN $\gamma$  de los linfocitos CD8 de pacientes con LCD, aunque no se alcanzaron los valores registrados para pacientes con LCL (Figura 15).



En la condición de agotamiento descrita en infecciones virales y cáncer (Shin & Wherry, 2007; Bucks et al, 2009) tampoco se observa actividad citotóxica, proliferación o producción de citocinas en linfocitos T CD8 específicos. Uno de los marcadores

prominentes en esta condición es el receptor PD1. Su expresión se ha encontrado incrementada en linfocitos CD8 y se ha asociado con el fenómeno de agotamiento o “*exhaustion*” (Golden-Mason et al, 2007; Barber et al, 2006). Por lo tanto, también se analizó la expresión de PD1 en células CD8 de pacientes con LCD, estimuladas con LPG o Pam3Cys, para determinar si la expresión de PD1 se modifica con estímulos de TLR2. Encontramos que el estímulo con LPG o Pam3Cys redujo la expresión de PD1<sup>+</sup> (Figura 16).



**Figura 16. Expresión de PD1 sobre linfocitos CD8 activados con ligandos de TLR2.** Linfocitos CD8 purificados de tres pacientes LCD fueron estimulados *in vitro* con LPG de *L. mexicana* (10 µg/ml) o Pam3Cys (2 µg/ mL) por 24 h. Posteriormente fueron cosechadas, marcadas con anti-CD8, anti-CD3 y anti-PD1. Se registraron 10,000 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> por FACS y se analizó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de PD1. Se muestra la media y la distribución estándar. \*p=0.02, \*\*p=0.005.

## 6. DISCUSIÓN

La respuesta inmune protectora a *Leishmania* se ha estudiado profundamente en el modelo de ratón y se reconoce que se encuentra mediada por citocinas Th1 que activan al macrófago, como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Dicha activación conlleva a la expresión de iNOS y la producción de NO, el cual se describe como el agente leishmanicida más importante (Bogdan, 2001). En humanos, estos mecanismos no se repiten fielmente, debido probablemente a que los datos provienen de un modelo en el cual no existe leishmaniasis difusa, un padecimiento crónico con un patrón de lesión distinto al observado en ratones infectados con *L. major*. A pesar de estas diferencias, la producción de IFN $\gamma$  y la expresión de iNOS tanto en la infección murina como humana, tienen una asociación directa con la resolución de la infección (Reithinger et al, 2007). Poco se sabe sobre la muerte de células inmunológicas infiltradas en las lesiones de leishmaniasis cutáneas. Bertho y col (2000) describieron apoptosis en linfocitos T CD4 y CD8 en las lesiones de pacientes con LCL causada por *L. braziliensis*. Dicho evento se atribuyó como consecuencia de hipersensibilidad a antígenos de *Leishmania* y muerte por activación (AICD). Adicionalmente se correlacionó el bajo porcentaje de apoptosis en linfocitos CD8 con eliminación del parásito y protección. En este estudio describimos que también existen macrófagos en apoptosis y que el porcentaje de células en apoptosis en pacientes LCL que en LCD es mayor (Figura 13).

La muerte de macrófagos en la lesión podría ser parte del ciclo normal de respuesta de los macrófagos a la infección y/o producto de la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ y

NK. Se ha evidenciado una alta participación de esta clase de linfocitos en la respuesta protectora a *Leishmania* (revisado por Ruiz & Becker, 2007). En el caso de LC causada por *L. mexicana*, se ha demostrado que después de recibir tratamiento combinado de IFN $\gamma$  y antimonio pentavalente, el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en las lesiones de pacientes LCD se incrementa de manera inversa al número de parásitos en las mismas lesiones (Salaiza-Suazo et al, 2001). Por tanto es plausible pensar que la muerte de los macrófagos presentes en la lesión de los pacientes LCL sean el resultado de la actividad citotóxica de linfocitos T CD8.

La importancia de la muerte celular programada en la modulación de la respuesta inmune que ocurre en las lesiones de pacientes con LC es motivo de discusión. Este fenómeno de muerte celular en la célula hospedera tiene relevancia si se piensa que *Leishmania* es capaz de inhibir temporalmente la muerte celular inducida sobre los macrófagos (Donovan et al, 2009), por lo que la muerte de la célula hospedera pudiera ser un mecanismo que participe tanto en la eliminación del parásito como en la expansión de la respuesta inmune al proveer de nuevos antígenos del parásito, como se ha descrito para *M. tuberculosis* (Winau et al, 2006). Sin embargo, para la infección con *Leishmania* no se han analizado estos mecanismos. El efecto que puede tener la apoptosis del macrófago infectado sobre los parásitos no ha sido motivo de investigación. En este trabajo se evaluó el efecto de la inducción de muerte celular sobre la recuperación de parásitos. Los macrófagos infectados resistieron el estímulo con anticuerpo anti-Fas; sin embargo, el uso de camptotecina, un potente inductor de muerte a través de la inhibición de la topoisomerasa I, logró inducir muerte celular, aunque ésta se debió más a necrosis que a apoptosis (Figura 14A). La

privación de suero logró inducir muerte en mayor grado y solo bajo esta condición se afectó la recuperación de parásitos. Sin embargo, aquí están combinados dos eventos, por un lado la muerte de los macrófagos y por el otro, la disminución de nutrientes, lo cual puede afectar la proliferación de los parásitos intracelulares, por lo tanto no sabemos si el efecto observado se debe exclusivamente a la muerte celular. La degradación de material de *Leishmania* en eventos apoptóticos no solo puede tener un papel en el control del número de parásitos, también representa una oportunidad para procesar antígenos de difícil obtención debido a la inhibición que causa el parásito sobre la célula hospedera. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos que permiten activar clonas específicas de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Dado que dicha activación parece estar relacionada con la resolución de la infección, es posible pensar en el diseño de vacunas que activen este tipo de respuesta y de esta manera coadyuven al control de la infección (Basu et al, 2007; Dumonteil, 2009). Sin embargo será necesario ahondar en el efecto de la muerte celular del macrófago sobre el parásito.

La muerte celular puede suceder de manera fisiológica como consecuencia de la inflamación vía TNF $\alpha$  y NO, o también como resultado de la intervención de linfocitos citotóxicos. La evidencia en ratón señala tanto a las células NK (Liese et al, 2008) como a los linfocitos CD8 (Belkaid, 2002; Uzona et al, 2004) como imprescindibles en la respuesta protectora y aún en humanos se correlaciona su presencia en la lesión con recuperación en pacientes LCD (Salaiza-Suazo et al, 1999). En este trabajo de tesis describimos que los pacientes LCL exhiben buena capacidad citotóxica contra macrófagos infectados, misma que no se detecta en los pacientes LCD (Figura 9).



Actualmente se acepta que la respuesta de citocinas tipo Th1 es la encargada de eliminar el parásito y que el mecanismo efector es la activación de macrófagos a través de IFN $\gamma$  y la consecuente activación de iNOS (Nylén & Akuffo, 2009). Sin embargo se ha sugerido que la sola expresión de iNOS no es suficiente para controlar a *Leishmania*, como ha sido demostrado en ratones deficientes de TNF $\alpha$  (Wilhelm et al, 2001) o luego de la infección con algunas cepas de *L. major* (Anderson et al, 2005). Seguramente el proceso citotóxico debe de formar parte de la maquinaria necesaria para eliminar el parásito. Se piensa que uno de los mecanismos citotóxicos que deben jugar un papel primordial es la expresión de FasL, ya que ratones de una de las cepas resistentes a la infección, pero deficientes en Fas o FasL, presentan un comportamiento susceptible a pesar de montar una respuesta Th1. En humanos se ha correlacionado la expresión de granzima B en los tejidos con un pronóstico positivo en LCL causada por *L. braziliensis* (Boussofara et al, 2004). Nosotros también asociamos a granzima B con la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8 de pacientes LCL contra macrófagos infectados (Figura 10). No descartamos la posibilidad de que el sistema Fas/FasL participe *in situ* en la respuesta a *Leishmania*, sin embargo nuestros datos no sugieren que los macrófagos infectados puedan activar a las clonas de linfocitos T CD8 para que expresen FasL.

A pesar de contar con pocos pacientes LCD, debido a la baja frecuencia de este padecimiento en México (27 de 16,532 pacientes LC registrados en 24 años), éstos presentaron ciertas características funcionales que se asemejan a la condición, de agotamiento descrita en algunas infecciones crónicas con virus (Shin & Wherry, 2007). Tal agotamiento fue inicialmente descrita en la infección crónica de LCMV en ratones, en la

cual persisten linfocitos T CD8 específicos del virus pero carecen de funciones efectoras (Zajac et al, 1998). Inicialmente la infección logra generar clonas de linfocitos CD8 que desarrollan la capacidad de ejecutar funciones efectoras, sin embargo estas funciones se pierden en el transcurso del tiempo en una manera jerárquica. De manera temprana se pierde la citotoxicidad y la proliferación, mientras que la producción de IFN $\gamma$  persiste más tiempo (Wherry et al, 2003). También se han descrito similares tipos de disfunción en humanos en infecciones crónicas y cáncer (Shin & Wherry, 2007).

Recientemente se reportó la existencia del fenómeno de agotamiento (*exhaustion*) de linfocitos T CD8 en un modelo murino de infección por *L. donovani* (Stäger et al, 2010). Como era de esperarse, inicialmente el parásito induce proliferación y diferenciación de linfocitos T CD8 con capacidad para secretar IFN $\gamma$ , sin embargo estos linfocitos pierden sus funciones efectoras y mueren conforme la infección progresa (Joshi et al, 2009). Adicionalmente, Ganguly y colaboradores (2009) describieron la existencia de linfocitos anérgicos contra antígeno de *Leishmania* y un número elevado de linfocitos CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> en sangre periférica de pacientes con leishmaniasis cutánea post-Kala-Azar. Toda esta evidencia demuestra que este fenómeno existe en la infección crónica por *Leishmania* y podría deberse a la persistencia de *Leishmania* de forma intracelular (Bucks et al, 2009). Nuestros datos sugieren este mismo fenómeno (Figuras 9, 10, 11 y 12) y es concordante con la infección, ya que se presenta de manera crónica, intracelular, con evolución mayor a 20 años, nula hipersensibilidad de tipo IV a antígenos de *Leishmania* y depende de una respuesta celular para curar.

El análisis del nivel de expresión de genes durante la infección crónica por LCMV, señaló que el receptor inhibidor PD1 es una importante vía que regula la condición de agotamiento de los linfocitos T CD8 (Barber et al, 2006), cuya activación por sus ligandos PDL-1 y PDL-2 presentes en MO, CD y células endoteliales recluta una fosfatasa SHP-2 a través de dos motivos de señalización en tirosina (ITIM e ITSM). A su vez esta fosfatasa defosforila e inactiva múltiples señales dependientes de fosforilación. Estos resultados se han extendido a primates y humanos, en los cuales la vía PD1-PDL1 también regula la función de células T específicas de SIV, HIV y HCV (Radziewicz et al., 2006; Riley, 2009). En particular, se reconoce que las células agotadas expresan PD1 en gran proporción (Wherry et al, 2007), entre otros receptores inhibidores. Nosotros detectamos disminución en la expresión de PD1 sobre células CD8 de pacientes LCD luego de la estimulación con LPG o Pam3Cys (Figura 16), lo que concuerda con los resultados en el modelo murino de anergia funcional inducida por antígenos sintéticos, en donde el uso de CpG como adyuvante, disminuye la expresión de PD1 (Wong et al, 2009).

Cabe resaltar que en los experimentos de proliferación y producción de IFN $\gamma$  (Figuras 11 y 12), los linfocitos CD8 de pacientes LCD no tienen capacidad efectora en respuesta al estímulo con MOi, aunque si responden a concanavalina A y PMA/Ionomicina, lo cual nos hizo pensar que esta condición de agotamiento es específica contra antígenos de *Leishmania* y puede ser rescatada con una estimulación positiva. El rescate de los linfocitos T en condición agotada se ha limitado al uso de anticuerpos a-PDL1 y a-PDL2 que evitan la unión del receptor PD1 en células T con los ligandos en células presentadoras de antígeno (CPAs) (Radziewicz et al, 2007). De tal manera solo se presentaría la señal de TCR y de

CD28 al encuentro de células T agotadas con CPA. Nosotros evaluamos la capacidad de dos ligandos del receptor activador TLR2, LPG y Pam3Cys, para restaurar las funciones efectoras de los linfocitos T CD8 de pacientes LCD contra MOi (Figura 15). Aunque solo el porcentaje de células CD8 productoras de IFN $\gamma$  fue ostensiblemente aumentado por el tratamiento de LPG o Pam3Cys, comparado con los valores registrados en los pacientes LCL, sí se observaron incrementos importantes que pueden sugerir al TLR2 como una vía jerárquicamente superior a la de PD1.

Se ha descrito que el receptor TLR2 se encuentra constitutivamente expresado en linfocitos T de memoria tanto CD4 como CD8, y su activación conduce a una señal coestimuladora que lleva a la producción de citocinas y la proliferación (Riley, 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que Pam3Cys revierte de manera transitoria la expresión FoxP3<sup>+</sup> de Treg y suprime su actividad (Liu et al, 2009). Nosotros hipotetizamos que TLR2 también podría rescatar células exhaustas producto de infecciones intracelulares crónicas.

En resumen, las siguientes son las principales contribuciones de este trabajo de tesis a la información existente al respecto de la inmunidad en la leishmaniasis:

- 1.- Las lesiones de los pacientes LCL presentan significativamente más células en apoptosis que los pacientes LCD y algunas de estas células en apoptosis son macrófagos.
- 2.- El estudio comparativo funcional de los linfocitos T CD8 periféricos entre pacientes con LCL y LCD mostró que las células de pacientes LCL exhiben capacidad citotóxica, proliferación y producción de IFN $\gamma$  cuando se estimulan con MOi, mientras que los mismos

linfocitos de pacientes LCD no presentan estas funciones, sin embargo responden a estímulos no específicos como la concanavalina A, el PMA y la ionomicina.

3.- La apoptosis de los macrófagos infectados reduce la viabilidad de los parásitos.

4.- Los ligandos de TLR2, LPG y Pam3Cys, restauran parcialmente las funciones efectoras de los linfocitos T CD8.

## **7. CONCLUSIÓN**

Los linfocitos TCD8 de pacientes LCD están funcionalmente exhaustos en sus funciones efectoras específicas contra *Leishmania*, como la actividad citotóxica y la producción de IFN $\gamma$ , en comparación con linfocitos CD8 de pacientes con LCL.

Este estado de agotamiento funcional contra *Leishmania* puede ser revertido parcialmente por estímulos del receptor innato TLR2.

## **8. PERSPECTIVAS**

La condición de agotamiento de la respuesta inmune a *Leishmania* solo se ha descrito en dos trabajos, el modelo de ratón infectado con *L. donovani* (Joshi et al, 2009) y pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (Hernández-Ruiz et al, 2010). Sería interesante estudiar

este estado ~~exhausto~~ en linfocitos CD8 de ratones BALB/c, altamente susceptibles a la leishmaniasis, para determinar en que grado el estado de agotamiento es causa o consecuencia de la progresión y diseminación de la infección por *L. mexicana*.

El estudio de la restauración de la condición de agotamiento aún es incipiente. Sólo existen dos trabajos que describen la restauración por mecanismos distintos al bloqueo de la unión entre PD1 y sus ligandos, el ligando de TLR9 (CpG) usado como adyuvante en la vacunación de ratones con péptidos sintéticos (Wong et al, 2009) y nuestro trabajo (Hernández-Ruiz et al, 2010). Existen varias preguntas que se derivan. Una de ellas se relaciona con los mecanismos o las vías involucradas en la señal de TLR sobre la célula exhausta, en particular si es dependiente de MyD88 u otra vía no convencional. Otras preguntas estarían encaminadas al uso potencial de los ligandos de TLR en la enfermedad. Se podría probar en ratones si la estimulación local en el sitio de la infección con ligandos de TLR tiene un efecto positivo en la resolución de la infección sin efectos colaterales.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

Accapezzato D, Francavilla V, Propato A, Paroli M, Barnaba V. 2003. Mechanisms inducing or controlling CD8+ T cell responses against self- or non-self-antigens. *Ann NY Acad Sci.* 987:99-106.

Agudelo S, Robledo S. 2000. Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. *IATREIA.*13:167-178.

Alexander C, Kaye P, Engwerda C. 2001. CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. *Eur J Immunol.* 31:1199-1210.

Alexander J, Russell DG. 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol.* 31: 175-254.

Anderson C, Mendez S, Sacks D. 2005. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* C57BL/6 mice. *J Immunol.* 174: 2934–2941.

Antonelli L, Dutra W, Almeida R, Bacella O, Carvalho E, Gollob K. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 101: 226-30.

Antoine J, Prina E, Lang T, Courret N. 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trend Microbiol.* 6: 392-401.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18:767-811.

Barber D, Wherry E, Masopust D, Zhu B, Allison J, Sharpe A, Freeman G, Ahmed R. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.

Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho E, Reed S. 1995. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 17:21-28.

Basu R, Bhaumik S, Haldar AK, Naskar K, De T, Dana SK, Walden P, Roy S. 2007. Hybrid cell vaccination resolves *Leishmania donovani* infection by eliciting a strong CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response with concomitant suppression of interleukin-10 (IL-10) but not IL-4 or IL-13. *Infect Immun.* 75: 5956-5966.

Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A. 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* 130: 65-74.



Becker I, Carrada G, Gudiño M, González C, Berzunza M, Rivas B, Velasco O. 2006. Análisis de leishmaniasis en México. Consulta de expertos sobre leishmaniasis en las Américas. Informe Final. OPS/OMS. pp 27-33. Ministerio de Salud de Brasil. Rio de Janeiro.

Belkaid Y. 2002. CD8<sup>+</sup> T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. J Immunol. 168:3992-4000.

Bertho A, Santiago M, Da-Cruz A, Coutinho S. 2000. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 33:317-325.

Billerbeck E & Thimme R. 2008. CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in persistent human viral infections. Hum Immunol. 69: 771-5.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol. 2001. 2:907-916.

Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. 2002. A role for CD40 expression on CD8<sup>+</sup> T cells in the generation of CD8<sup>+</sup> T cell memory. Science. 297:2060-2063.

Boussoffara T, Louzir H, Salah B, Dellagi K. 2004. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 189: 1265-1273.

Brodskyn C, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M. 1997. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 159:4467-4473.

Bucks C, Norton J, Boesteanu A, Mueller Y and Katsikis P. 2009. Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8+ T cell exhaustion. *J. Immunol.* 182: 6697-6708.

Calvopina M, Gomez E, Sindermann H, Cooper P and Hashiguchi Y. 2006. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* after miltefosine treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75: 1074–1077.

Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol.* 6:15-25.

Conceição F, Hahne M, Schroter M, Louis J, Tschopp J. 1998. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 28:237-245.

Convit J, Ulrich M, Fernandez C, Tapias F, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondon AJ. 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 87:444-448.

Cottalorda A, Mercier BC, Mbitikon-Kobo FM, Arpin C, Teoh DY, McMichael A, Marvel J, Bonnefoy-Bérard N. 2009. TLR2 engagement on memory CD8(+) T cells improves their cytokine-mediated proliferation and IFN-gamma secretion in the absence of Ag. *Eur J Immunol.* 39:2673-81.

Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine J. 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci.* 115: 2303-2316.

Cox F, Liew FY. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today.* 13:445-448.

Da-Cruz A, Bittar R, Mattos M, Oliveira M, Nogueira R, Pinho V Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. 2002. T cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long term evaluation alter therapy. *Clin Diag Lab Immunol.* 9:251-256.

Da-Cruz A, Bertho A, Oliveira-Neto M, Coutinho S. 2005. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Brit J Dermatol.* 153:537-543.

Denkers EY, Butcher B. 2005. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* 21:35-41.

Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis.* 27: 305-318.

Doherty P. 1998. The numbers game for virus-specific CD8+ T cells. *Science.* 280:227-233.

Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA. 2009. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Exp Parasitol.* 123:58-64.

Dumonteil E. 2009. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. *Infect Genet Evol.* 9:1075-1082.

Eidsmo L, Nylen S, Khamesipour A, Hedblad M, Chiodi F, Akuffo H. 2005. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous leishmaniasis. *Am J Path.* 166:1099-1108.

Eisert V, Münster U, Simon M, Moll H. 2002. The course of *Leishmania major* infection in mice lacking granzyme-mediated mechanisms. *Immunobiol.* 205:314-320.

Farajnia S, Mahboudi F, Ajdari S, Reiner NE, Kariminia A, Alimohammadian MH. 2005. Mononuclear cells from patients recovered from cutaneous leishmaniasis respond to *Leishmania major* amastigote class I nuclease with a predominant Th1-like response. *Clin Exp Immunol.* 139:498-505.

Fischer K, Andreesen R, Mackensen A. 2002. An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunological Methods.* 259:159–169.

Frischholz S, Röllinghoff M, Moll H. 1994. Cutaneous leishmaniasis: co-ordinate expression of granzyme A and lymphokines by CD4<sup>+</sup> T cells from susceptible mice. *Immunobiol.* 82: 255-261.

Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander A, Hassan A. 1999. Characterization of the local and systemic immune response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol.* 91:314-320.

Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol J, Castelblanco N and Rosen H. 2007. Upregulation of PD-1 Expression on Circulating and Intrahepatic Hepatitis C Virus-

Specific CD8<sup>+</sup> T Cells Associated with Reversible Immune Dysfunction. *J Virol.* 81: 9249-9258.

Ganguly S, Mukhopadhyay D, Das NK, Chaduvula M, Sadhu S, Chatterjee U, Rahman M, Goswami RP, Guha SK, Modak D, Mallik S, Gonju D, Pramanik N, Barbhuiya JN, Saha B, Chatterjee M. 2009. Enhanced lesional FoxP3 expression and peripheral anergic lymphocytes indicate a role for regulatory T cells in indian post-Kala-Azar dermal leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 130:1013-1022.

Guermonez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, van Endert P, Amigorena S. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 425:397-402.

Harty J, Tvinnereim A, White D. 2000. CD8<sup>+</sup> T cell effectors mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol.* 18:275-308.

Hepburn NC. 2003. Cutaneous leishmaniasis: current and future management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 1:563-70.

Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, Princiotta MF, Thibault P, Sacks D, Desjardins M. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature.* 425: 402-406.

Huang FP, Xu D, Esfandiari EO, Sands W, Wei XQ, Liew FY. 1998. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J Immunol.* 160:4143-4147.

Huber M, Timms E, Mak E, Rollinghoff M, Lohoff M. 1998. Effective and long lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun.* 66:3968-3970.

Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. 2005. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 174:7147-7153.

Jiang H & Chess L. 2004. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *Clin. Invest.* 114:1198-1208.

Joshi T, S. Rodriguez V Perovic, IA Cockburn and S Stäger. 2009. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8<sup>+</sup> T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* 5(5): e1000431. doi:10.1371/journal.ppat.1000431.

Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel R, Hengartner H. 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis *in vivo*. *Annu Rev Immunol.* 14:207-232.

Kariminia A, Bourreau E, Pascalis H, Couppie P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. 2005. Transforming growth factor beta 1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects stimulated with *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun.* 73: 5908-5914.

Kaufmann S. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 1: 20–30.

Kaufmann S, Schaible U. 2005. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr Op Immunol.* 17: 79-87.

Kemp M, Hansen MB, Theander TG. 1992. Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from non-exposed individuals. *Infect Immun.* 60:246-251.

Kima P, Ruddle N, McMahon-Pratt D. 1997. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8 T cells. *J. Immunol.* 159: 1828-1834.

Komai-Koma M, Jones L, Ogg G, Xu D, Liew F. 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3029-3034.

Kumar J, Okada S, Clayberger C, Krensky AM. 2001. Granulysin: a novel antimicrobial. *Expert Opin Investig Drugs.* 10: 321-329.



Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. 2007. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 73: 843-847 .

Liese J, Schleicher U, Bogdan C. 2008. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.* 213:377-387.

Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew F: Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:7048-7053.

Lopez J, Lebowitz J, Beverly S, Rammensee H, Overath P. 1993. *Leishmania mexicana* promastigotes induce cytotoxic T lymphocytes in vivo that do not recognize infected macrophages. *Eur J Immunol.* 23: 217-223.

Maurer M, Dondji B, von Stebut E. 2009. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 198: 137-146.

Melief C. 2003. Regulation of T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol.* 33: 2645-2654.

Moll H, Müller C, Gillitzer R, Fuchs H, Röllinghoff M, Simon M, Kramer MD. 1991. Expresión of T-cell-associated serine proteinase 1 during murine *Leishmania major* infection correlates with susceptibility to disease. *Infect Immun.* 59:4701-4708.

Moore KJ, Matlashewski G. 1994. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol.*152: 2930-2937.

Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* 362:758–61.

Murray H, Berman J, Davies C and Saravia N. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 366: 1561-1577.

Nakamoto N, Kaplan D, Coleclough J, Li Y, Valiga M, Kaminski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price D, Freeman G, Wherry E, Chang K. 2008. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology.* 134: 1927-1937.

Nylén S, Akuffo H. 2009. Tracing immunity to human leishmaniasis. *Future Microbiol.* 4:241-54.

Overstreet MG, Cockburn IA, Chen YC, Zavala F. 2008. Protective CD8 T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response. *Immunol Rev.* 225:272-83.

Peters N, Sacks D. 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev.* 213: 159-79.

Pinheiro R, Fonseca E, Correia J, Matos H, Ferro R, Rossi-Bergmann B. 2005. TGF $\beta$ -associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect.* 7: 1317-23.

Propato A, Cutrona G, Francavilla V. 2001. Apoptotic cells overexpress vinculin and induce vinculin-specific cytotoxic T-cell cross-priming. *Nat Med.* 7:807-813.

Radziewicz, H., C. C. Ibegbu, M. L. Fernandez, K. A. Workowski, K. Obideen, M. Wehbi, H. L. Hanson, J. P. Steinberg, D. Masopust, E. J. Wherry, J. D. Altman, B. T. Rouse, G. J. Freeman, R. Ahmed, and A. Grakoui. 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J. Virol.* 81:2545-2553

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007 7:581-596.

Riley J. 2009. PD1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 229: 114-125.

Roger K, Titus R. 2004. Characterization of the early cellular immune response to *Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naïve humans. *Am J Trop Med Hyg.* 71: 568-576.

Rossi-Bergmann B, Müller I, Godinho EB. 1993. Th1 and Th2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cell in murine leishmaniasis. *Infect Immun.* 61:266-269.

Ruiz JH, Becker I. 2007. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 29: 671-678.

Russo DM, Chakrabarti P, Higgins AY. 1999. *Leishmania*: naive human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8+ cytotoxic effectors. *Exp Parasitol.* 93: 161-170.

Sacks D & Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2: 845-858.

Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Perez-Torres A , Pérez-Montfort R, Domínguez JD, Velasco-Castrejón O, Crippa M, Becker I. 1999. Treatment of

two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. Trop Med Int Health. 4:801-811.

Salaiza-Suazo. 2001. Análisis del perfil celular y análisis cualitativo y cuantitativo de linfocitos T citotóxicos CD8+ en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa y su correlación con el tratamiento. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. UNAM. México DF.

Savina A & Amigorena S. 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. Immunol Rev. 219: 143-56.

Schaible U, Winau F, Sieling P, Fischer K, Collins H, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SH. 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. Nat Med. 9: 1039-1046.

Shin H, Wherry E. 2007. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. Curr. Opin. Immunol. 19: 408–415.

Singh S, Sivakumar R. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. J Infect Chemother. 10:307-315.

Smith C, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Belz G. 2004. Cognate CD4<sup>+</sup> T cell licensing of dendritic cells in CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Nat Immunol.* 5:1143-1148.

Smith L, Rodrigues M, Russel D. 1991. The interaction between CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. *J Exp Med.* 174: 499-505.

Stäger S, Joshi T, Bankoti R. 2010. Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. *Immunol Res.* 47:14-24.

Stenger S. 2001. Cytolytic T cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Infect Dis.* 33: 483-487.

Tarleton RL. 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol.* 19: 430-4.

Titus R. 1987. Involvement of specific L<sub>yt</sub>-2<sup>+</sup> T cells in the immunological control of experimental induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 17:1429-1433.

Trapani J, Smyth M. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2:735-747.

Tripathi P, Singh V & Naik S. 2007. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. FEMS. 51: 229-242.

Uzonna J, Joyce K, Scout P. 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by Interferon  $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells. J Exp Med. 199:1559-1566.

Velasco O. Leishmaniasis cutánea en voluntarios humanos. Mem Congr Mex Dermatol 1970. México.

Wang, Alexander. 2009. CD8 regulatory T cells: What's old is now new. Immunol & Cell Biol. 87:192-193.

Watanabe T, Bertolotti A, Tanoto T. 2010. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. J Viral Hepatitis. 17:453-458.

Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. J Virol. 77: 4911-4927.

Wherry E, Ha S, Kaech S, Haining W, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman J, Barber D, Ahmed R. 2007. Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. Immunity. 27: 670–684.

WHO. 2009. Leishmaniasis: the global trend.

[http://www.who.int/neglected\\_diseases/integrated\\_media\\_leishmaniasis/en/print.html](http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/print.html).

Genova.

Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, Körner H. 2001. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking tumor necrosis factor. *J Immunol* 166: 4012–4019.

Winau F, Kaufmann S, Schaible U. 2004. Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol.* 6: 599-607.

Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann V, Kaufmann SH, Schaible UE. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity.* 24: 105-117.

Wong R, Smith K, Tam V, Pagarigan R, Meisenburg B, Quach A, Carrillo M, Qiu Z, Bot A. 2009. TLR-9 signaling and TCR stimulation co-regulate CD8 T cell- associated PD-1 expression. *Immunol Let* 127: 60-67.

Wood KL, Twigg HL & Doseff AI. 2009. Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. *Front Biosci.* 14: 3771-81.



Wooland D & Dutton R. 2003. Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Op Immunol.*15:336-342.

Yi J, Cox M, Zajac A. 2010. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunol.* 129:474-481.

Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.* 188: 2205-2213.

## ARTICULOS GENERADOS

Como producto del proyecto de investigación, se generaron dos artículos en revistas indexadas. El primero es un artículo de revisión, que sirvió de mesa de discusión sobre los posibles mecanismos de participación de los linfocitos T CD8 en la leishmaniasis cutánea. El segundo presenta los principales hallazgos del presente estudio y propone un novedoso mecanismo para restaurar el agotamiento funcional de los linfocitos T CD8. A continuación se relacionan los mencionados artículos y se presentan en formato extenso.

Ruiz JH, Becker I. 2007. CD8 citotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 29:671-678

Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, Zentella A, Becker I. 2010. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* 4:e871.

# CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis

J. H. RUIZ & I. BECKER Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,

México D.F., México

## SUMMARY

*CD8 T cells are essential in the defence against viruses, yet little is known of their participation in the host defence against parasites, such as Leishmania, which can cause a variety of clinical diseases, such as localized cutaneous, diffuse cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Murine models of leishmaniasis suggest that CD8 T cells participate through IFN- $\gamma$  production, yet their cytotoxic capacity also plays an important role, as has been found in patients infected with various Leishmania strains, where CD8 T cell cytotoxicity and apoptosis of autologous Leishmania-infected macrophages correlate with cure. Yet the mechanisms underlying the CD8 T activation in patients with leishmaniasis remain an enigma. It is possible that dendritic cells activate CD8 T cells through mechanisms that include antigen cross-presentation. Here we summarize the recent findings of CD8 T cells in cutaneous leishmaniasis and discuss their significance in the control of the disease. Further knowledge in this field will undoubtedly improve the design of therapeutic and vaccine strategies.*

**Keywords** CD8 T cell, cytotoxicity, Leishmania

*Correspondence:* Joséln Hernández Ruiz, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Dr Balmis 148, Colonia Doctores, 06726 México D.F., México (e-mail: becker@servidor.unam.mx).

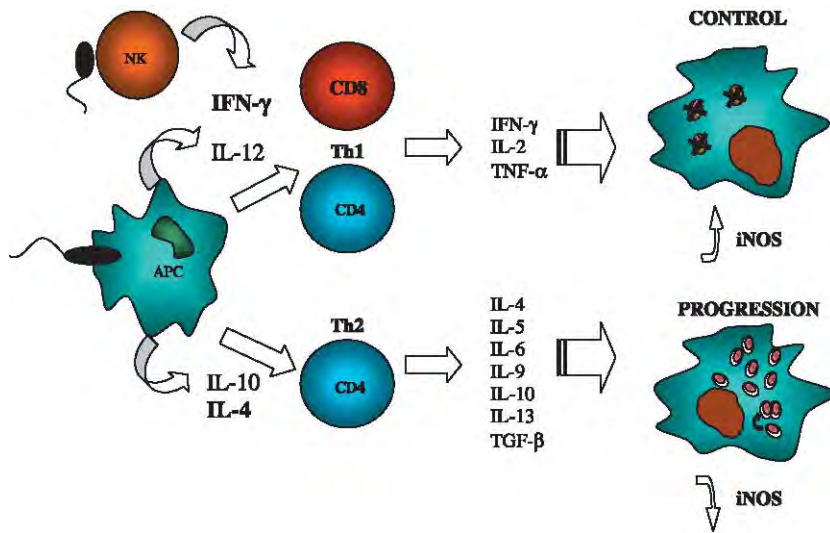
*Received:* 28 February 2007 *Accepted for publication:* 5 October 2007

## INTRODUCTION

Leishmaniasis is caused by a protozoan parasite of the genus *Leishmania*, which can infect humans as well as a variety of mammal species. The disease is transmitted through the sand fly vector, which inoculates *Leishmania* promastigotes into the skin of the mammal host (1). The parasite is phagocytosed by macrophages and dendritic cells (DC), and once inside the host cells, the parasites transform into amastigotes that can live and multiply within phagolysosomes or parasitophorous vacuoles (PV), resisting digestion by hydrolases and peptidases and thereby evading recognition by the immune system (2). Depending on the *Leishmania* species, the disease can have multiple outcomes, such as localized cutaneous, diffuse cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis (3). *Leishmania mexicana*, *L. braziliensis* and *L. aethiopica* can produce two clinically opposed forms of cutaneous leishmaniasis: the localized cutaneous leishmaniasis (LCL), a more benign form of the disease which is characterized by a protective immune response circumscribing the parasite to the inoculation site, and the other form is diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), characterized by a poor cellular immune response permitting the uncontrolled spread of the parasite throughout the skin (4–6).

## IMMUNE RESPONSE IN LEISHMANIASIS

The *Leishmania* infection is accompanied by a complex immune response that begins with the innate response, where innate receptors such as TLR2 present on macrophages, DC and NK cells recognize molecules present on the parasite surface, such as lipophosphoglycan), and induce the production of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12, as well as costimulatory molecules (7,8). In this disease, macrophages play a triple role since they are host cells, antigen-presenting cells (APC) that activate specific T cells and effector cells whose leishmanicidal efficacy depends on the presence of activating cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (9). The presence of



**Figure 1** Immune response towards *Leishmania*. In the mouse model infected with *L. major*, it has been established that susceptibility or resistance towards the disease depends on the types of cytokines that are secreted. Whereas a Th1 response leads to parasite destruction and cure, a Th2 response leads to parasite survival and disease progression.

activating cytokines is decisive for the control of parasite spread. These cytokines can be partially produced by the innate immune system, yet after the initial unspecific innate inflammatory response, a parasite-specific T cell response determines the disease outcome. In the mouse model infected with *L. major*, it has been established that a Th1 response leads to the cure of the disease, whereas a Th2 response leads to disease progression (10) (Figure 1). In patients infected with *Leishmania*, a Th1 cell type response has been related to a good prognosis, which can be evidenced by a positive Montenegro hypersensitivity skin test, whereas a Th2 type response has been associated with a specific cellular energy towards *Leishmania* antigens, as seen in patients with DCL, which have a negative hypersensitivity skin test. These patients suffer from an uncontrolled disease progression ultimately leading to their death (11). It has also been postulated that the chronic progressive form of the disease can be related to the presence of CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T regulatory (Treg) cells that exert a negative regulation of the specific immune response towards the parasite (12).

Even though the cytokine production by immune cells has been thoroughly analysed in leishmaniasis, the participation of cytotoxic cells is currently a field of intense research. Cytotoxicity can be achieved through various cell types such as CD8 T, NK, CD4 T and NKT cells, mainly through mechanisms involving antigen-dependent or-independent apoptosis of target cells. In this review, we focus on CD8 T cells because these cells have been considered a possible target for vaccine design (13).

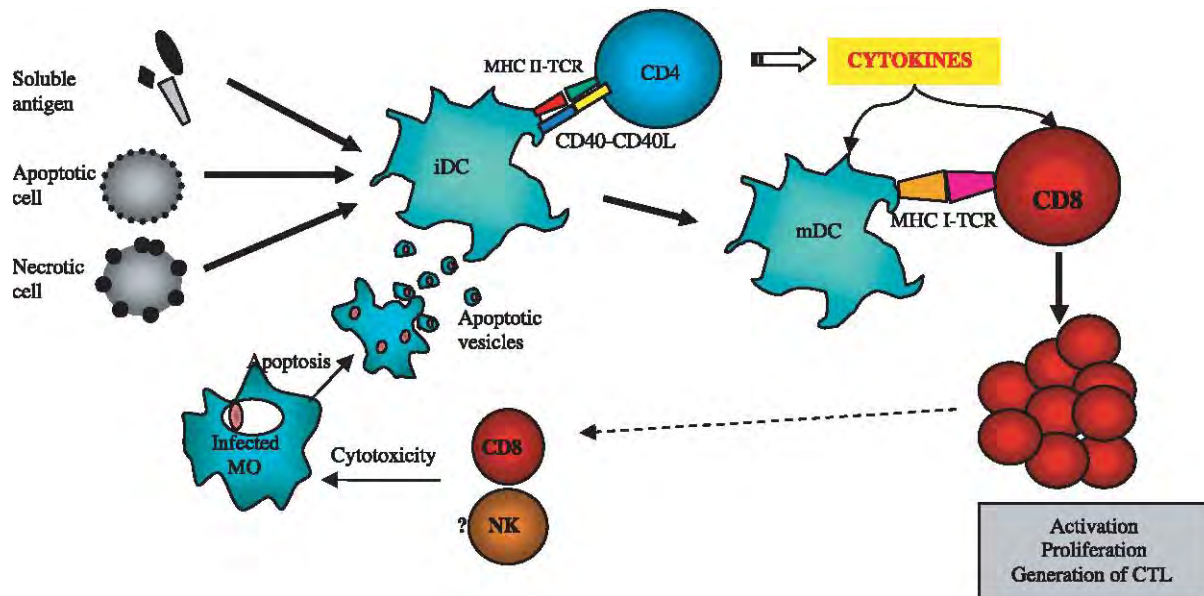
### CD8 T CELL FUNCTIONS

Various subtypes of T lymphocytes that express the CD8 marker have been described. These lymphocytes participate

in the outcome of infectious diseases, both by cytokine production as well as through their cytotoxicity. CD8 T cells can produce IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- $\beta$ . Two types of CD8<sup>+</sup> have been proposed, named Tc1 and Tc2, depending on the characteristics of their cytokine production as well as their migration capacity (14). Additionally, a CD8 suppressor T cell subset that regulates the immune response has been reported (15).

The cytotoxicity of CD8 T cells is exerted through two complementary mechanisms: one is mediated through the exocytosis of lytic granules that contain molecules such as perforin, which inserts into the lipid membrane forming pores that collapse the membrane potential and, more importantly, permitting the entry of lytic granules of the cathepsin family, such as granzyme B, which activates the signalling cascade leading to caspase-mediated apoptosis. The other cytotoxic mechanism is mediated through the membrane expression of FasL/CD95L, which induces the trimerization of its receptor Fas/CD95 on target cells, thereby initiating apoptosis through activation of caspase 8 (16). In addition, TNF and TRAIL also induce apoptosis through similar mechanisms as FasL, albeit less efficiently (17).

The CD8 T cell response towards pathogens initiates when these cells recognize specific antigens presented by MHC class I molecules in association with costimulatory signals on APC (18,19). To become fully activated, CD8 T cells depend on help from CD4 T cells and DC (20). Even though the exact mechanisms have not been established, it has been proposed that DC take up antigens, such as microbes, necrotic or apoptotic cells, process them and present them to CD4 T cells by MHC class II molecules. This drives the CD4 T cells into clonal expansion and differentiation, which upregulates their CD40L expression. This costimulatory molecule interacts with CD40 on DC,



**Figure 2** CD8 T cell activation by cross-presentation (indirect mechanism). Immature dendritic cells (iDC) take up antigens, such as soluble antigens, necrotic or apoptotic cells, which are processed and presented to CD4 T cells in association with costimulatory molecules. The interaction CD40–CD40L activates CD4 T cells, which produce cytokines that activate dendritic cells (DC) as well as CD8 T cells that recognize antigen presented by the mature dendritic cells (mDC) through MHC class I. CD8 T cytotoxic cells kill *Leishmania*-infected macrophages through apoptosis. The iDC phagocytose apoptotic bodies and digest them. The mDC present diverse *Leishmania* peptides through MHC class I to CD8 T cells, inducing their activation and proliferation into effector cells.

capacitating them to activate CD8 T cells, which transform into effector cells that recognize antigens presented by MHC class I molecules (18–21) (Figure 2). But if DC do not detect danger signals or receive stimulatory signals from receptors like the TLRs, or if they phagocytose apoptotic cells that do not express CD40, a state of tolerance is induced, either due to clonal deletion, cellular anergy or the development of Treg (21). These mechanisms induce tolerance towards autoantigens, and they could also be involved in the diminished response towards antigens in parasites that evade the immune response through negative regulation of CD8 T cells (22).

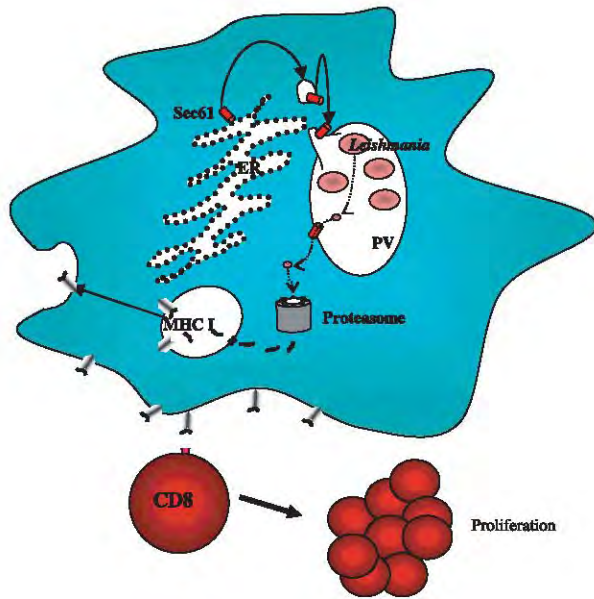
## CD8 T CELL ACTIVATION IN LEISHMANIASIS

Controversy still remains regarding the route of activation of CD8 cells in leishmaniasis, since *Leishmania* reside within the PV of the macrophage and it is not clear how these cells present *Leishmania* antigens to CD8 T cells through MHC class I. In particular, it is not known how the contents of the PV can reach the cytosol to be degraded by the proteasome and transported into the endoplasmic reticulum, where the peptides are bound to MHC class I molecules.

Initial studies report that macrophages infected with *Leishmania*, which had previously been transfected with the gene encoding  $\beta$ -galactosidase, a cytosolic antigen, were

unable to present these antigens to specific CD8 T cells (23). Yet recently, Bertholet and coworkers demonstrated that a *L. major* strain, which had been engineered to secrete a chimeric OVA protein [Lm nucleotidase (NT)-OVA], was able to induce priming of OVA-specific TCR transgenic CD8 T cells (OT-I) after the *in vitro* infection of DC and during the course of low dose infection in the skin. The presentation of the secreted antigen was TAP independent and was inhibited by chloroquine, but not by proteasome inhibitors, suggesting that the secreted *Leishmania* antigens appear to be confined to an intraphagosomal processing pathway (24,25).

Another study reported that a CD8 T cell line specific for the *Leishmania* surface antigen GP46/M-2 was capable of recognizing macrophages infected with *L. amazonensis*. These data suggest that the *Leishmania* antigen had been processed within the cytosol, and this observation was further strengthened by the fact that the CD8 T cell activation could be blocked by brefeldin A or with inhibitors of the proteasome (26). Taken together, these data apparently suggest that in leishmaniasis, only external or secreted *Leishmania* antigens are able to reach the macrophage cytosol. It is therefore tempting to speculate that these molecules are secreted deliberately by the parasite instead of being degradation products of the PV. Yet it is unclear how these *Leishmania* antigens exit the PV and reach the cytosol, where they can be processed for MHC class I presentation.



**Figure 3** CD8 T cell activation by cross-presentation (direct mechanism). *Leishmania* antigens present in the parasitophorous vacuole (PV) of macrophage could cross the membrane with the help of Sec61, and once inside the cytosol, they are degraded by the proteasome. Peptides are then transported to the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) and bound to the MHC class I molecules to be transported through the Golgi apparatus to the cell surface.

Further insight on a possible mechanism by which exogenous antigens can be presented to CD8 T cells was obtained in cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*, where it was shown that DC phagocytose apoptotic bodies of infected macrophages and present *Mycobacterium* antigens through MHC class I and CD1b (27). It has additionally been shown that DC acquire the capacity to present antigens within 2–4 h after the phagocytosis of apoptotic bodies (28,29), and are capable of activating both CD4 and CD8 T cells (30). This mechanism of CD8 T cell activation through DC presenting antigens from apoptotic bodies of infected cells has been termed cross-presentation (indirect mechanism) (Figure 2). Even though this mechanism has not been described in leishmaniasis, it is feasible to speculate that it also forms part of the immune response in leishmaniasis, given the similarity between both diseases.

Despite the evidence that *Leishmania* antigens can be presented by MHC class I, the mechanism through which exogenous antigens gain entry into the cytosol of the macrophage or DC remains elusive. A mechanism named cross-presentation (direct mechanism) depends on the chaperone protein Sec61, which has been described both in DC and in macrophages (31–33). This phenomenon is based on the fusion of the phagosome with the endoplasmic reticulum,

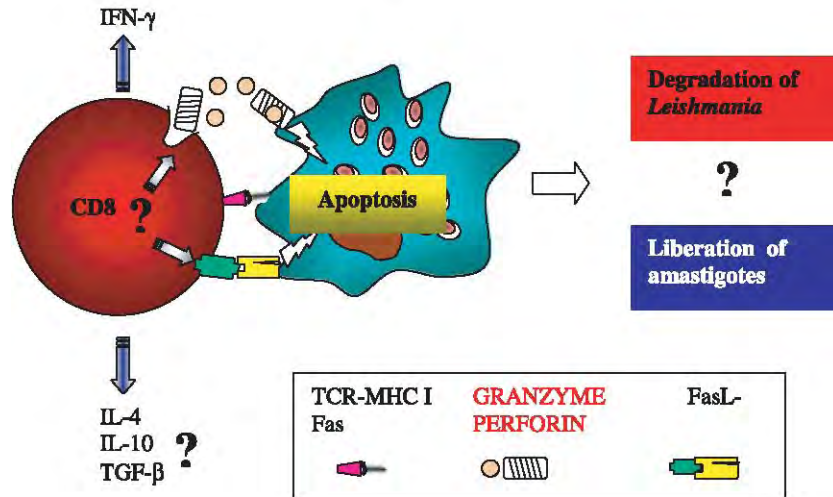
which permits the uptake of Sec61, a protein responsible for the selective transport of internalized antigens to the cytosol where they can be processed for MHC class I presentation (34). Although this mechanism has not been demonstrated in leishmaniasis, it could be a possible mechanism by which *Leishmania* proteins are transported across the PV membrane into the cytosol where they could be digested by the proteasome in order to be presented by MHC class I molecules to CD8 T cells (Figure 3).

### CD8 CYTOKINE PRODUCTION IN LEISHMANIASIS

CD8 T cells have been associated with the recuperation from various infectious diseases (22). In leishmaniasis, CD8 T cells have been associated with protection and cure both in humans and in mice. Initially it was considered that CD8 cells only played an important role during re-infections, since the resistant mouse strain (C57BL/6) deficient in  $\beta$ 2microglobulin, or in CD8, maintained its capacity to resolve primary infections with *Leishmania* (35). This was also observed in mice treated with anti-CD8 antibodies (36). Yet, if low doses (~100) of *L. major* promastigotes are inoculated intradermally, simulating the natural infection, it was shown that CD8 are crucial in controlling the primary infections by changing the early Th2 towards a Th1 response (37,38). CD8 T have been shown to be involved both in the elimination of *L. major* and in the establishment and maintenance of immunity against infection (39). Furthermore, in experimental leishmaniasis, Müller and coworkers demonstrated that CD8 T cells participate through IFN- $\gamma$  production as well as through the regulation of IFN- $\gamma$  production by CD4 T cells, which suggest a cross-talk between the two subtypes of lymphocytes (39,40). It is shown that independently of the route of infection, *Leishmania* antigens induce activation of specific CD8 T cells, which are associated with protection (39–42).

In humans, CD8 T cells have also been shown to participate in *Leishmania* infection. During the acute phase of the infection, large numbers of CD8 T cells have been observed in the lesions as well as in peripheral blood. This has also been observed during the healing process of patients infected with *L. major* (43–46) and *L. mexicana* (47). Patients infected with *L. braziliensis* present a larger number of CD4 T cells than CD8 T cells during the active infection; yet during the healing process, this ratio reaches equilibrium, due to the increase in CD8 T cells (44). Another study showed that lesions of patients with LCL infected with *L. braziliensis* exhibited a large number of CD8 T lymphocytes in apoptosis, whereas patients undergoing a spontaneous cure presented very few apoptotic CD8 T cells (5). Additionally, a large proportion of *Leishmania*-specific CD8 T

**Figure 4** Questions unresolved. CD8 cytotoxic T cells induce apoptosis of infected macrophages through various possible mechanisms. After the CD8 T cell receptor (TCR) recognizes *Leishmania* antigens presented by MHC class I molecules, they possibly induce apoptosis through the granzyme/perforin mechanism or through Fas/FasL. It remains unknown if the intercellular *Leishmania* parasites are also degraded throughout the apoptotic process or if amastigotes are liberated. Additionally, cytotoxic CD8 T cells possibly also secrete inhibitory cytokines such as IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ , which downregulate the immune response.



cells can be found in the inflammatory infiltrates of the lesions, whereas only few could be found in peripheral blood (45). Taken together, these data show that CD8 T cells participate in the active disease and can be correlated with cure.

CD8 T cells have also been implicated in the chronicity of *Leishmania* infections by exacerbating the tissue lesions, as has been described in mucocutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* (48,49). An additional regulatory function in chronic leishmaniasis has been reported for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells (50,51), although nothing has been reported for CD8 Treg in leishmaniasis.

Recent experiments with mononuclear cells from human peripheral blood infected with *L. major* produced IFN- $\gamma$  and IL-12, thereby favouring a Th1 response. In addition, these cells produced low levels of IL-10, thereby regulating the stimulatory effect of IFN- $\gamma$  (45,52,53). After 7 days of exposure to *Leishmania*, the percentage of CD8 T cells remained unaltered; yet the IFN- $\gamma$  production reduced drastically when the antigen presentation through MHC I was blocked (53). These data demonstrate that CD8 T cells are vital for the production of IFN- $\gamma$  in leishmaniasis. Yet it is not known whether these cells proliferate upon exposure to *Leishmania* antigens and which effector mechanisms they employ in this disease.

## CD8 T CELL CYTOTOXICITY

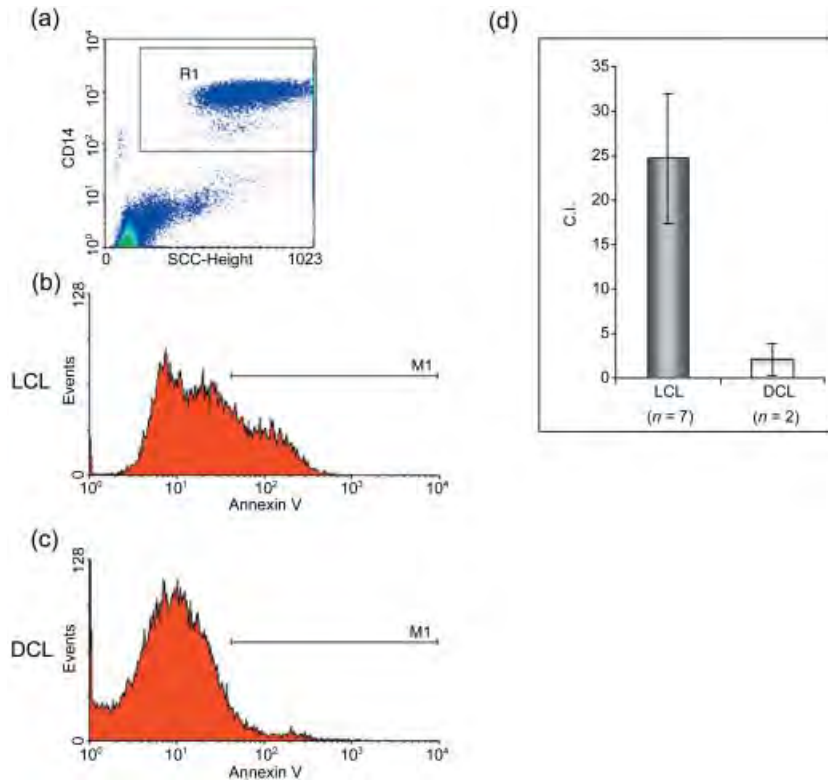
Besides cytokine production, it is also possible that CD8 T cells participate in the control of *Leishmania* through cytotoxic mechanisms including granzyme/perforin and/or Fas/FasL pathways (Figure 4). Contradictory reports regarding the participation of granzyme and perforin have been made. The *L. major*-resistant mouse strain C57BL/6, deficient in granzyme A and/or B, was found to still be able to resolve

the infection with *L. major* in a similar fashion as the wild strain, including the characteristics of their cytokine production (54,55). Yet these data remain controversial, since it has also been reported that the resistant mouse strain C57BL/6 differs from the susceptible mouse strain BALB/c in both their cytokine production pattern as well as in the expression of granzyme A (56,57).

It is also possible that the cytotoxic mechanism involving Fas/FasL could be participating in the resolution of the *Leishmania* infection. In the resistant mouse strain C57BL/6, it was shown that deficiencies in Fas and FasL induce susceptibility, even though these mice continue to produce Th1 cytokines and nitric oxide (54,58,59). These data shed new light on the possible roles of Th1/Th2 cytokines and their relation to resistance or susceptibility, since the activation of macrophages through cytokines was not enough to cure the leishmaniasis. Data obtained from these mice show that apparently it is also necessary to eliminate infected macrophages that can no longer be activated to control the disease.

In human leishmaniasis, CD8 T cells have repeatedly been associated to tissue damage, as has been reported in patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis infected with *L. braziliensis* (48,49).

Yet their protective role has also been demonstrated in *Leishmania*-specific CD8 T cells induced by stimulating naïve T cells with macrophages infected with *L. amazonensis*. These primed CD8 T cells gained the capacity to lyse autologous infected macrophages (60). An association between the *in vitro* cytotoxicity exerted by peripheral blood lymphocytes on macrophages infected with *L. major* and the liberation of granzyme B has also been reported (61). An additional evidence of the possible beneficial effect of CD8 T cell cytotoxicity in patients infected with *L. major* was the overexpression of FasL and Fas on lymphocytes and



**Figure 5** Lack of cytotoxicity in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. Purified CD8 T cells were coincubated with autologous *Leishmania*-infected macrophages in a 10 : 1 ratio. After 4 h, the cells were harvested and stained with anti-CD14-PE antibodies to select the target cells. They were also analysed for annexin V-FITC to detect apoptotic cells. Ten thousand events were analysed by FACS (a). It can be seen that macrophages from LCL patients presented a higher degree of apoptosis than patients with DCL (b and c). The cytotoxic index (C.I.) was calculated using the formula  $C.I. = CD14 + annexin V + of CD8 T cells incubated with Leishmania-infected macrophages - CD14 + annexin V + of CD8 T cells incubated with uninfected macrophages$  (d).

macrophages in the tissue lesions. Yet this observation was related to the formation of the ulcer, since a large number of apoptotic keratinocytes was also found in the lesion (62).

Even though evidence points towards cytotoxicity as an immune mechanism favouring protection, the role of cytotoxicity and the production of cytokines by CD8 cells in the different clinical forms of human leishmaniasis remains to be established. Preliminary data from our laboratory have added additional evidence of the protective role of cytotoxic mechanisms of CD8 T cells in patients with cutaneous leishmaniasis infected with *L. mexicana*. Whereas CD8 T cells from LCL patients presented a strong cytotoxic effect on *Leishmania*-infected macrophages, the CD8 T cells obtained from DCL patients were unable to induce cytotoxicity on macrophages infected with *L. mexicana* (Figure 5).

In addition, the strong cytotoxicity exerted by LCL CD8 T cells on *L. mexicana*-infected autologous macrophages correlated with the enhanced number of apoptotic cells observed in tissue lesions of LCL patients. On the other hand, the absence of cytotoxicity of CD8 T cells on infected macrophages of DCL patients correlated with low levels of apoptotic cells in tissue lesions of these patients (manuscript in preparation). This could possibly indicate that CD8 T cell activation through cross-presentation of apoptotic bodies by DC is an important immune mechanism for the protective response in leishmaniasis. It remains to be established if cross-

presentation of *Leishmania* antigens through this mechanism also determines the cytokine pattern that favours disease control. If this should be the case, the inhibition of apoptosis of *Leishmania*-infected macrophages (63) could represent a mechanism through which the parasite could avoid alerting the immune system and thus favour its survival in the host cell. These data strengthen the evidence that cytotoxicity of CD8 T cells on *Leishmania*-infected macrophages represent an immune response that leads to disease control.

## CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

CD8 T cells have been shown to kill autologous infected macrophages, albeit it is not clear if this occurs via granzyme/perforin and/or Fas/FasL and if the apoptosis induced by cytotoxicity on infected macrophages additionally eliminates the intracellular parasites and thus helps to control the *Leishmania* infection, as has been shown of the cytotoxic response towards *M. tuberculosis*, where apoptosis of infected cells was shown to decrease bacteria viability (64,65). Even though one of the first reports that analyse the participation of CD8 T cells in the immune response against *Leishmania* states that the cytotoxic effect exerted on infected macrophages does not affect the parasites, the method used in this study to analyse the parasite viability only permits to define whether the parasites conserved their capacity to survive without host cells (66).



Apoptotic degradation of *Leishmania* could not only play a role in the control of parasite numbers but it could also represent a unique opportunity of enhanced *Leishmania* antigen processing and presentation, since live parasites cause an inhibition of the host cell avoiding efficient antigen degradation and presentation. Even though little is known regarding the mechanisms that activate *Leishmania*-specific CD8 T cell clones, it is currently accepted that CD8 T cells participate in the control of *Leishmania* infection, both through their cytokine production as well as through their cytotoxicity. Further knowledge in this field will undoubtedly help to improve the design of therapeutic and vaccine strategies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Marco Gudiño Zayas for technical support and to Lucia Álvarez for excellent secretarial support. Joséln Hernández Ruiz was supported by a fellowship from D.G.E.P. of the Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by grants PAPIIT IN 221806-3 and CONACyT 47256-M.

## REFERENCES

- Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 1999; **44**: 1–39.
- Courret N, Frehel C, Gouhier N, *et al.* Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2303–2316.
- Roberts LJ, Handman E & Foote SJ. Science, medicine, and the future: leishmaniasis. *BMJ* 2000; **321**: 801–804.
- Berman J. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997; **24**: 684–703.
- Bertho A, Santiago M, Da-Cruz A & Coutinho S. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**: 317–325.
- Hailu A & Frommel D. Leishmaniasis. In Kloos H, Ahmed Z (eds): *The Ecology of Health and Disease in Ethiopia*. Oxford, Westview Press, 1993: 375–388.
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll like receptors. *Mol Biochem Parasitol* 2003; **130**: 65–74.
- Carrada G, Cañeda G, Salaiza N, *et al.* Innate cytokines and costimulatory molecules expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol* 2007; **29**: 117–126.
- Bogdan C & Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today* 1999; **15**: 22–28.
- Scott P. IFN- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991; **147**: 149–155.
- Silveira FT, Lainson R & Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; **99**: 239–251.
- Peters N & Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; **213**: 159–179.
- Kedzierski L, Zhu Y & Handman E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology* 2006; **133**: S87–S112.
- Wooland D & Dutton R. Heterogeneity of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**: 336–342.
- Jiang H & Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *Clin Invest* 2004; **114**: 1198–1208.
- Trapani J & Smyth M. Functional significance of the perforin/ granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 735–747.
- Orange J & Ballas Z. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006; **118**: 1–10.
- Bourgeois C, Rocha B & Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8<sup>+</sup> T cells in the generation of CD8<sup>+</sup> T cell memory. *Science* 2002; **297**: 2060–2063.
- Schoenberger S, Toes R, van der Voort E, Offringa R & Melief C. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature* 1998; **393**: 480–483.
- Melief C. Regulation of T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol* 2003; **33**: 2645–2654.
- Accapezzato D, Francavilla V, Propato A, Paroli M & Barnaba V. Mechanisms inducing or controlling CD8<sup>+</sup> T cell responses against self- or non-self-antigens. *Ann NY Acad Sci* 2003; **987**: 99–106.
- Harty J, Tvinnereim A & White D. CD8<sup>+</sup> T cell effectors mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 275–308.
- Lopez J, Lebowitz J, Beverly S, Rammensee H & Overath P. *Leishmania mexicana* promastigotes induce cytotoxic T lymphocytes *in vivo* that do not recognize infected macrophages. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 217–223.
- Bertholet S, Debrabant A, Afrin F, *et al.* Antigen requirements for efficient priming of CD8<sup>+</sup> T cells by *Leishmania major* infected dendritic cells. *Infect Immun* 2005; **73**: 6620–6628.
- Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, *et al.* *Leishmania* antigens are presented to CD8<sup>+</sup> T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2006; **177**: 3525–3533.
- Kima P, Ruddle N & McMahon-Pratt D. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8 T cells. *J Immunol* 1997; **159**: 1828–1834.
- Schaible U, Winau F, Sieling P, *et al.* Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 2003; **9**: 1039–1046.
- Fonteneau J, Kavanagh D, Lirvall M, *et al.* Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 2003; **102**: 4448–4455.
- Guermonprez P & Amigorena S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol* 2005; **26**: 257–271.
- Winau F, Kaufmann S & Schaible U. Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol* 2004; **6**: 599–607.
- Kovacs-Bankowski M & Rock K. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995; **267**: 243–246.
- Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P & Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 362–368.
- Houde M, Bertholet S, Gagnon E, *et al.* Phagosomes are

- competent organelles for antigen cross-presentation. *Nat* 2003; **425**: 402–406.
- 34 Guernonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, van Endert P & Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003; **425**: 397–402.
- 35 Huber M, Timms E, Mak E, Rollinghoff M & Lohoff M. Effective and long lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun* 1998; **66**: 3968–3970.
- 36 Titus R. Involvement of specific L $\alpha$ 2+ T cells in the immunological control of experimental induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1987; **17**: 1429–1433.
- 37 Belkaid Y. CD8<sup>+</sup> T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 2002; **168**: 3992–4000.
- 38 Uzonna J, Joyce K & Scout P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon  $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 2004; **199**: 1559–1566.
- 39 Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J & Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol* 1991; **3**: 587–597.
- 40 Herath S, Kropf P & Müller I. Cross-talk between CD8 and CD4 T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8<sup>+</sup> T cells are required for optimal IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells. *Parasite Immunol* 2003; **25**: 559–567.
- 41 Conceição F, Perlaza B, Louis J & Romero P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class-I restricted cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 2813–2817.
- 42 Farajnia S, Mahboudi F, Ajdari S, Reiner NE, Kariminia A & Alimohammadian MH. Mononuclear cells from patients recovered from cutaneous leishmaniasis respond to *Leishmania major* amastigote class I nuclease with a predominant Th1-like response. *Clin Exp Immunol* 2005; **139**: 498–505.
- 43 Da-Cruz AM, Conceicao-Silva F, Bertho AL & Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994; **62**: 2614–2618.
- 44 Da-Cruz A, Bittar R, Mattos M, *et al.* T cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long term evaluation alter therapy. *Clin Diag Laboratory Immunol* 2002; **9**: 251–256.
- 45 Da-Cruz A, Bertho AL, Oliveira-Neto M & Coutinho S. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 2005; **153**: 537–543.
- 46 Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander A & Hassan A. Characterization of the local and systemic immune response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol* 1999; **91**: 314–320.
- 47 Salaiza N, Volkow P, Pérez R, *et al.* Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 1999; **4**: 801–811.
- 48 Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho E & Reed S. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1995; **17**: 21–28.
- 49 Brodskyn C, Barral A, Boaventura V, Carvalho E & Barral-Netto M. Parasite-driven *in vitro* human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1997; **159**: 4467–4473.
- 50 Ji J, Masterson J, Sun J & Soong L. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 2005; **174**: 7147–7153.
- 51 Kariminia A, Bourreau E, Pascalis H, *et al.* Transforming growth factor  $\beta$  1 production by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects stimulated with *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 2005; **73**: 5908–5914.
- 52 Roger K & Titus R. The human cytokine response to *Leishmania major* early after exposure to the parasite *in vitro*. *J Parasitol* 2004; **90**: 557–563.
- 53 Roger K & Titus R. Characterization of the early cellular immune response to *Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naïve humans. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **71**: 568–576.
- 54 Conceição F, Hahne M, Schroter M, Louis J & Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 237–245.
- 55 Eisert V, Münster U, Simon M & Moll H. The course of *Leishmania major* infection in mice lacking granzyme-mediated mechanisms. *Immunobiol* 2002; **205**: 314–320.
- 56 Moll H, Müller C, Gillitzer R, *et al.* Expression of T-cell-associated serine proteinase 1 during murine *Leishmania major* infection correlates with susceptibility to disease. *Infect Immun* 1991; **59**: 4701–4708.
- 57 Frischholz S, Rölinghoff M & Moll H. Cutaneous leishmaniasis: co-ordinate expression of granzyme A and lymphokines by CD4<sup>+</sup> T cells from susceptible mice. *Immunobiol* 1994; **82**: 255–261.
- 58 Alexander C, Kaye P & Engwerda C. CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 1199–1210.
- 59 Huang FP, Xu D, Esfandiari EO, Sands W, Wei XQ & Liew FY. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J Immunol* 1998; **160**: 4143–4147.
- 60 Russo DM, Chakrabarti P & Higgins AY. *Leishmania*: naïve human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8<sup>+</sup> cytotoxic effectors. *Exp Parasitol* 1999; **93**: 161–170.
- 61 Bousoffara T, Louzir H, Salah B & Dellagi K. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2004; **189**: 1265–1273.
- 62 Eidsmo L, Nylen S, Khamesipour A, Hedblad M, Chiodi F & Akuffo H. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 2005; **166**: 1099–1108.
- 63 Moore KJ & Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 1994; **152**: 2930–2937.
- 64 Stenger S. Cytolytic T cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Infect Dis* 2001; **33**: 483–487.
- 65 Kumar J, Okada S, Clayberger C & Krensky AM. Granulysin: a novel antimicrobial. *Expert Opin Invest Drugs* 2001; **10**: 321–329.
- 66 Smith L, Rodrigues M & Russel D. The interaction between CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. *J Exp Med* 1991; **174**: 499–505.

# CD8 Cells of Patients with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Display Functional Exhaustion: The Latter Is Reversed, *In Vitro*, by TLR2 Agonists

Joselín Hernández-Ruiz<sup>1,6</sup>, Norma Salaiza-Suazo<sup>1</sup>, Georgina Carrada<sup>2</sup>, Sofía Escoto<sup>1</sup>, Adriana Ruiz-Remigio<sup>1</sup>, Yvonne Rosenstein<sup>3</sup>, Alejandro Zentella<sup>4,5</sup>, Ingeborg Becker<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México OD, México Distrito Federal, Mexico, **2** Secretaría de Salud del Estado de Tabasco y Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Mexico, **3** Instituto de Biotecnología y Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, **4** Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Secretaría de Salud, México Distrito Federal, Mexico, **5** Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, Mexico, **6** Dirección de Investigación, Hospital General de México OD, México Distrito Federal, Mexico

## Abstract

*Leishmania mexicana* (Lm) causes localized (LCL) and diffuse (DCL) cutaneous leishmaniasis. DCL patients have a poor cellular immune response leading to chronicity. It has been proposed that CD8 T lymphocytes (CD8) play a crucial role in infection clearance, although the role of CD8 cytotoxicity in disease control has not been elucidated. Lesions of DCL patients have been shown to harbor low numbers of CD8, as compared to patients with LCL, and leishmanicidal treatment restores CD8 numbers. The marked response of CD8 towards *Leishmania* parasites led us to analyze possible functional differences between CD8 from patients with LCL and DCL. We compared IFN $\gamma$  production, antigen-specific proliferation, and cytotoxicity of CD8 purified from PBMC against autologous macrophages (MO) infected with *Leishmania mexicana* (MOi). Additionally, we analyzed tissue biopsies from both groups of patients for evidence of cytotoxicity associated with apoptotic cells in the lesions. We found that CD8 cell of DCL patients exhibited low cytotoxicity, low antigen-specific proliferation and low IFN $\gamma$  production when stimulated with MOi, as compared to LCL patients. Additionally, DCL patients had significantly less TUNEL<sup>+</sup> cells in their lesions. These characteristics are similar to cellular "exhaustion" described in chronic infections. We intended to restore the functional capacity of CD8 cells of DCL patients by preincubating them with TLR2 agonists: Lm lipophosphoglycan (LPG) or Pam3Cys. Cytotoxicity against MOi, antigen-specific proliferation and IFN $\gamma$  production were restored with both stimuli, whereas PD-1 (a molecule associated with cellular exhaustion) expression, was reduced. Our work suggests that CD8 response is associated with control of Lm infection in LCL patients and that chronic infection in DCL patients leads to a state of CD8 functional exhaustion, which could facilitate disease spread. This is the first report that shows the presence of functionally exhausted CD8 T lymphocytes in DCL patients and, additionally, that pre-stimulation with TLR2 ligands can restore the effector mechanisms of CD8 T lymphocytes from DCL patients against *Leishmania mexicana*-infected macrophages.

**Citation:** Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, et al. (2010) CD8 Cells of Patients with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Display Functional Exhaustion: The Latter Is Reversed, *In Vitro*, by TLR2 Agonists. PLoS Negl Trop Dis 4(11): e871. doi:10.1371/journal.pntd.0000871

**Editor:** Genevieve Milon, Institut Pasteur, France

**Received:** March 11, 2010; **Accepted:** October 5, 2010; **Published:** November 2, 2010

**Copyright:** © 2010 Hernández-Ruiz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) number IN220109 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) numbers 47256-M and 102155. JHR was a recipient of fellowships from Dirección General de Estudios de Posgrado and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: becker@servidor.unam.mx

## Introduction

Leishmaniasis is a zoonotic disease that infects humans as well as a variety of mammalian species. Several *Leishmania* species, such as *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. aethiopica* can cause two opposite clinical forms of cutaneous leishmaniasis: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) [1]. While the former is relatively benign, consisting of a single ulcer that forms at the infection site, patients with DCL have a continuous uncontrolled spread of the parasite throughout the skin and, in advanced stages, these patients also show parasite invasion of the oro- and nasopharyngeal mucosae. Although the prevalence of DCL patients in Mexico is low, they

represent a public health problem for which no successful cure has been found. These patients lack an effective T cell immune response capable of activating MOi, and antimonial treatment only achieves transitory remission [2, 3 and 4].

Murine models infected with *L. major* have shown that both the innate and acquired immune responses are necessary for parasite clearance. Cells such as MO, dendritic cells, NK cells, CD8 and CD4 T lymphocytes; cytokines such as interleukin (IL)-12 and interferon gamma (IFN $\gamma$ ), pattern recognition receptors such as Toll like receptors (TLRs) [6,7,8] and effector molecules such as nitric oxide (NO) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [9] have been reported to mediate protection, both in mouse models and in humans. It has also been proposed that CD8 T cells play a crucial

### Author Summary

*Leishmania mexicana* causes localized and diffuse cutaneous leishmaniasis. Whereas the former is a benign form of the disease, diffuse cutaneous leishmaniasis is a chronic disfiguring disease, for which no cure is available, and the immune cells of these patients respond poorly to the parasite. It has been proposed that the elimination of *Leishmania*-infected cells by CD8 T cells is crucial for disease control. We compared the functional characteristics of CD8 T cells from patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis. We found that CD8 T cells from patients with diffuse cutaneous leishmaniasis were functionally exhausted, as compared to patients with the benign form of the disease. We were able to restore functional capacity of these cells by culturing them with molecules that stimulate TLR2. This is the first report showing that stimulation of the TLR2 can restore effector mechanisms in functionally exhausted CD8 cells from patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. This finding will help design novel treatment schemes for patients infected with the parasite *Leishmania mexicana* who have the progressive, incurable form of diffuse cutaneous leishmaniasis.

role in infection clearance, although the role of CD8 cytotoxicity in disease control has not been elucidated. Elevated numbers of CD8 have been reported in blood and lesions of patients infected with *L. major* and *L. mexicana* and their protective role has been associated with IFN $\gamma$  production [10]. Additionally, we have previously reported that the number of CD8 is importantly reduced in lesions of DCL patients infected with *L. mexicana*, as compared to LCL patients [11]. Thus, a comparative analysis of the overall immune effector functions of CD8 from LCL and DCL patients would permit a more precise definition of the role played by these cells in the disease outcome, both by their cytokine production as well as by their cytotoxicity. We here report a functional analysis of CD8 isolated from peripheral blood of LCL and DCL patients infected with *Leishmania mexicana*. Our results show significant differences between CD8 of both groups: while CD8 from LCL patients produce high levels of IFN $\gamma$  and show cytotoxicity against autologous MOi, the CD8 from DCL patients show a diminished response both in cytokine production as well in *Leishmania*-specific cytotoxicity. Thereafter we analyzed if the differential cytotoxicity observed *in vitro* also correlated with the number of apoptotic cells in lesions of both groups of patients and found that DCL patients have significantly less TUNEL<sup>+</sup> cells than LCL patients. The diminished CD8 response in DCL patients resembled the cellular “exhaustion” reported for CD8 in other chronic diseases [12,13,14,15], where CD8-effector capacity could be restored by different mechanisms including TLR signaling [16,17,18]. Since TLR2 signaling in CD8 enhanced proliferation and survival *in vitro* [19], we analyzed whether TLR2 stimulation of CD8 from DCL patients could also restore their functional capacity. We therefore stimulated CD8 from DCL patients with the TLR2-specific agonist Pam3Cys and with *Leishmania mexicana* LPG, which has been shown to be a TLR2 ligand capable of activating human peripheral blood mononuclear cells and NK cells to produce Th1-promoting cytokines [6,8]. We show that stimulation with TLR2-specific agonists Pam3Cys or with *Leishmania* LPG can restore the effector functions of CD8 from DCL patients, including IFN $\gamma$  production, antigen specific cellular proliferation and cytotoxicity against MOi. In addition to restoring these functions, TLR2-stimulated CD8 cells showed a reduction in

PD-1 expression, a molecule frequently present in cellular exhaustion. This phenomenon had previously been described with the TLR9 ligand CpG ODN in mice [18].

### Materials and Methods

#### Patients

Human experimentation guidelines of the Mexican Health authorities were strictly followed. The study was reviewed and approved by the Ethics Research Committee of the Medical Faculty of UNAM. Written informed consent was required for all patients. Ten individuals with LCL (4 females and 6 males, mean age = 34.6 $\pm$ 13.9) and four with DCL (1 female and 3 males, mean age = 46 $\pm$ 12.9) from La Chontalpa – Tabasco State (except one DCL), an endemic area in southeastern Mexico, were analyzed. Patients were diagnosed by clinical criteria, parasite presence in lesions, and immunoreactivity to the Montenegro skin test. LCL patients showed skin ulcers containing few parasites and all were positive to the Montenegro test. In contrast, DCL patients had multiple non-ulcerative nodules, harboring an intense parasite load and all were negative in the Montenegro test.

Peripheral blood for *in vitro* experiments was collected in tubes with EDTA (BD Biosciences). Skin biopsy specimens were taken from the lesions with a 4 mm biopsy punch (Stiefel Laboratories, Inc., Coral Gables, FL) after local anesthesia (2% xylocaine). The biopsy specimens were embedded in OCT compound (Miles Scientific, Napperville, IL), snap frozen and stored in liquid nitrogen until examined. All patients received antimonial therapy after sample collection.

#### Immunohistochemistry

Frozen sections were cut with a cryostat and air-dried overnight before the immunostaining procedure. Apoptotic cells in lesions of 7 LCL and 5 DCL patients were detected by the TUNEL method (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche). Briefly, cryostat sections (4  $\mu$ m) were thawed onto coated slides, fixed in paraformaldehyde 4% in PBS pH 7.4 for 20 min, washed 30 min with PBS and incubated with permeabilization solution for 2 min on ice. Slides were rinsed twice with PBS and 50  $\mu$ l TUNEL reaction mixture were added to the tissue sections and incubated for 60 min at 37°C in a humidified atmosphere in the dark. Slides were washed 3 times with PBS and incubated with 50  $\mu$ l of Converter-POD (Anti-fluorescein antibody conjugated with horse-radish peroxidase) in a humidified chamber for 30 min at 37°C. Slides were washed 3 times with PBS and incubated with 50  $\mu$ l of DAB substrate for 10 min at 25°C and washed 3 times with PBS. Then, samples were mounted under glass coverslips and analyzed under light microscope. Double staining with anti-CD8 antibodies was carried out in six samples of LCL patients as follows: after TUNEL staining, slides were washed with 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl. The samples were blocked with Blotto (a solution containing 5% skim milk powder and 0.1% Tween 20 in PBS, pH 7.4) for 30 min at RT. The samples were incubated with primary mouse anti-CD68 (1:100; Dako: Dako Corp., Santa Barbara, CA) during 1 h in a humid chamber at RT. Five-minute washes with 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl were followed by 1 h incubation with biotin-conjugated second-step antibody (goat anti-mouse IgG) at a dilution of 1:50 and with the preformed streptavidin-biotin alkaline phosphatase complex (Dako) for 1 h at RT. The presence of alkaline phosphatase was evidenced by incubation in AP substrate solution containing 1 mM levamisole for 30 min. Then, slides were washed twice in distilled water. Counterstaining was performed with H&E

(Sigma Chemical). The apoptotic cells were identified in a light brown color, whereas MO showed red staining.

#### *Leishmania mexicana* culture

*Leishmania mexicana* (MHOM/MX/92/UADY/68) promastigotes were grown in RPMI-1640 medium (Life Technologies Laboratories, Gaithersburg, MA, USA) supplemented with 5% heat-inactivated FBS at 28°C. Parasites were sub-cultured every 4 to 5 days and grown to a density of  $1 \times 10^6$ /ml. Promastigotes were harvested from stationary-phase cultures, centrifuged at 3500 rpm for 10 min, washed three times in PBS, and finally counted after immobilization with glycerol.

#### CD8 and MO purification

Peripheral blood mononuclear cells were separated by Ficoll-Hypaque gradient (Sigma) and CD8 were isolated by magnetic cell sorting system as described by manufacturer' instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Briefly,  $1 \times 10^7$  PBMC was suspended in 40  $\mu$ l PBS containing 10  $\mu$ l of anti-CD8 microbeads and incubated for 30 min at 4°C. The cells were washed with PBS and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. They were then passed through the LS separation columns (Miltenyi) placed in magnetic field. The positive fraction was cultured in RPMI/FBS 10%. The negative fraction was processed again in order to purify MO ( $1 \times 10^7$  cells in 40  $\mu$ l of PBS with 10  $\mu$ l of anti-CD14 microbeads). MO were cultured in RPMI/FBS 10%. Both CD8 and MO were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> incubator for 12 h before stimulus in order to reach a resting condition.

#### MO infection

$1 \times 10^6$  MO were co-incubated with  $1 \times 10^7$  *L. mexicana* promastigotes for 3 h at 28°C in 1 ml RPMI. Afterwards, cells were cultured for additional 18 h at 37°C. Non-ingested promastigotes were washed away with RPMI.

#### Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of CD8 cells on MOi was analyzed by two methods: <sup>51</sup>Cr-release and Flow cytometry. The optimal CD8/MOi ratio was established as 10/1.

**<sup>51</sup>Cr-release assay.** The assay was performed as previously described [20]. Briefly, MO or MOi were labeled with 100  $\mu$ Ci of <sup>51</sup>Cr (Perkin Elmer) for 1 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The labeled cells were washed twice in RPMI, suspended in RPMI and  $1 \times 10^6$  CD8 were co-incubated with autologous  $1 \times 10^5$  MOi. Co-cultures were set up in 24 well flat bottom plates (Linbro, Aliso Viejo, CA) and plates were incubated in triplicate for 4 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Controls included MOi incubated in medium alone for spontaneous release and MOi incubated in 5% (v/v) Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) in PBS for maximum release. Radioactivity was measured by Wallac Wizard1470 Automatic Gamma Counter. The cytotoxicity percentage was calculated using the formula: % cytotoxicity = (sample cpm - spontaneous cpm) / (maximal cpm - spontaneous cpm)  $\times$  100%.

**Flow cytometric assay.** The assay was performed as previously described [21]. Briefly,  $1 \times 10^6$  CD8 were mixed with autologous  $1 \times 10^5$  MOi or MO in 24 well clear flat bottom ultra low attachment plates and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 4 h. After incubation, 5  $\mu$ l of Ab anti-CD14 PE (BD; Becton Dickinson Biosciences, San Jose CA) were added for 15 min at 4°C. Afterwards, 10  $\mu$ l of a 5  $\mu$ g/ml solution of 7-AAD (Sigma) diluted in Annexin Binding buffer  $1 \times$  from  $10 \times$  concentrate (BD), and 5  $\mu$ l of annexin V-FITC (BD) were added to the cell

suspension for 10 min on ice. Samples were analyzed on a FACSCanto II flow cytometer (BD). A minimum of 20 000 events were collected and analyzed with DIVA software from the instrument manufacturer. The cytotoxicity index (C.I.) was calculated using the formula: C.I. =  $\frac{\{(CD14^+ \text{ annexin V}^+\) of CD8 incubated with MOi\} - \{(CD14^+ \text{ annexin V}^+\) of CD8 incubated with MO\}}{\{(CD14^+ \text{ annexin V}^+\) of CD8 incubated with MOi\}}$ .

In a parallel experiment, the expressions of FasL and Granzyme B were evaluated using Ab anti-FasL - PE (BD) and anti-granzyme - Alexa Fluor 647 (BD). The supernatant was harvested for IFN $\gamma$  detection by means of ELISA test.

#### Proliferation assay

The proliferation of CD8 in response to autologous MOi was analyzed as previously described [22]. Briefly, PBMC were suspended in RPMI with CFDA (Sigma) [5  $\mu$ M] during 10 min at 37°C and washed twice in RPMI. Cells were cultured at  $1 \times 10^6$  per ml and  $2 \times 10^5$  MOi were added. MO or Con A [5  $\mu$ g/ml] (Sigma) were used as controls. The cells were co-cultured for 7 days at 37°C. Cells were harvested and incubated in the presence of anti-CD3 CyChrome and anti-CD8 PE (BD). Stained samples were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS, and analyzed by multicolor flow cytometry immediately after the end of the incubation period. The percentage of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CFDA<sup>low</sup> was recorded.

#### IFN $\gamma$ production

The effect that MOi had on the production of IFN $\gamma$  by CD8 was analyzed as follows.  $1 \times 10^6$  PBMC were co-incubated with  $2 \times 10^5$  MOi or MO during 18 h after which 1  $\mu$ l GolgiPlug (BD) was added and incubated for additional 5 h. Cells were harvested and incubated in the presence of anti-CD8 PE (BD). They were washed twice with PBS. Cells were suspended in CitoFix/CitoPerm (BD) and washed with Perm/Wash. Then, cells were incubated with anti-IFN $\gamma$  PE-Cy7 (BD) and washed twice on Perm/Wash. Stained samples were suspended in PBS and analyzed by multicolor flow cytometry.

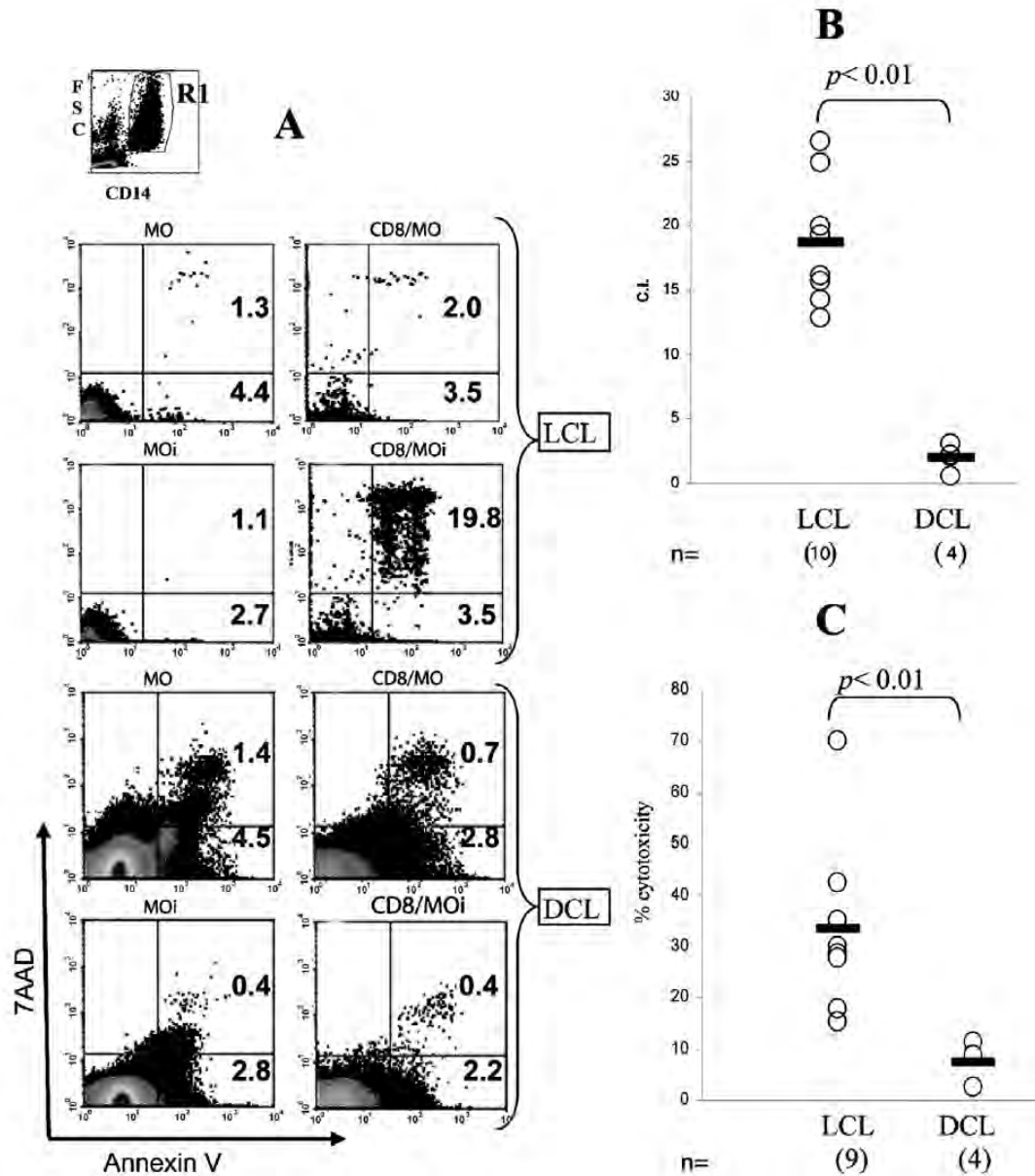
IFN $\gamma$  production was also analyzed in the supernatants of the cytotoxicity experiments using standard ELISA assays. In brief, 96-well microtitre plates (Costar, Corning, NY) were coated with un-conjugated anti-IFN $\gamma$  (clone NIB42; 6  $\mu$ g/ml; BD) capture antibody in 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9.0 during 12 h at 4°C, and blocked with PBS 0.1N NaOH, 0.5% casein, pH 7.4. Supernatants and hIFN $\gamma$  recombinant standard (R&D Systems, PR) were incubated in RPMI/FBS 10% during 2 h at RT. hIFN $\gamma$  was detected using biotinylated mouse Ab anti-hIFN $\gamma$  (clone 4S.B3, 0.5  $\mu$ g/ml; BD) in 1% BSA, 0.05% Tween 20 using streptavidine labeled with alkaline phosphatase (Life Technologies) and p-nitrophenyl phosphate (4 mg/ml, Life Technologies) as substrate. Absorbance was read at 405 nm and IFN $\gamma$  concentration was evaluated in the hIFN $\gamma$  recombinant standard curve. IFN $\gamma$  concentration in every sample was calculated by lineal regression using mean absorbance (average of three lectures by sample). Detection limit was of  $\sim$ 15 pg/ml.

#### Stimulation with TLR2 ligands

Purified *Leishmania mexicana* LPG was obtained as previously described (6). Commercial Pam3Cys-Ser-(Lys) 4 (PAM) was used as control (EMC Microcollections GmbH, Tübingen, Germany). Purified CD8 ( $1 \times 10^6$ ) of DCL patients were stimulated with LPG 10  $\mu$ g/ml or PAM 2  $\mu$ M during 24 h. Cells were harvested, washed twice, and used in cytotoxic assays. For proliferation and IFN $\gamma$  production assays,  $1 \times 10^5$  pre-stimulated purified CD8 were co-incubated with autologous  $9 \times 10^5$  PBMC and experiments were

carried out as described above. Additionally, PD-1 expression was analyzed in non-stimulated and stimulated CD8 stained with anti-CD8 PE, anti-CD3 CyChrome and anti-PD-1 FITC.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were tested using Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.



**Figure 1. Cytotoxicity assay of CD8 against autologous *Leishmania*-infected macrophages (MOi).** A) Culture dotplots (annexin V vs. 7AAD) from MO, MOi, CD8/MO, and CD8/MOi of LCL and DCL patients. In top, the R1 region corresponds to the CD14<sup>+</sup> cells analyzed. The percentage of annexin V<sup>+</sup> cells are shown. B) Analysis of flow cytometry assay. Cytotoxicity index (C.I.) was calculated from 10 LCL and 4 DCL patients. C) Analysis of Cr<sup>51</sup> release assay. The % cytotoxicity was calculated from 9 LCL and 4 DCL patients. The bars show the mean of C.I. and % cytotoxicity.  $p$  was obtained by the Mann-Whitney U test. doi:10.1371/journal.pntd.0000871.g001

## Results

### CD8 cytotoxic against autologous MOi

In our previous report about cellular infiltrate in lesions of DCL patients we described that the number of CD8 is importantly reduced as compared to LCL patients [11]. The reduction in the number of CD8 cells in lesions of DCL patients led us to analyze if their cytotoxic effector function was also altered. Thus, we analyzed the cytotoxic capacity of CD8 of LCL and DCL patients against autologous MOi. The cytotoxic capacity was measured by two methods: flow cytometry and  $^{51}\text{Cr}$  radiolabeling (Figure 1). Prior to the cytotoxic experiments, the optimal CD8: MOi ratio had been established as 10:1 (data not shown). The cytometry assay revealed that patients with LCL had a C.I. of 19.8 as compared to DCL patients, which showed a C.I. of 0.4, as evidenced by double positive MOi dot blots (Figure 1A and 1B). Additionally,  $^{51}\text{Cr}$  radiolabeling showed that the mean percentage of cytotoxicity in LCL patients was 18% as compared to 3% in DCL patients (Figure 1C). Thus, both methods showed a significantly higher cytotoxicity of CD8 cells from LCL patients, as compared to DCL patients, where cytotoxicity was almost null ( $p < 0.01$ ). In order to rule out the possibility that CD8 death could be responsible for the low cytotoxicity in DCL patients, we analyzed CD8 expression of annexin V by flow cytometry assay and found that CD8 do not undergo apoptosis when they are co-cultured with MOi (data not shown).

### CD8 cytotoxic mechanism against autologous MOi in LCL

CD8 T lymphocytes can exert cytotoxicity by two mechanisms: granule exocytosis and death ligands, Granzyme B and FasL are prominent executor molecules of these pathways [23]. To determine the mechanism by which CD8 kill MOi, we measured the expression of granzyme B and FasL, before and after cytotoxic

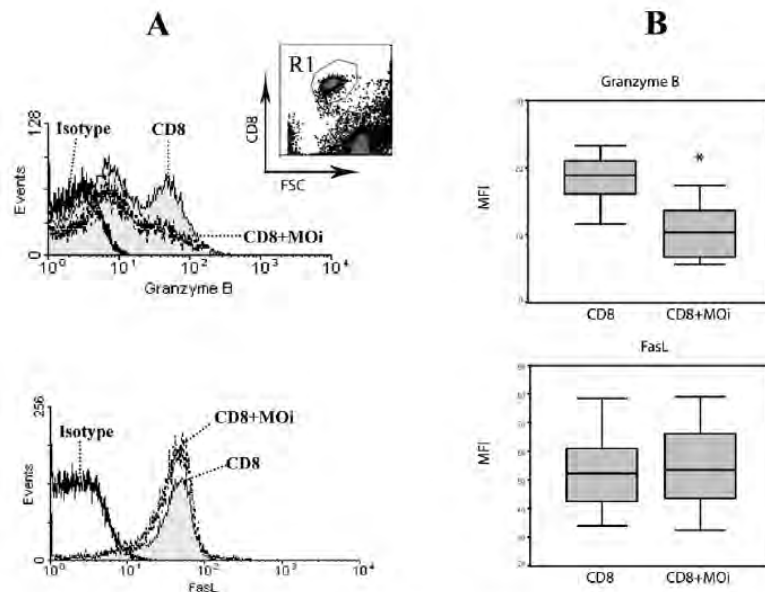
challenge with autologous MOi from LCL patients, which were the only ones that had exhibited cytotoxic capacity. These assays however were carried out in a CD8:MOi ratio of 1:1 since this permitted better FACS analysis of protein expression in CD8 T cells (Figure 2). Whereas FasL expression remained unchanged, granzyme B expression decreased significantly ( $p < 0.01$ ) (Figure 2B) after the cytotoxic challenge, which suggests that cytotoxicity is mediated by cytotoxic granules.

### Specific CD8 proliferation

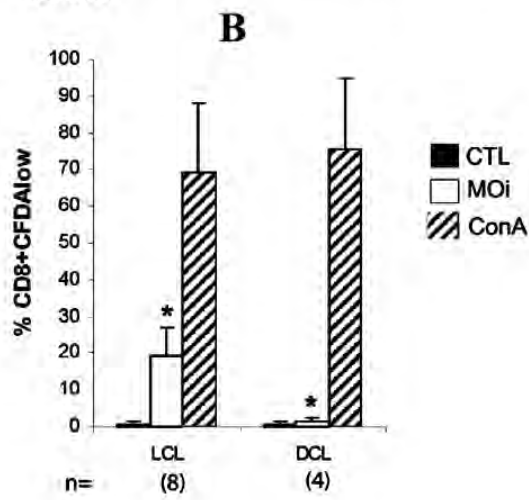
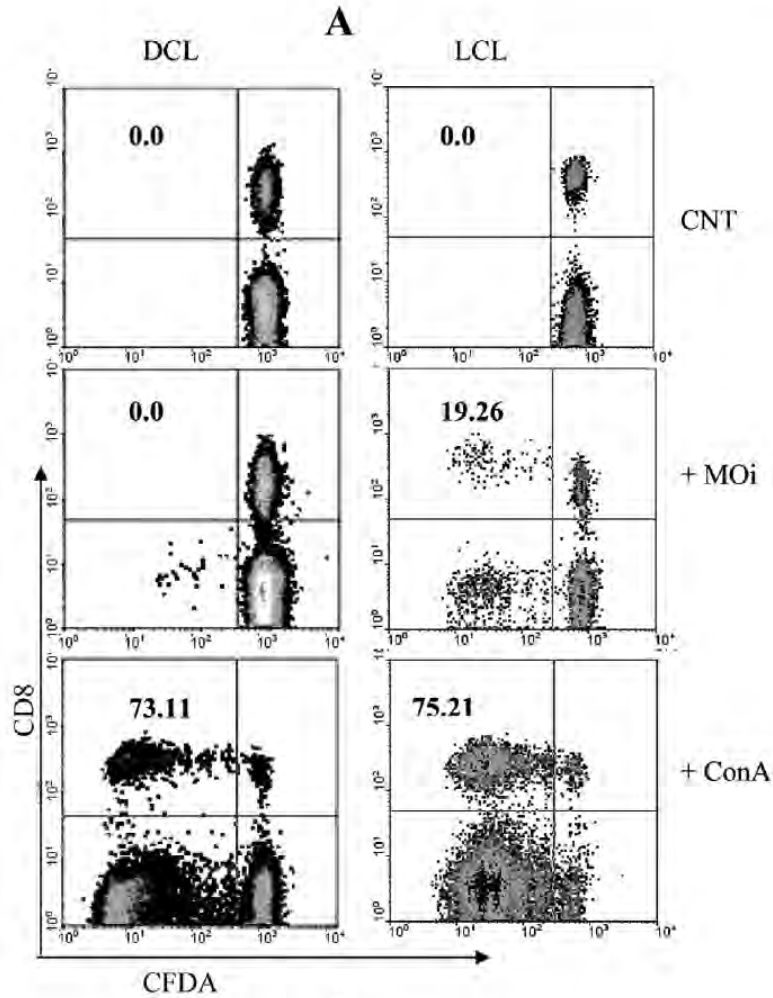
As CD8 from DCL patients had shown a different cytotoxic capacity with regard to LCL patients, we investigated other functions that could be altered in the cells of both groups of patients, such as specific proliferation of cells in contact with *Leishmania* antigens. CD8 proliferation was evaluated in PBMC cultures incubated with MOi. After 7 days of culture, a CD8<sup>+</sup>CFDA<sup>low</sup> group was detected in LCL patients, formed by cells that proliferated as a response to the stimulus of MOi (Figure 3A). This group was not found in DCL patients, however, a CD8<sup>+</sup>CFDA<sup>low</sup> group mainly consisting of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells was detected (data not shown). The proliferation of CD8 was only evidenced when the cells were stimulated with MOi and the difference between LCL and DCL patients was statistically significant (% CD8<sup>+</sup>CFDA<sup>low</sup> MOi LCL = 18.37 ± 7.1 vs DCL = 2.3 ± 1.5) ( $p < 0.01$ ) (Figure 3B). Stimulation with Con A, as positive control, did not show differences in CD8 proliferation between LCL and DCL patients. This shows that the lack of response in CD8 of DCL patients is specific towards autologous MOi with *Leishmania*.

### IFN $\gamma$ production by CD8

Another reported function of CD8 T cells in leishmaniasis is IFN $\gamma$  production [10]. To examine if there are differences in the



**Figure 2. Cytotoxic mechanism analysis.** A) LCL patient CD8 were labeled for granzyme B or FasL in CD8 alone or co-cultured with MOi (CD8+MOi) 1:1 for 4 h. R1 was analyzed from the CD8 vs FSC dotplot (top). Data are representative of 10 LCL patients. B) Mean fluorescence intensity (MFI) for Granzyme B and FasL expression were analyzed in 10 LCL patients. T-student test was carried out between CD8 and CD8+MOi ( $p < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pntd.0000871.g002





**Figure 3. Lymphocyte proliferation in LCL and DCL patients.** A) CFDA-labeled PBMC were incubated with PBS (CNT), MOi or Con A [5  $\mu$ M] for seven days. CFDA<sup>low</sup> cell percentages of total CD8 are shown. Representative dotplots from 8 LCL and 4 DCL patients are shown. B). Proliferation analysis of CD8 from 8 LCL and 4 DCL patients, stimulated with PBS (black bars), MOi (white bars) and Con A (striped bars) are shown ( $p < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pntd.0000871.g003

cytokine secretion of between CD8 of LCL and DCL patients when they are stimulated with autologous MOi, a 24-h *in vitro* assay was performed after which lymphocytes were labeled for intracellular IFN $\gamma$ . Only CD8 LCL patients showed response to MOi (%CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> DCL = 1.8+/-2.5 vs LCL = 17.5+/-3.9) ( $p < 0.01$ ) (Figure 4A and 4B). This group of CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells was not detectable in DCL patients. None of the patients showed CD8<sup>+</sup>IL4<sup>+</sup> cells (data not shown). IFN $\gamma$  was also measured in the supernatants of flow cytometric cytotoxic assays by ELISA. The results show that IFN $\gamma$  was only detected in LCL patients (IFN $\gamma$  CD8+MOi DCL = 20 pg/ml +/-4 vs LCL = 241.8pg/ml +/-137.1) ( $p < 0.01$ ) (Figure 4C). The lack of IFN $\gamma$  production by CD8 of DCL was specific towards *Leishmania* antigens since an appropriate response was found to the non-specific mitotic stimulus PMA/Ionomycin (Figure 4A and 4B).

### Apoptosis in tissues

As *in vitro* CD8 cytotoxic assays showed an impaired function of DCL cells as opposed to the robust response found in LCL patients (Figure 1), we examined if biopsies of skin lesions of both groups of patients showed any evidence of the different cytotoxicity between both groups of patients. We analyzed apoptotic cells through TUNEL staining in skin biopsies of LCL and DCL patients (Figure 5A and B). The stain revealed a high proportion of apoptotic cells in tissues of 7 LCL patients (Figure 5A), which was significantly higher as compared to 5 DCL patients (% TUNEL<sup>+</sup> LCL = 63.4% +/-12.08 vs DCL = 20.9% +/-7.43) ( $p < 0.01$ ) (Figure 5B and 5D). Double staining in LCL patients showed that a large number of apoptotic cells were MO (Figure 5C).

### Evaluation of the TLR2 stimulus in CD8 of DCL patient

As CD8 from DCL patients had shown deficiencies in *Leishmania*-specific cellular effector functions, we analyze if this apparent "exhaustion" could be reversed by TLR2 stimulation, as had been previously shown for other chronic diseases. We examined cytotoxicity, antigen-specific proliferation and IFN $\gamma$  production of CD8 from DCL patients, which had previously been stimulated with LPG or Pam3Cys for 24 h. We observed a recovery of the CD8 effector functions, including cytotoxicity, IFN $\gamma$  production and proliferation (Figure 6A, B and C). The stimulus with Pam3Cys induced higher levels in IFN $\gamma$  production as compared to LPG. The response was highest when CD8 were prestimulated with TLR2 ligands and challenged with MOi (Figure 6B). Proliferation was also induced in CD8 cells although they were not the only ones that responded to the stimulus, since a population of CD8<sup>+</sup> lymphocytes also proliferated (Figure 6C). Again, Pam3Cys plus MOi could induce the highest response. Since exhausted T cells have been shown to have increased expression of programmed death-1 (PD-1) molecules, which could be modified by TLR-9 ligand, we analyzed if PD-1 expression in CD8 cells of DCL patients could be modified by TLR2 agonists. We found that PD-1 expression in CD8<sup>+</sup> of DCL patients was significantly reduced after stimulation with both TLR2 agonists, LPG ( $p = 0.02$ ) and Pam3Cys ( $p = 0.005$ ) (Figure 6D).

### Discussion

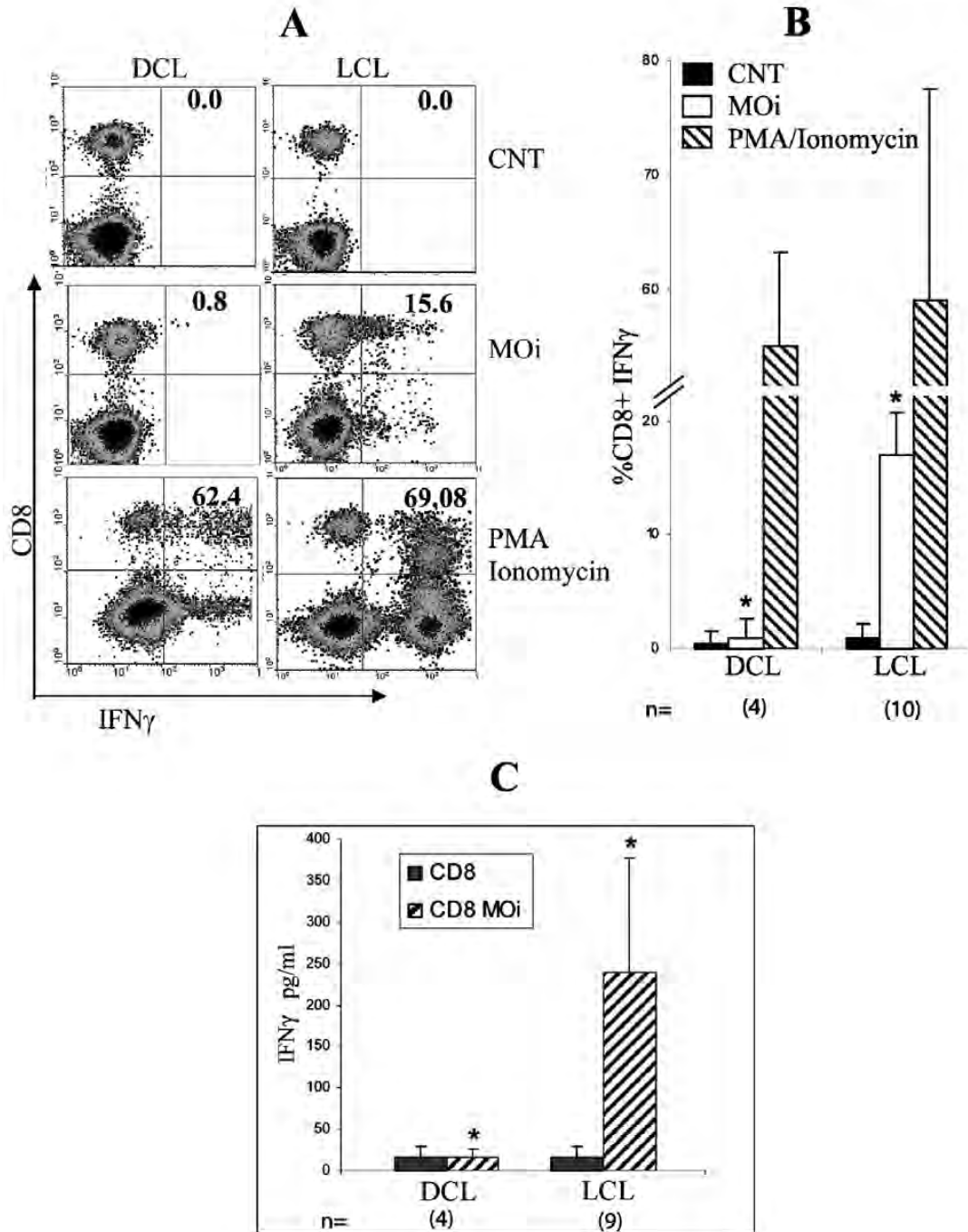
The protective immune response against *Leishmania*, amply studied in mice, is mediated by macrophage-activating cytokines,

such as IFN $\gamma$  and IL-12 [5]. MO activation involves iNOS expression and NO production, the latter being the most important leishmanicidal agent [24]. In humans, IFN $\gamma$  production and iNOS expression have also been directly associated with the resolution of infection. Additionally, CD8 have been shown to play an important role during *Leishmania* infection, both in humans as well as in the mouse model. During the acute phase of the disease, large numbers of CD8 have been described in the lesions as well as in the peripheral blood of patients and they have also been observed during the healing process [10]. Yet thus far, the important role of CD8 in leishmaniasis has been related to their IFN $\gamma$  production [25,26] and little is known of the protective response mediated by the cytotoxicity exerted by these cells [27]. It is additionally not clear, if these cytotoxic cells relate with disease progression in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis.

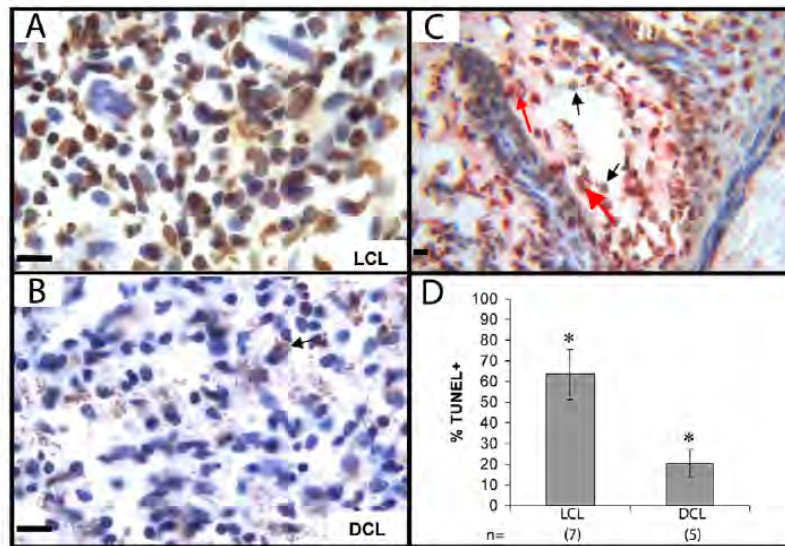
Previous studies of our group have shown that lesions of DCL patients infected with *L. mexicana* harbor low numbers of CD8, as compared to patients with LCL. Interestingly, the leishmanicidal treatment of the DCL patients not only reduced the parasite load but also led to an increase in CD8 during the healing process of the skin lesions of these DCL patients [11]. To date, the mechanism responsible for the reduced presence of CD8 in lesions of DCL patients remains unclear. The marked response of CD8 towards *Leishmania* parasites led us to analyze possible functional differences between these cells from patients with LCL and DCL. We therefore compared *in vitro* antigen-specific proliferation, IFN $\gamma$  production and cytotoxicity of CD8 purified from PBMC of both groups of patients against autologous macrophages infected with *Leishmania mexicana*. Additionally we analyzed tissue biopsies from both groups of patients for evidence of cytotoxicity associated with apoptotic cells in the lesions.

Our data demonstrate that CD8 from DCL patients show a significant reduction in their effector response when coincubated *in vitro* with autologous macrophages infected with *Leishmania mexicana*, as compared to patients with LCL. This diminished cytotoxic response was also evidenced in lesions of both groups of patients, since DCL patients showed significantly less apoptotic cells as compared to LCL patients (Figure 5). Although not much is known of the overall effector mechanisms of CD8 T cells in human leishmaniasis, results obtained in the present work show that both IFN $\gamma$  production, as well as cytotoxicity against *Leishmania*-infected macrophages are hampered in DCL cells. It is therefore feasible to speculate that CD8 cells play an important role in the protective response of LCL patients against the infection with *Leishmania mexicana*, based on our *in vitro* results, together with the large number of apoptotic cells in the tissue lesions of these patients. Although data on the expression of apoptosis in skin lesions are scarce, our work is in accordance with the literature, where apoptotic CD4 and CD8 T lymphocytes have been described in lesions of LCL patients infected with *L. braziliensis*, albeit cell death was attributed to hypersensitivity towards *Leishmania* antigens, leading to activation-induced cell death [28].

MO cell death in tissues could be due to *Leishmania* infection and/or be a consequence of CD8 cytotoxic activity against infected cells. The former mechanism is unlikely, since it has been demonstrated that *Leishmania* can inhibit apoptotic mechanisms in phagocytic cells [29,30,31,32]. The possible benefits derived from cytotoxic CD8-induced apoptosis of the host cells infected with



**Figure 4. IFN $\gamma$  production by CD8 from LCL and DCL patients.** A) PBMC were non-stimulated (CNT), stimulated with PMA-ionomycin during 4 h or with MOi during 24 h. Density diagrams of IFN $\gamma$  vs. CD8 from 10 LCL and 4 DCL patients are shown. B) CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> percentage analysis from 10 LCL and 4 DCL patients are shown. C) ELISA results of IFN $\gamma$  production in supernatants of the co-incubation CD8-MOi from 9 LCL and 4 DCL patients are shown ( $p < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pntd.0000871.g004



**Figure 5. Apoptosis in LCL and DCL patient lesions.** Frozen tissue sections of LCL (A) and DCL (B) were stained with TUNEL. Two representative photographs are shown. C) Double staining of LCL patient tissue: TUNEL in peroxidase (brown), CD68 in phosphatase (red). Black arrows show TUNEL<sup>+</sup> cells, red arrows show TUNEL<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> cells. D). Positive percentage analysis for TUNEL of 7 LCL and 5 DCL patients is shown. Three fields were counted, 200 cells per field ( $p < 0.05$ ). Bar = 20  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pntd.0000871.g005

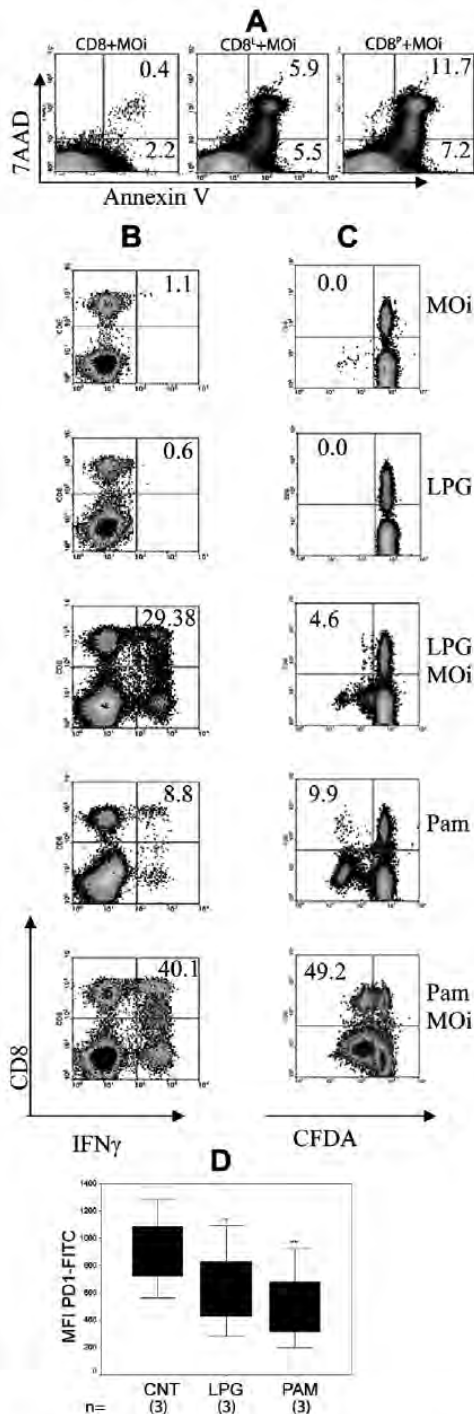
*Leishmania* could be dual: the elimination of the parasite and the expansion of the specific immune response by providing novel parasite antigens [10], as has described for *M. tuberculosis* [33].

Controversy remains regarding the route of activation of CD8 in leishmaniasis, since these cells require antigen presentation through MHC class I to become activated. It is not known how *Leishmania* antigens escape from the parasitophorous vacuole of phagocytic cells into the cytosol to be degraded and transported into the endoplasmic reticulum to be bound to the MHC I molecule. One of the possible mechanisms described in dendritic cells and macrophages is through cross-presentation and involves the chaperone protein Sec61. Another mechanism of cross-presentation of exogenous antigens could be through phagocytosis of apoptotic bodies of infected cells by dendritic cells, which aids the immune response by providing novel parasite antigens [10].

Good prognosis in patients with cutaneous leishmaniasis, infected with *L. major*, has been associated with the expression of granzyme B in tissue lesions [34]. In the present work, granzyme B was also associated with the cytotoxic activity of CD8 of LCL patients against MOi (Figure 2).

Since the presence of CD8 in the lesion has also been correlated with recovery of *Leishmania*-infected patients [11], it is feasible that lack of cytotoxicity of CD8 against MOi (Figure 1) can lead to uncontrolled parasite spread in DCL patients. However the functional efficacy of CD8 cells from patient tissues cannot be comparatively analyzed with those from peripheral blood due to the small size of lesions in LCL patients, which are often no larger than 2 cm of diameter and therefore limit the amount of lymphocytes available for functional experiments. Although we cannot rule out functional differences between CD8 T cells from lesions and those from peripheral blood, data in the literature have suggested that immunological responses *in vitro* of peripheral blood mononuclear cells closely mimic the immune response that occurs in the whole organism [35,36].

One of the possible mechanisms underlying the reduced effector capacity CD8 of DCL patients could be a functional "exhaustion" of these cells induced by a suppressive environment and antigen persistence, as has recently been described [13]. Despite the small number of DCL patients available for this study, due to the low incidence of this form of the disease in Mexico, we found that CD8 of these patients showed certain functional and phenotypic characteristics that resemble the exhaustion condition described in some chronic viral infections [12]. "CD8 cell exhaustion" was initially described in chronic LCMV infection in mice, in which virus-specific CD8 persist, but lack effector functions [37]. In this viral infection, CD8 clones are initially generated, but cytotoxicity and proliferation are lost at an early stage, while IFN $\gamma$  persists for a longer period [38]. Similar types of dysfunctions have been described in human chronic infections and during cancer [12], which suggests that chronic antigen stimulation alone suffices to drive CD8 into exhaustion [13]. Recently in a murine model of *L. donovani* infection, it has been described that parasites initially induce CD8 to divide and produce IFN $\gamma$ . However, CD8 rapidly lose their effector functions and die as the infection progresses [16]. Our present results suggest that the same phenomenon could be occurring in DCL patients, which have a chronic intracellular infection of more than 20 years evolution. These patients do not present delayed cellular hypersensitivity towards specific *Leishmania* antigens, as evidenced by their negative Montenegro skin test, nor do they present a cell-mediated immunity towards the parasite [1] (Figures. 1, 3 and 4). It must be noted that the lack of lymphoproliferative response and the lack of IFN $\gamma$  production of CD8 from DCL patients was specific against *Leishmania* antigens, since these cells preserved their capacity to respond to mitogens such as Con A and PMA/Ionomycin (Figures. 3 and 4). These results suggested that a functional exhaustion towards *Leishmania mexicana* could be present in CD8 of DCL patients. "Exhausted" cells have been shown to express higher levels of PD-1, among other



**Figure 6. Effector functions of CD8 from DCL patients were restored by pre-stimulation with TLR2 ligands.** CD8 from DCL peripheral blood were purified and incubated in *L. mexicana* LPG

[10 µg/ml] (CD8<sup>+</sup>) or Pam3Cys [2 µg/ml] (CD8<sup>+</sup>) for 24 h and washed twice. CD8 were analyzed for: A) Cytotoxicity, B) IFN $\gamma$  production and C) Proliferation. One representative of 3 DCL patients is shown. D) Analysis of mean fluorescence intensity (MFI) for PD-1 expression on non-stimulated (CNT), LPG or Pam3Cys-stimulated CD8 from 3 DCL patients is shown (\* $p=0.02$ , \*\* $p=0.005$ ). doi:10.1371/journal.pntd.0000871.g006

inhibitors, and assays of restoration of these exhausted T-lymphocytes have focused on the use of anti-PD-L1 and PD-L2 antibodies, which prevent binding of T-cell PD-1 to the antigen-presenting cell (APC) ligands PD-L1 and PD-L2 [16,17,38]. In these studies, TCR and CD28 signals sufficed to rescue CD8 in exhaustion, once PD-1 activity was blocked [17].

Recently, Wong and co-workers [18] demonstrated that peptide vaccination in the presence of CpG ODN (TLR9 ligand) reduced expression of PD-1 in mice. In addition to TLR9, another innate receptor that has recently been described in CD8 is TLR2, which triggers cellular activation similar to that of CD28 [39]. Therefore, we hypothesized that TLR2 stimulation could reduce PD-1 expression and restore CD8 functional activity in DCL patients against MOi. Since we had previously shown that LPG, the most abundant surface molecule expressed on the *Leishmania*, is a TLR2 ligand capable of inducing IFN $\gamma$  production in human NK cells [6], we therefore stimulated CD8 from DCL patients with LPG and also with Pam3Cys, a recognized specific TLR2 ligands (Figure 6A, B and C). We found that this preactivation could increase CD8 cytotoxicity against MOi. Also, proliferation and IFN $\gamma$ -producing CD8 could be detected when they were pre-stimulated with LPG or Pam3Cys.

Due to a lack of knowledge of *Leishmania*-specific CD8 T cell epitopes, antigen-specific CD8 responses in CL have not been studied and therefore phenotypic characterization of possible CD8 exhaustion has not been feasible.

Although CD8 exhaustion has not been reported in patients with leishmaniasis, our results on “functional exhaustion” is in accordance with the literature since Joshi and coworkers could demonstrate that *L. donovani* limits CD8 expansion and induces functional exhaustion in an experimental model [16] which was associated with increased PD-1 expression by *Leishmania*-specific CD8. Our analysis also showed that PD-1 expression on CD8 of DCL seems to be associated with functional exhaustion. We were able to show that PD-1 expression on CD8 from DCL patients could be reduced by stimulation with TLR2 ligands and that the reduction correlated with functional restoration (Figure 6D).

These results suggest that stimulation by TLR2 could represent a pathway hierarchically higher than PD-1. The TLR2 receptors are constitutively expressed in memory T lymphocytes, both in CD4 and CD8, and their activation leads to a co-stimulating signal that induces cytokine production and proliferation [39]. Moreover, TLR2 - MyD88 signaling is a critical pathway in CD8 clonal expansion and memory formation *in vivo* [19]. Additionally, TLR signaling influences Treg function, in particular, Pam3Cys has been shown to transiently reduce the expression of FoxP3<sup>+</sup> in Treg cells and to suppress their activity [40]. Thus, TLR2 stimulation is not only limited to innate immune responses, but also regulates the adaptive immune response.

In conclusion, we here show that CD8 of DCL patients lack a cytotoxic activity against autologous macrophages infected with *Leishmania mexicana* and they present functional and phenotypic characteristics of exhausted cells, possibly as a consequence of chronic intracellular infection by *Leishmania mexicana*. We additionally present the first evidence in the literature that TLR2 stimulation can restore their effector functions. It remains to be

determined if the exhausted condition of CD8 towards parasite antigens is a cause or a consequence of the progressive infection of DCL patients by *Leishmania mexicana* and if TLR2 induces downregulation of PD-1 pathway. This finding not only broadens our knowledge of the pathogenesis of the disease but will allow the design of activators of CD8 from DCL patients, based on TLR2 stimulation of the immune response.

## Acknowledgments

Joselin Hernández-Ruiz was a student of the Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. We thank

Lucía Álvarez Trejo for secretarial support, Marco Gudiño Zayas for his support in digital photography, Rocely Cervantes Sarabia and Christina Cañeda Guzmán for their support in parasite cultures. We also thank Isabel Pérez Montfort for translation of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JHR IB. Performed the experiments: JHR NSS SE ARR. Analyzed the data: JHR YR AZ IB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NSS GC IB. Wrote the paper: JHR IB.

## References

- Murray H, Berman J, Davies C, Saravia N (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561–1577.
- Becker I, Volkow P, Velasco-Castrejon O, Salaza-Suazo N, Berzunza-Cruz M, et al. (1999) The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 85: 165–170.
- Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodriguez N, et al. (2004) Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and Bacillus Calmette-Guerin: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 57–62.
- Badaro R, Johnson WD (1993) The role of interferon in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 167(S1): S13–S17.
- Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2: 845–858.
- Becker I, Salaza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, et al. (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130: 65–74.
- Liese J, Schleicher U, Bogdan C (2008) The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213: 377–387.
- Kavosi G, Ardestani SK, Kariminia A (2009) The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology* 136: 1193–1199.
- Bogdan C (2007) Phagocyte effector functions against *Leishmania* parasites. In: Denkers EY, Gazzinelli RT, eds. *Protozoans in Macrophages*. Austin, TX: Landes Bioscience, pp 193–206.
- Ruiz JH, Becker I (2007) CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 29: 671–678.
- Salaza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gällitzer R, et al. (1999) Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 4: 801–811.
- Shin H, Wherry EJ (2007) CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol* 19: 408–415.
- Bucks CM, Norton J, Boesteanu A, Mueller Y, Katsikis P (2009) Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *J Immunol* 182: 6697–6708.
- Barber D, Wherry E, Masopust D, Zhu B, Allison J, et al. (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682–687.
- Day C, Kaufmann D, Kiepiela P, Brown J, Moodley E, et al. (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443: 350–354.
- Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn I, Stäger S (2009) B7-1 blockade increases survival of dysfunctional CD8<sup>+</sup> T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* 5(5): e1000431. doi:10.1371/journal.ppat.1000431.
- Nakamoto N, Kaplan D, Coleclough J, Li Y, Valiga M, et al. (2008) Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134: 1927–1937.
- Wong R, Smith K, Tam V, Pagarigan R, Meisenburg B, et al. (2009) TLR-9 signaling and TCR stimulation co-regulate CD8 T cell-associated PD-1 expression. *Immunol Lett* 127: 60–67.
- Quigley M, Martinez J, Huang X, Yang Y (2009) A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. *Blood* 113: 2256–2264.
- Whiteside T, Bryant J, Day R, Herberman R (1990) Natural killer cytotoxicity in the diagnosis of immune dysfunction: criteria for a reproducible assay. *J Clin Lab Anal* 4: 102–114.
- Derby E, Reddy V, Kopp W, Nelson E, Baseler M, et al. (2001) Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett* 78: 35–39.
- Lyons AB (2000) Analysing cell division *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 243: 147–154.
- Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascuain R (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6: 15–25.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907–916.
- Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G (1991) Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol* 3: 587–597.
- Herath S, Kropf P, Müller I (2003) Cross-talk between CD8 and CD4 T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8<sup>+</sup> T cells are required for optimal IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells. *Parasite Immunol* 25: 559–567.
- Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, et al. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581–596.
- Bertho A, Santiago M, Da-Cruz A, Coutinho S (2000) Detection of early apoptosis and cell death in T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 33: 317–325.
- Moore K, Matlashewski G (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 152: 2930–2937.
- Donovan M, Maciuba B, Mahan G, McDowell M (2009) *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Exp Parasitol* 123: 58–64.
- Valdés-Reyes L, Argueta J, Morán J, Salaza N, Hernández J, Berzunza M, et al. (2009) *Leishmania mexicana*: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol* 121: 199–207.
- Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, et al. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169: 898–905.
- Winaw F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops S, et al. (2006) Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24: 105–117.
- Bousoffara T, Louzir H, Salah B, Dellagi K (2004) Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 189: 1265–1273.
- Rogers KA, Titus RG (2004) The human cytokine response to *Leishmania major* early after exposure to the parasite *in vitro*. *J Parasitol* 90: 557–563.
- Rogers KA, Titus RG (2004) Characterization of the early cellular immune response to *Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naïve humans. *Am J Trop Med Hyg* 71: 568–576.
- Zajac AJ, Blattman J, Murali-Krishna K, Sourdive D, Suresh M, et al. (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188: 2205–2213.
- Wherry E, Blattman J, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77: 4911–4927.
- Kabelitz D (2007) Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 19: 39–45.
- van Maren W, Jacobs J, de Vries I, Nierkens S, Adema G (2008) Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology* 124: 445–452.