

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caracterização *in situ* da resposta imune granulomatosa à *Leishmania braziliensis* em lesões dérmicas crônicas no primata *Macaca mulatta*

Camila Souza Lemos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Gabriel Grimaldi

Co-Orientador: Dr. Renato Porrozzi de Almeida

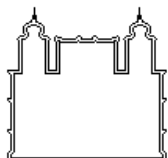
RIO DE JANEIRO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: CAMILA SOUZA LEMOS

Caracterização *in situ* da resposta imune granulomatosa à *Leishmania braziliensis* em lesões dérmicas crônicas no primata *Macaca mulatta*

Orientador: Dr. Gabriel Grimaldi

Co-Orientador: Dr. Renato Porrozi de Almeida

Aprovada em: ___/___/___

EXAMINADORES:

Dra. Claude Pirmez – Presidente da banca examinadora
FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz

Dr. Lain Pontes de Carvalho – Revisor da tese
FIOCRUZ/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Dr. Renato Sergio Marchevsky
FIOCRUZ/Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Dra. Suzana Côrte-Real Faria
FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz

Dr. Marcelo Pelajo Machado
FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 26 de março de 2010

Projeto realizado entre abril de 2006 e março de 2010
no Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL)
do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Trabalho financiado 1) pelo Edital MCT/CNPq 01/2005 – Programa Institutos
do Milênio 2005 – 2008 e 2) pelo Edital MCT/CNPq 02/2006 -Universal

“Ando devagar porque já tive pressa
Levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Eu nada sei...”

Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz”

(Almir Sater e Renato Teixeira)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Gabriel Grimaldi e Dr. Renato Porrozzi de Almeida pela oportunidade de trabalho, apoio, confiança e amizade ao longo desses anos além da dedicação e fundamental participação na minha formação profissional.

Ao Dr. Antonio da Mota Marinho, Chefe do Setor de Primatologia do CECAL/Fiocruz, pelo fornecimento dos primatas, assim como ao Dr. Ricardo Gonçalves Silva, veterinário do Centro de Experimentação Animal do IOC, pela assistência veterinária e apoio na manutenção dos macacos.

Ao Antônio Teva que muito contribuiu para meu aprendizado além da sua sincera amizade.

Aos amigos Marcos, Leo rocha, Léo Alves, Patrícia, Grazielle, Cíntia, pela amizade, carinho e por todo o agradável convívio durante esse tempo no laboratório.

A Simone pela incansável ajuda, amizade e companheirismo ao longo de todos esses anos. Obrigada por tudo!!

A toda galera da biologia molecular: Mariana, Bárbara, Helen, etc...obrigada por tudo!!

Ao amigos da secretaria em especial a Ivone por toda ajuda, carinho e amizade.

A Selma e Valmir pela ajuda nos serviços diários do laboratório e pela amizade.

A professora Eliene Fonseca do Laboratório de Imunohistoquímica da UFF pela sua colaboração, confiança e disponibilização do laboratório para que eu pudesse realizar parte dos experimentos.

As técnicas Rita e Kátia do Laboratório de Imunohistoquímica da UFF que me acompanharam e me orientaram durante os procedimentos. Agradeço também pelo convívio agradável e pela confiança.

A Dra. Suzana do Departamento de Ultra-Estrutura e Biologia Celular pelo apoio na microscopia eletrônica, confiança e grande amizade.

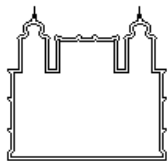
Ao Dr. Marcelo Pelajo por nos disponibilizar o Histolab do Departamento de Patologia para a realização das técnicas de colorações especiais.

Ao veterinário Marcelo Alves Pinto do Departamento de Virologia pela auxilio nos procedimentos cirúrgicos.

A toda minha família em especial minha mãe que é tudo na minha vida, meu irmão grande amigo e pessoa que amo muito e minha sobrinha linda que é o amor da minha vida. Ao meu avô e tio Gaguinho que irão para sempre serem meus exemplos de vida. A Patrícia, grande amiga. Ao grande amigo e irmão Márcio, sem esquecer a Nega, Nego e Neguinha...rs. Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida e foram vocês que me permitiram sair de onde eu sai e chegar onde estou hoje. AMO MUITO VOCÊS!!!

A toda equipe do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose que me propiciou um agradável convívio entre amigos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC, pela compreensão e apoio.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

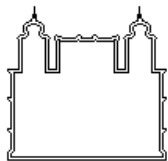
Caracterização *in situ* da resposta imune granulomatosa à *Leishmania braziliensis* em lesões dérmicas crônicas no primata *Macaca mulatta*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Camila Souza Lemos

Para desvendar a fisiopatologia da leishmaniose humana, é necessário um melhor entendimento de como a *Leishmania* é capaz de sobreviver por anos em granulomas imunologicamente ativos. Neste estudo, utilizamos o modelo de infecção macaco Rhesus-*Leishmania braziliensis* (*Macaca mulatta*) de leishmaniose cutânea (LC), como um meio de avaliar a utilidade do sistema primata no estudo da resposta inflamatória crônica granulomatosa desenvolvida pelo hospedeiro tanto na forma auto-resolutiva quanto na forma persistente da doença. Nossos achados reforçam a noção de que existe uma interação entre o sistema imune do hospedeiro e a capacidade patogênica do parasita no resultado clínico da infecção por *Leishmania*. De acordo com os casos documentados de LC em humanos induzida por *L. braziliensis*, as infecções experimentais neste modelo induzem a célula “T-helper” tipo 1 (Th1) mediando a inflamação e levando a formação de granulomas bem organizados, consistindo de todos os tipos celulares específicos encontrados nos granulomas humanos. Nós mostramos que os leucócitos polimorfonucleares são decisivos para controle do parasita nos eventos iniciais da inflamação *in vivo*. Ademais, fagócitos mononucleares que fagocitam granulócitos apoptóticos parasitados parecem ser a chave principal no estabelecimento da infecção nos macacos. A formação do granuloma verificada nos animais é direcionada por diversos mediadores inflamatórios que são importantes para o desenvolvimento das células Th1 e da função de macrófagos efetores. A análise cinética da resposta inflamatória revelou variados marcadores fenotípicos de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, Foxp3 e HLA-DR. Digno de nota, agregados de células B CD20⁺ foram encontrados na lesão crônica, o qual serve como um substrato morfológico para orquestrarem ou modularem o desenvolvimento da resposta duradoura na infecção persistente. Nossos achados indicam que ambos os subgrupos de células regulatórias CD4 Foxp3⁺ e Foxp3⁻ expressando interleucina-10 previne a erradicação da *L. braziliensis* da pele inflamada, desse modo, suprimindo uma eventual resposta curativa em macacos com LC persistente. Esses resultados apontam a viabilidade do uso desse modelo para elucidar, totalmente, os mecanismos moleculares das células t regulatórias mediadoras da supressão na resposta imune efetora, resultando assim o crescimento descontrolado do granuloma durante a leishmaniose, o que é necessário ser considerado em qualquer estratégia proposta para o controle terapêutico dessa importante doença inflamatória.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

In situ characterization of the granulomatous immune response in chronic skin lesions of *Leishmania braziliensis*-infected macaques (*Macaca mulatta*)

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Camila Souza Lemos

In order to unravel the physiopathology of leishmaniasis in humans, it is necessary to better understand how *Leishmania* are able to survive for years within immunologically active granulomas. In the present study, we used a *Leishmania braziliensis*-macaque (*Macaca mulatta*) infection model of cutaneous leishmaniasis (CL) as a means of assessing the usefulness of this primate system to study the host inflammatory granulomatous response involved in both healing and non-healing forms of the disease. Our findings reinforce the notion that an interplay exists between the host immune system and the pathogenic capability of the parasite in the clinical outcome of leishmanial infection. Consistent with documented cases of human *L. braziliensis* CL, experimental infections induced a T-helper cell type 1 (Th1)-mediated inflammation leading to the formation of well organized granulomas, consisting of all the specific cell types found within human granulomas. We provide evidence that polymorphonuclear neutrophil leukocytes are decisive for parasite containment by early inflammatory events *in vivo*. Furthermore, scavenger mononuclear phagocytes engulfing most of the parasite-laden apoptotic granulocytes are likely to be key players in establishing the infection in macaques. We show that granuloma formation in macaques is orchestrated by diverse inflammatory mediators that are important for Th1-cell development and macrophage effector functions. A kinetic analysis of the inflammatory response revealed marked variation in the number of positive cells for CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, Foxp3, and HLA-DR phenotypes. Of note, CD20⁺ dense B-cell aggregates were found in chronic lesions, which might serve as a morphological substrate for the orchestration of the enduring host response to persistent infection. Our findings indicate that both Foxp3⁺ and Foxp3⁻ CD4⁺ regulatory T-cell (Treg) subsets expressing interleukin-10 might prevent clearance of *L. braziliensis* from the inflamed skin, thereby eventually suppressing the healing response in macaques with long-standing CL. These results point to the feasibility of using this model to fully elucidate the molecular mechanisms of Treg-mediated suppression leading to the uncontrolled growth of granulomas occurring in leishmaniasis, which will need to be considered in any strategy designed for therapeutic control of this important inflammatory disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs - Células apresentadoras de antígenos
BLC – Quimiocina ativadora de linfócitos B
CLA – Antígeno Linfocitário Humano
CTLs - Linfócitos T citolítico
DCs - Células dendríticas
DTH – Hipersensibilidade do tipo retardada
ELC – Ligante de quimiocina induzido pelo *Epsten barr* vírus
GPI - Glicofosfatidilinositol
HIV – Virus da Imunodeficiência Adquirida
ICAM-1 - Moléculas de adesão intercelular 1
IFN- γ - Interferon gama
IL – Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase indutível
LCD - Leishmaniose cutânea difusa
LCF - Fator quimiotático de *Leishmania*
LFA-1 – Antígeno 1 associado a função leucocitária
LPG - Lipofosfoglicanas
LTA - Leishmaniose tegumentar Americana
Mac-1 – Antígeno macrófago 1
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1 α - Fator de inibição da migração
NK - células “natural killer”
NO - Oxido nítrico
PAF - Fator ativador de plaquetas
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões
PS – fosfatidil-serina
ROIs - Intermediários reativos do oxigênio
SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear
SLC – Quimiocina secundária do tecido linfóide
TGF- β - Fator transformador de crescimento
TLRs - Receptores Toll-like

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1- Moléculas vascular de adesão celular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As leishmanioses	1
1.2. Bases celulares da infecção por <i>Leishmania</i> spp.	3
1.3. Regulação da imunidade nos sítios da infecção.....	7
1.3.1 Resposta imune inata.....	7
1.3.2 Resposta imune adaptativa.....	13
1.3.3 Recrutamento e retenção de células T nos sítios inflamatórios..	17
1.3.4 Formação e manutenção dos granulomas nas lesões.....	19
1.4. Leishmaniose experimental em símios	21
2. OBJETIVOS	24
3. ARTIGOS	25
3.1. Dynamics of immune granuloma formation in <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> -induced self-limiting cutaneous infection in the primate <i>Macaca</i> <i>mulatta</i> (<i>Journal of Pathology</i> 2008, 216 :375-386; <i>FI</i> = 5.697)	25
3.2. Systemic and compartmentalised immune responses in a <i>Leishmania</i> <i>braziliensis</i> -macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis (Submitted to <i>the Veterinary Immunology and Immunopathology</i> ; <i>FI</i> =1.907)	38
3.3. <i>In situ</i> characterization of the granulomatous immune response with time in non-healing lesional skin of <i>Leishmania braziliensis</i> -infected macaques, <i>Macaca</i> <i>mulatta</i> (Submitted to the <i>American Journal of Pathology</i> ; <i>FI</i> = 5.917)	56
4. DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÕES	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leishmania* e as leishmanioses

Os parasitas do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) são protozoários flagelados, digenéticos (heteroxênicos), apresentando dois estágios evolutivos distintos em hospedeiros invertebrado e vertebrado: (1) a forma promastigota (com flagelo livre), que se desenvolve no tubo digestivo do inseto vetor e (2) a forma amastigota (com flagelo rudimentar intracelular), parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, multiplicando-se em endossomos de macrófagos (Lainson & Shaw 1987). O desenvolvimento biológico das *Leishmania* em flebotomíneos está bem caracterizado (Walters *et al.* 1989). O vetor ingere macrófagos parasitados durante o repasto sanguíneo no animal infectado; com a rotura celular, as amastigotas são liberadas no tubo digestivo do inseto, onde se transformam em distintos estágios morfológicos evolutivos até atingir a forma infectante (promastigota metacíclica). A *Leishmania* multiplica-se por divisão binária e a diversidade genética determinada nos microrganismos deste gênero decorre de mutações e/ou trocas genéticas (Cupolillo *et al.* 1997).

As leishmanioses constituem infecções crônicas causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, classificados nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* de acordo com suas propriedades biológicas (Lainson & Shaw 1987). A morbidade da infecção é muito variável, ocorrendo desde úlceras cutâneas localizadas até manifestações clínicas mais graves, como a doença cutânea difusa (com resposta imune anérgica) ou disseminada, assim como a forma mucosa (com resposta imune hiperérgica, do tipo retardado) e visceral ou calazar. A leishmaniose está entre as 10 doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO) ocupando a categoria de doenças emergentes e sem controle (Lindoso & Lindoso 2009). A importância desta patologia cresce também em decorrência dos índices elevados de mortalidade resultante de epidemias urbanas e co-infecção com HIV (vírus da imunodeficiência humana) onde formas clínicas severas ocorrem (Lloyd-Smith *et al.* 2008), assim como a resistência dos parasitas ao tratamento específico (Davies *et al.* 2003)

As estimativas indicam que as leishmanioses afetam 12 milhões de pessoas no mundo, com incidência anual de 2 milhões de novos casos, sendo 1,5 milhões destes com lesões dérmicas. Estes valores são subestimados, considerando que em apenas 33 desses países há registro compulsório da doença (Desjeux 2004). Nas Américas, a patologia incide em pelo menos 24 países, constituindo muitas vezes um problema de saúde pública nacional (Grimaldi *et al.* 1989). No Brasil entre 2001 a 2007 foram registrados 185.037 casos de LTA distribuídos em todas as Unidades Federadas e, atualmente, a região Norte representa 40% dos casos, seguida pelas regiões Nordeste (31%), Centro-Oeste (16%), Sudeste (10%) e Sul (3%). Sua incidência é mais freqüente no sexo masculino (72%) e em maiores de 10 anos (91,5%). A LTA representa 92% dos casos tendo a incidência em 2008 sido estimada em 19.746 casos (Brasil Ministério da Saúde -Vigilância em Saúde. 2009).

As leishmanioses no Novo Mundo são em grande parte zoonoses, tendo como reservatórios primários de *Leishmania* diversas ordens de mamíferos silvestres (como roedores, marsupiais, edentados, carnívoros e primatas), sendo a infecção transmitida por insetos vetores (Díptera, Psychodidae: Phlebotominae) do gênero *Lutzomyia* (Lainson & Shaw 1987). Desse modo, a LTA acomete comumente indivíduos que exploram florestas ou habitam em zonas rurais, embora a transmissão humana seja freqüente em áreas urbanas (Grimaldi *et al.* 1989). A estreita associação entre humanos e cães domésticos (reservatório secundário do parasita), assim como a ampla distribuição dos vetores em habitats domiciliares, constituem condições propícias para a expansão da doença em áreas metropolitanas (Grimaldi & Tesh 1993). As medidas convencionais (i.e., aplicação de inseticidas nas residências e eliminação de cães contaminados) usadas no controle da transmissão humana têm sido pouco eficazes, devido a vários fatores limitantes (Courtenay *et al.* 2002). A transmissão poderia ser controlada pela imunização com vacinas profiláticas, embora não ainda comprovada a eficácia dos imunógenos recombinantes candidatos (Coler & Reed 2005) na proteção contra a doença humana ou canina (Davies *et al.* 2003).

Os agentes etiológicos mais freqüentes de LTA são parasitas do subgênero *Viannia*, em particular a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, que ocorre em pelo menos 15 países (Grimaldi *et al.* 1989). Análises moleculares indicam polimorfismo genético em populações de *L. (V.) braziliensis*, sendo vários genótipos específicos agrupados de acordo com as regiões geográficas estudadas (Cupolillo *et al.* 2003). Esse polimorfismo genético em uma população natural de *Leishmania* pode ser

afetado pela complexidade dos ciclos de transmissão e pela co-existência de duas ou mais espécies em uma mesma área (Brito *et al.* 2009)

Certas infecções dérmicas por *Leishmania* são auto-resolutivas, enquanto outras persistem, podendo reincidir com lesões secundárias metastáticas; cerca de 5% dos casos de LTA causada por *L. (V.) braziliensis* desenvolvem a doença mucosa, durante ou após (meses ou anos) a cura da lesão cutânea primária (Grimaldi & Tesh 1993). O espectro de formas clínicas da doença reflete a virulência dos parasitas, no caso relacionada com genes que expressam determinantes patogênicos (Chang *et al.* 1999). Não se sabe ainda os mecanismos moleculares envolvidos no tropismo tissular diverso do patógeno, porém múltiplos fatores relacionados com o parasita (determinantes invasivo, evasivo e patogênico) e o hospedeiro infectado (determinantes imunes) devem estar implicados na expressão clínica diferenciada da doença. No caso da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* em humanos, a patologia distingue-se daquela associada com outros agentes etiológicos pelo pleomorfismo clínico e caráter evolutivo crônico da infecção (ativa ou latente), com tendência para desenvolver lesões secundárias na pele e/ou mucosa (Grimaldi & Tesh 1993). A persistência do patógeno no hospedeiro imunizado reflete sua capacidade de evasão dos mecanismos microbicidas de macrófagos ativado. Vários mecanismos imunológicos têm sido propostos como estratégias de sobrevivência parasitária, incluindo (i) modulação das atividades microbicidas dos macrófagos parasitados (Bogdan & Rollinghof 1999); (ii) síntese de citocinas inibitórias da ativação de células T_H1 efectoras (Belkaid *et al.* 2002, Coller & Reed 2005); e (iii) albergue do patógeno em fagócitos não-profissionais (como fibroblastos), deixando de induzir assim imunidade específica (Bogdan *et al.* 2000).

1.2. Bases celulares da infecção por *Leishmania spp*

A transmissão da leishmaniose é feita através da picada do flebotomíneo infectado (fêmea adulta, hematófaga) que inocula em média 1000 parasitas no hospedeiro (Rogers *et al.* 2004). Vários componentes moleculares da saliva do inseto vetor (incluindo vasodilatadores, anticoagulantes e imunossupressores) facilitam o repasto sanguíneo, inclusive impedindo que o hospedeiro se torne sensível à sua picada (De Almeida *et al.* 2003; Morris *et al.* 2001). Alguns desses componentes salivares modulam a resposta inflamatória local, facilitando o estabelecimento da

infecção primária e a evolução diferenciada da lesão dérmica (Titus & Ribeiro 1988). Entre os componentes salivares com efeitos relevantes no hospedeiro vertebrado, destacam-se (1) o fator ativador de plaquetas (PAF), pela sua ação dupla vasodilatadora e imunossupressora (Lonardoni *et al.* 2000) e (2) a proteína maxadilán, extraída da *Lutzomyia*, que é potente vasodilatador (Lerner *et al.* 1991; Morris *et al.* 2001).

Quando o vetor inocula os promastigotas metacíclicas de *Leishmania* na pele do mamífero, estas formas infectam, entre outras células hospedeiras, os fagócitos mononucleares, onde se transformam em amastigotas, replicando-se como tal nos endossomos (Chang *et al.* 1990). O excesso de multiplicação parasitária rompe a célula hospedeira e os amastigotas liberados infectam outros fagócitos recrutados para o sítio da inflamação (Alexander *et al.* 1999). Embora a infecção seja confinada aos “fagócitos profissionais” (macrófagos e neutrófilos), os parasitas podem ser ocasionalmente vistos em fibroblastos (Rittig & Bogdan 2000) e células dendríticas (DCs), inclusive nas células de Langerhans residentes na epiderme (Alexander *et al.* 1999).

O estabelecimento da infecção inicial, o qual é considerado um estágio “silencioso” (Belkaid *et al.* 2000), está associado com a interação de grupos distintos de moléculas do parasita, com receptores do hospedeiro sem ativar os mecanismos efetores da resposta imunológica (Chang & McGwire 2002; Chang *et al.* 2003). A apoptose (morte celular programada) embora participe da resolução das inflamações agudas é um desses mecanismos através do qual as células são fagocitadas sem elicitar uma resposta inflamatória (Savill *et al.* 1997). Pode ser assim, um dos mecanismos utilizados pela *Leishmania* para se expandir silenciosamente por ser o meio ambiente ideal para sua transformação na forma amastigota (Getti *et al.* 2008). A infecção da célula pelo parasita induz: permeabilização da mitocôndria, externalização da fosfatidil-serina (PS) e ativação de caspase (Getti *et al.* 2008). A exposição da PS é um sinal indutor da fagocitose (Grimsley & Ravichandran 2003) onde as células não infectadas reconhecem esse sinal e vão fagocitar células infectadas e, conseqüentemente, os parasitas. Amastigotas podem deixar a célula apoptótica encapsuladas nos corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas que são capazes de reconhecer a PS na superfície da membrana sem indução de inflamação (Getti *et al.* 2008). O processo de apoptose além de induzir a fagocitose dessas células sem resultar na ativação do macrófago

(Cocco & Ucker 2001), recruta novos macrófagos para o sítio da infecção (Lauber et al. 2003) representando o mecanismo pelo qual a *Leishmania* utiliza essas células para se replicar. A ligação entre apoptose e disseminação da infecção foi confirmada a partir do momento que se verificou que a indução de apoptose após a infecção aumentou o número de macrófagos parasitados (Getti et al. 2008)

A presença de promastigotas apoptóticas facilita a entrada silenciosa da *Leishmania* nos neutrófilos uma vez que a sobrevivência e infectividade das não apoptóticas ocorrem quando esta é ingerida junto com os parasitas apoptóticos (Laskay et al. 2008), outros achados *in vivo* e *in vitro* indicam que a população apoptótica facilita a sobrevivência dos parasitas não-apoptóticos que são prontamente eliminados pelos neutrófilos se forem fagocitados na ausência de promastigotas apoptóticas (van Zandbergen et al. 2006). Esse mecanismo de sobrevivência parece estar relacionado ao fato de que a ingestão de parasitas apoptóticos diminui a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-12 pelos macrófagos (Henson 2004; Voll et al. 1997). As funções fagocíticas são suprimidas através do reconhecimento da PS na membrana das células apoptóticas. Essa fase é caracterizada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 e diminuição da produção de TNF. Conseqüentemente o reconhecimento da PS previne reações inflamatórias e respostas imunes contra abundantes proteínas internalizadas e processadas de células apoptóticas (Fadok et al. 2001; Henson et al. 2001)

As leishmânias podem ser reconhecidas pelos neutrófilos e macrófagos por meio de vários receptores expressos na superfície desses fagócitos (Masser & Rosenthal 1993). Alguns dos receptores dos leucócitos se ligam diretamente aos ligantes específicos expostos na membrana externa do parasita, enquanto outros interagem com microrganismos revestidos por opsoninas reacionais à infecção, incluindo (1) o fragmento Fc de imunoglobulina G (IgG) e (2) os fragmentos C3b e C3bi do sistema complemento, tendo então como receptores correspondentes o Fc γ R, o qual reconhece o fragmento Fc de IgG e os CR1 e CR3, que reconhecem os fragmentos C3b e C3bi, respectivamente (Cunningham 2002). O fragmento C3 pode ser ativado, seja pela via clássica (dependente de anticorpos) ou pela via alternativa inclusive pela ação de enzimas proteolíticas presentes no exsudato inflamatório (Abbas & Lichtman 2003). Adicionalmente, os receptores CR1 e CR3 interagem com outros ligantes expressos em leishmânias, como a metaloprotease gp63 (Soteriadou et al. 1992),

lipofosfoglicanas (LPG) (Descoteaux & Turco 2002) e proteofosfoglicanas (PPG) (Ilg 2000).

Os promastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* utilizam como opsoninas anticorpos IgG específicos para penetrar em fagócitos via o FcγR; os amastigotas recorrem do mesmo mecanismo para infectar macrófagos (Alexander *et al.* 1999). No caso de *L. (L.) amazonensis*, os promastigotas utilizam adicionalmente o receptor de fibronectina, que reconhece a gp63 expressa na superfície do parasita (Vannier-Santos *et al.* 1992). Além de reconhecer o ligante, a sinalização intracelular transmitida pelos FcγRs ativam os fagócitos, induzindo o aumento na degradação do material ingerido, além de liberar para o interstício proteases produzidas por essas células infectadas (Nathan 1997). Em contraste, no caso da opsonização pelos fragmentos C3b e C3bi, esta via de ingestão dos parasitas ativa menos o metabolismo oxidativo do fagócito infectado (Alexander *et al.* 1999).

Desde a descoberta dos TLRs no sistema imune o entendimento da interligação entre patógeno, células da imunidade inata e adaptativa cresceu enormemente (Janeway *et al.* 2002). Existem 10 de TLRs nos humanos e 12 nos camundongos (Ishii *et al.* 2008) Vários receptores que reconhecem microrganismos (incluindo os TLRs, Fc e C3) e citocinas (principalmente IFN-γ) atuam cooperativamente para ativar os fagócitos a destruírem os parasitas ingeridos. Quando os TLRs de macrófagos reconhecem âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI) na superfície da *Leishmania*, dois sinais são ativados, um estimulando a produção de TNF-α e de IL-12, enquanto outro induzindo a síntese de óxido nítrico (Sttaford *et al.* 2002), tendo efeitos pró-inflamatórios, como vasodilatação, regulação do influxo leucocitário, além de causar injúria tecidual no sítio da infecção (Ward *et al.* 1988).

Fagócitos profissionais como neutrófilos e macrófagos atuam como a primeira linha de defesa do organismo apresentando mecanismos efetores para eliminação do microrganismo no primeiro contato (Van Zandbergen *et al.* 2007). Neutrófilos e macrófagos ativados destroem as leishmânias intracelulares mediante a produção de moléculas microbidas nos endossomos. A fusão dos fagossomos com os lisossomos resulta na formação dos fagolisossomos, onde os parasitas são mortos pelas substâncias microbidas concentradas nesta organela. Dentro de fagolisossomos, NO (gerado pela ação enzimática da iNOS, expressa em macrófagos ativados) combina-se com ROIs, produzindo radicais peroxinitrito, altamente reativos, capazes de eliminar os parasitas (Remick & Villarete 1996;

Stenger & Rollinghoff 2001). Além disso, células NK ativadas por IL-12 derivada de DCs passam a produzir IFN- γ , que estimula ainda mais os macrófagos (Pashin *et al.* 2005).

As leishmânias evoluíram, contudo, de modo a sobreviver em macrófagos ativados (Zambrano-Villa *et al.* 2002), através de vários mecanismos moleculares, como: (i) impedindo a formação de fagolisossomos, através da ação de LPG que inibe a fusão das membranas limitantes (Chanon & Kasper 1995); (ii) pela ação da gp63, capaz de degradar enzimas lisossomais (Cunningham 2002); (iii) inibição de diversas cascatas de sinalização intracelular, incluindo vias dependentes de cálcio e inositol fosfatos (Olivier *et al.* 1992); (iv) inibição da produção de agentes microbicidas, tais como ROIs (Descoteaux *et al.* 1992) e NO (Proudfoot *et al.* 1995); (v) modulação da produção de prostaglandinas e leucotrienos (Matte *et al.* 2001), assim como da resposta celular a citocinas (McDowell & Sachs 1999; Ray *et al.* 2000); e (vi) degradação de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e redução da expressão de moléculas co-estimulatórias (como B7-1) em macrófagos (Buates & Matlashewsky 2001). Adicionalmente, LPG e gp63 funcionam como envoltório dos parasitas, protegendo-os contra o complexo de ataque membranar (MAC) gerado pelo complemento ativado (Descoteaux & Turco 1999). Quando o fragmento C3bi atua como opsonina, a fagocitose favorece o parasita (Alexander *et al.* 1999), pois a interação via CR3 inibe a expressão de IL-12 na célula infectada (Cunningham 2002). As leishmânias ingeridas por células de Langerhans (Alexander *et al.* 1999) ou fibroblastos (Rittig & Bogdan 2000) são mais protegidas, pois essas células hospedeiras não produzem iNOS (Alexander *et al.* 1999).

1.3. Regulação da imunidade nos sítios da infecção

1.3.1. Resposta imune inata

A evolução clínico-patológica da leishmaniose reflete, em última análise, as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro, que modulam a resposta inflamatória nos sítios da infecção. O sistema imune inato constitui a linha inicial de defesa do hospedeiro frente às infecções, enquanto que a imunidade adaptativa específica atua em seguida, decorrente da seleção e expansão clonal de células imunocompetentes (linfócitos B e T), através de rearranjos somáticos de genes

codificando receptores que (reconhecendo antígenos específicos dos patógenos) promovem respostas imunológicas de memória de longa duração (Gourley *et al.* 2004). Para combater a multiplicação e a disseminação de microrganismos o sistema imune inato utiliza duas estratégias principais: (i) produção de moléculas com atividades anti-microbianas (defensinas e IFN) e (ii) mobilização e ativação de leucócitos do sistema imune inato (macrófagos e neutrófilos) (Rasmussen *et al.* 2009)

Na imunidade inata, citocinas produzidas por macrófagos (IL-12, IL-1, TNF, quimiocinas) e células NK (IFN- γ) medeiam às reações inflamatórias iniciais a microrganismos (Gazzinelli *et al.* 1993), disparando desse modo vários mecanismos efetores que são capazes de eliminar patógenos intracelulares (MacMicking *et al.* 1997). As respostas imunes inatas também ativam APCs tais como macrófagos e DCs, aumentando a capacidade co-estimulatória e regulação positiva na expressão de moléculas do sistema MHC (Pashine *et al.* 2005). Esses segundos sinais desencadeados pelas moléculas co-estimulatórias modulam então a magnitude e natureza da imunidade adaptativa específica, em que outras citocinas (L-2, IL-4, IL-5, IFN- γ) induzem a proliferação e a diferenciação de linfócitos estimulados por antígenos e ativam células efectoras especializadas, tais como macrófagos (Kupper & Fuhlbrigge 2004).

Células do sistema imune inato (neutrófilos, macrófagos, DCs, células NK) e outros tipos celulares (endoteliais e epiteliais) expressam de maneira diferenciada PRRs podendo assim ligar-se aos diversos PAMPs (Barton & Medzhitov 2002). Os PAMPs são estruturas moleculares conservadas de patógenos, porém apresentando diferenças entre diferentes espécies de microrganismos (Poltorak *et al.* 1998; Mogensen 2009). Entre os PRRs os TLRs são os mais estudados. Os PRRs consistem de receptores não-fagocíticos, tais como os TLRs e as proteínas NOD1 e NOD2, assim como de receptores que induzem fagocitose (tais como, scavenger, de manose e de β -glucan) pelos macrófagos (Gordon 2002). As APCs (como DCs e macrófagos) são os tipos celulares que apresentam expressão mais intensa de PRRs (Iwasaki *et al.* 2004). Após a interação com PAMPs, PRRs iniciam uma cascata de sinalização que gera a ativação de fatores de transcrição (tais como, NF- κ B e IRF3), resultando então a expressão de citocinas e outros eventos de ativação celular (Rutz *et al.* 2004). A ligação de diferentes TLRs induz distintos perfis de expressão gênica (Dillon *et al.* 2004). Atualmente existem 10 (TLRs 1-10) e 12 (TLRs 1-9 e 11-13)

membros da família TLR nos humanos e camundongos respectivamente (Ishii *et al.* 2008).

Receptores não-fagocíticos que reconhecem PAMPs expostos extracelularmente (como certos TLRs) ou intracelularmente (as proteínas NOD1 e NOD2), quando associados com seus ligantes específicos, ativam NF- κ B, resultando na expressão de vários mediadores químicos pró-inflamatórios (Girardin *et al.* 2003). Em humanos, entre os genes regulados pela via do NF- κ B incluem-se os de moléculas de adesão endotelial (E-selectina e P-selectina), ICAM-1, VCAM-1, assim como os de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF α (Kupper & Fuhlbrigge 2004). A ativação de IRF3 aumenta a produção de IFN- γ (Pashine *et al.* 2005). Estas moléculas são necessárias para recrutar os leucócitos circulantes (incluindo a migração e retenção seletiva de linfócitos) no sítio inflamatório. Dentre esses leucócitos, há componentes não antígenos-específicos (como neutrófilos e células NK) e células antígeno-específicas (como linfócitos B e T efetores) que respondem aos antígenos do patógeno (Kupper & Fuhlbrigge 2004).

Enquanto os TLRs se ligam diretamente ao parasita, os receptores do sistema complemento são diretamente voltados contra os mediadores gerados pelo hospedeiro logo após o contato com o parasita (Liszewski *et al.* 1996). O papel desses mediadores vem a ser o aumento da reação inflamatória mediada por anticorpo além da geração do complexo de ataque a membrana via sistema complemento (C5b-C9) levando a lise das células indesejadas (Maurer *et al.* 2009). Na infecção por *Leishmania*, após a transmissão de promastigostas metacíclicas na derme do hospedeiro, o parasita interage com o soro e ativa o sistema complemento tanto pela via clássica quanto na alternativa (Dominguez *et al.* 2003). A opsonização de promastigotas de *Leishmania* com moléculas do sistema complemento é rápida e, interessantemente, o processo de lise via formação complexo de ataque a membrana (C5b-C9) se inicia sessenta segundos após o contato com o soro (Dominguez *et al.* 2003). Tal processo resulta numa eliminação eficiente de aproximadamente 90% de todos os parasitas inoculados em poucos minutos. Amastigotas intracelulares são menos sensíveis ao processo de lise uma vez que apresentam uma alteração de membrana durante seu desenvolvimento que impede a inserção do complexo de ataque a membrana (Sacks & Noben-Trauth 2002; Dominguez *et al.* 2003). As leishmânias também apresentam mecanismos de escape frente ao sistema complemento já que são capazes de expressar proteínas-cinases que fosforilam C3,

C5 e C9 o que leva a inibição do complemento, além apresentarem moléculas de superfície (LPS, Gp63) que medeiam a ligação ao C3bi na superfície do parasita com forma alongada, contribuindo assim para a resistência ao processo de lise pelo complemento (Maurer *et al.* 2009).

O tecido epitelial atua na proteção contra infecção por parasitas patógenos por meio de duas importantes estratégias complexas e complementares prevenindo não só a invasão parasitária (função de barreira), mas também sensibilizando a resposta imune do hospedeiro contra a infecção (função imunológica) (Maurer *et al.* 2009). A resposta inflamatória contra leishmânias na pele ocorre no tecido conectivo vascularizado, com a participação de plasma, células circulantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos), vasos sanguíneos, assim como constituintes celulares (mastócitos, macrófagos residentes ou histiócitos, fibroblastos, linfócitos T e extra-celulares (colágeno, elastina, fibronectina, laminina) da derme reticular (Spellberg 2000). A principal função do sistema imune inato da pele é a detecção de parasitas invasores, recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção e facilidade e promoção da indução da imunidade adaptativa (Maurer *et al.* 2009). Os mastócitos atuam regulando o tônus vascular; os fibroblastos secretam fatores de crescimento celular (como de leucócitos e queratinócitos), além de sintetizarem proteínas estruturais (como colágeno e elastina) úteis no reparo tecidual. Os histiócitos atuam na fagocitose inicial e como APCs, além de produzirem uma série de mediadores locais. As DCs expressam moléculas de MHC classe II e CD1, funcionando como importantes APCs (Spellberg 2000; Kupper & Fuhlbrigge 2004). Cerca de 98% dos linfócitos T da pele normal ocorrem na derme reticular, sendo a maioria linfócitos T de memória, acumulando-se nos espaços perivasculares. Na derme, as freqüências de células T CD4⁺ e CD8⁺ são equivalentes. Contudo, a pele normal não contém linfócitos B (Spellberg 2000).

Outros constituintes celulares da epiderme [queratinócitos (90%), células de Langerhans (5%) e linfócitos T CD8⁺ de memória (1%)] têm papel igualmente relevante na imunidade do hospedeiro (Kupper & Fuhlbrigge 2004). Os queratinócitos produzem grandes quantidades de IL-1 α e TNF- α , assim como peptídeos antimicrobianos (β -defensinas), em resposta a diversos agressores (Kupper *et al.* 1995) além de expressarem TLR1 e TLR4 (Song *et al.* 2002). IL-1 α e IL-1 β sintetizadas pelas células de Langerhans estimulam ainda mais os eventos celulares (extravasamento de leucócitos circulantes e fagocitose de microrganismos) no local

da inflamação aguda (Steinhoff *et al.* 2001). IFN- γ secretado por linfócitos T, células NK (Boehm *et al.* 1997), macrófagos e DCs (Frucht *et al.* 2001) induz a síntese de TNF- α pelo macrófago ativado, estimulando assim a produção de IL-1 (Abbas & Lichtman 2003). IL-1 β e TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1) nas células endoteliais, que passam então a interagir com receptores específicos (LFA-1, Mac-1, LPAM-1) de leucócitos, com funções importantes na adesão e transmigração de neutrófilos e monócitos para os locais da inflamação. Além disso, o IFN- γ aumenta a expressão de IL-12 por macrófagos e monócitos (Trinchieri 1995), tendo papel importante na ativação de células NK e macrófagos (Boehm *et al.* 1997).

Os neutrófilos contribuem para a primeira linha de defesa do organismo contra agentes ou substâncias estranhas que penetram as barreiras físicas do corpo (Nathan 2006). São as primeiras células recrutadas para o sítio da infecção por *Leishmania major* (Belkaid *et al.* 2000). A medula óssea de um indivíduo sadio produz cerca de 10^{11} neutrófilos por dia e aumenta sua produção para 10^{12} durante uma inflamação aguda. Após a produção e liberação da medula, eles entram na circulação e representam mais de 50% dos leucócitos circulantes (Laskay *et al.* 2008). São as células efetoras primárias que atuam na destruição do patógeno invasor. O modo inicial de ataque é a fagocitose do patógeno podendo ser por mecanismos dependentes ou não de opsonização do patógeno (Ofek *et al.* 1995; Uthaisangsook *et al.* 2002) As opsoninas (imunoglobulinas, C3bi, lectina ligante de manose) são componentes do soro que agem ligando a superfície do microrganismo a um receptor na superfície do fagócito. Fagocitose do microrganismo pode ser mediada pelo reconhecimento direto do patógeno associado à PAMP via PRR em um processo então independente de opsonização (Ofek *et al.* 1995). A maioria dos microrganismos ingeridos são mortos rapidamente pelos neutrófilos (Nathan 2006). No entanto, alguns patógenos sobrevivem no meio ambiente hostil da célula hospedeira. Essa sobrevivência pode ser explicada por três distintos mecanismos: (i) escape do fagossoma dentro do citoplasma da célula; (ii) boqueio da fusão fagossoma-endossoma; (iii) Inibição da indução do processo oxidativo (Laskay *et al.* 2008).

As células NK são uma sub-população de linfócitos efetores (constituem 10% dos leucócitos mononucleares circulantes) que destroem células do hospedeiro infectadas, através de mecanismos imunológicos diversos (Becker *et al.* 2003). As células NK são recrutadas logo nos momentos iniciais da infecção, fazendo parte da

primeira linha de defesa contra o agente invasor. Uma vez no tecido, secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e MIP-1 α (Korbel *et al.* 2004). A expansão e as atividades das células NK são estimuladas por diversas citocinas (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α e IFN- γ), em particular IL-15 (fator de crescimento para células NK) e IL-12 (indutor potente da produção de IFN- γ e atividade citolítica pelas células NK) derivadas de macrófagos (Scharton-Kersten *et al.* 1995). A célula NK ativada passa a produzir mais IFN- γ , aumentando também sua atividade citotóxica (Nylen *et al.* 2003), além de ativar mais macrófagos infectados (Scott & Trinchieri 1995; Maasho *et al.* 1998). Outras citocinas [IL-4, IL-10 e TGF- β] suprimem, contudo suas funções biológicas (Colucci 2003). As células NK têm papel relevante na resistência precoce contra *L. major*, pois o decurso da infecção experimental é mais severo em camundongos depletados dessas células (Laskay 1993). Há evidência indicando que as células NK interagem com promastigotas, através do TLR-2 que reconhece âncoras de GPI em protozoários (Campos *et al.* 2001). As células NK sofrem inibição da sua proliferação via gp63 da superfície de *Leishmania* (Lieke *et al.* 2008)

Células dendríticas agem como sentinelas à intrusão de microrganismos. Na epiderme, DCs (chamadas de células de Langerhans) são sésseis e tem por função a vigilância do microambiente local através de movimentos ocasionais de seus dendritos (Lai Guan *et al.* 2008). As DCs imaturas residentes na pele (incluindo as células de Langerhans da epiderme) expressam receptores de quimiocinas (CCR1, CCR5 e CCR6), os quais mantêm essas células na pele. As DCs ativadas expressam menos esses receptores, deixando de reagir assim com os ligantes MIP-1 α , MIP-1 β e MIP-3 α , respectivamente. Essas DCs imaturas expressam *in vitro* altos níveis de CCR2 e CCR5 na sua superfície estando potencialmente capaz de migrar em resposta as quimiocinas CCL2/MCP-1 ou CCL3/MIP-1 α respectivamente (Ritter & Korner 2002). As células de Langerhans expressam CCR7, que interage com as quimiocinas SLC e ELC, induzindo assim o tráfego de linfócitos T e DCs para a zona de células T em linfonodos (Sozzani *et al.* 1998). Esta migração celular direcionada é fundamental na resposta imune adaptativa (Luster 2002). DCs recém-chegadas no linfonodo de drenagem expressam a quimiocina DC-CK1 e recrutam linfócitos T *naive* (Luther *et al.* 2000; Adema *et al.* 1997). Alguns linfócitos T ativados no local (no caso, pelo reconhecimento antigênico via MHC) expressam CXCR3, sendo assim recrutados para o sítio inflamatório. Certas células T diminuem a expressão de CCR7,

mas aumentam a de CXCR5, migrando então para centros germinativos de linfonodos, onde ativam linfócitos B. A quimiocina BLC direciona igualmente o fluxo de células T auxiliares que expressam CXCR5 para os centros germinativos (Luster 2002).

As células de Langerhans têm papel importante na imunidade contra leishmânias (Zuluaga & Robledo 2004), pois capturam e processam os antígenos do parasita (Baldwin *et al.* 2004). Essas DCs quando ativadas migram para as áreas T dos linfonodos (Moll *et al.* 1995), onde apresentam antígenos para as células T *naive* (Reis & Sousa 2004). As células T primadas que expressam o antígeno linfocitário humano (CLA) migram então para a pele infectada (Spellberg 2000). DCs ativadas diminuem a fagocitose, enquanto expressam mais moléculas MHC, co-estimulatórias e de adesão, além de secretar citocinas e quimiocinas, atuando assim na sinalização intercelular e no recrutamento inicial dos leucócitos (Udey *et al.* 2001; Brandonisio *et al.* 2004), assim como na manutenção prolongada da imunidade contra re-infecções, mediada por células T de memória (Moll *et al.* 1995).

A grande meta da resposta imune inata é montar a primeira linha de defesa do organismo sem ocasionar dano tecidual excessivo e ao mesmo tempo facilitar e estimular o desenvolvimento de uma resposta imune específica e duradoura (Medzhitov 2008).

1.3.2. Resposta imune adaptativa

A ativação e a fase efetora da resposta imune adaptativa específica são acionadas quando linfócitos T *naive* reconhecem o antígeno e são ativados nos órgãos linfóides periféricos (como os linfonodos de drenagem da infecção dérmica), resultando na expansão de linfócitos antígeno-específicos e na diferenciação dessas células em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetores e de memória. As células T *naive* necessitam das DCs para a ativação, enquanto as células T efetoras podem responder aos antígenos apresentados por uma variedade de APCs. Além dos sinais induzidos pelo antígeno, a proliferação e diferenciação das células T requerem outros sinais que as moléculas co-estimuladoras (como o CD28) enviam para as APCs ativadas (neste caso, ligando-se às proteínas B7-1 ou CD80 e B7-2 ou CD86) (Lanzavecchia & Sallusto 2000). Células T auxiliares ativadas pelo antígeno e pelas moléculas co-estimulatórias B7 expressam a molécula ligante CD40L que se liga ao

seu receptor CD40, expresso nas células B apresentando o antígeno, resultando na expansão clonal desta população que se diferencia em plasmócitos produtores de anticorpos específicos (Clark & Ledbetter 1994). Evidência experimental sugere que as células B têm um papel importante na defesa contra uma variedade de patógenos intracelulares como bactérias, fungos e parasitas. A significância das células B mediando a apresentação de antígeno varia de acordo com o antígeno e as condições imunológicas (Rodriguez-Pinto 2006) resultando em um notável impacto sobre as respostas de células T (Maglione & Chan 2009)

Mosmann & Coffman (1989) identificaram duas sub-populações de linfócitos T CD4⁺ auxiliares com funções biológicas bem distintas (pela produção diferenciada de citocinas), denominadas T_H1 (que sintetizam IFN- γ , IL-2 e TNF- α) e T_H2 (que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). A resposta T_H1 ativa a capacidade microbicida de macrófagos e auxilia a produção de anticorpos citolíticos e/ou a reação de hipersensibilidade do tipo retardada (DTH) na imunidade contra patógenos intracelulares (Trinchieri 1993). Em contraste, a resposta T_H2 estimula a produção de anticorpos e ativa assim mastócitos e eosinófilos, além de inibir várias funções dos macrófagos (Coffman *et al.* 1988; Fiorentino *et al.* 1991). O desequilíbrio regulatório eventual das respostas T_H1/T_H2 pode induzir alterações teciduais de natureza imunopatológica (Romagnani 1994).

Há outra sub-população diferenciada de linfócitos T CD4⁺ reguladores, chamada de T_H3, caracterizada por expressar também a molécula CD25 e sintetizar IL-10 (Belkaid *et al.* 2002) e/ou concentrações elevadas do TGF- β (Broide *et al.* 1989), exercendo função biológica diversa (p.ex., atividade supressora de macrófagos; inibição da expansão clonal de linfócitos B, assim como da produção de linfócitos T citotóxicos; supressão do crescimento de certos tipos celulares, como epiteliais e endoteliais; estimulação de mioblastos e fibroblastos, que produzem colágeno e fibronectina; aumento da síntese de inibidores de proteases que degradam componentes da matriz extracelular, participando assim nos processos de reparo tecidual) (Mendez *et al.* 2004). Além de expressarem CD25 as células regulatórias (Tregs) também expressam CTLA-4 e Foxp3 sendo este último considerado o melhor marcador para as células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras (Hori *et al.* 2003). As células Tregs têm importante função no controle da resposta imune durante infecções microbianas (Belkaid 2007). Apresentam mecanismos supressivos que podem ser divididos em três categorias: contato célula a célula, secreção local de citocinas

inibitórias (IL-10) e competição local por fatores de crescimento (Tang & Bluestone 2008; Askenasy *et al.* 2008). São capazes de reconhecer antígenos nas doenças infecciosas e modular negativamente tanto a resposta Th1 como a Th2 (Belkaid *et al.* 2002; Belkaid 2007). Em lesões causadas por *L.braziliensis*, *L.major* e *L.amazonensis* existem evidências que células Foxp3⁺ acumulam e suprimem a proliferação e produção de citocinas por células T efectoras (Ji *et al.* 2005; Campanelli *et al.* 2006; Peters & Sacks 2006). Outro mecanismo de ação das células Tregs vem a ser a apoptose das células T efectoras (Askenasy *et al.* 2008; Yolcu *et al.* 2008). No entanto a relação entre células Treg e diferentes apresentações clínicas da LTA não está clara.

Formas persistentes de LTA em humanos são comumente associadas com níveis elevados da citocina desativadora IL-10 (Anderson *et al.* 2007). A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, com propriedades anti-inflamatórias que incluem a supressão da função de DCs e não responsividade dos macrófagos aos sinais de ativação (Moore *et al.* 2002). Pode ser produzida por diferentes tipos celulares que incluem células B, macrófagos, DCs, células Th2 e uma população distinta de células Tregs, sendo importante lembrar que, nas formas crônicas da leishmaniose tanto em camundongos como nos humanos, as fontes produtoras de IL-10 ainda não estão bem definidas (Kane & Mosser 2001). A leishmaniose induz o recrutamento localizado com produção de IL-10 pelas células inatas, pelas Tregs naturais (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) e induzidas (CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻).

As células Tregs naturais se originam no timo e são controladas através da atividade do fator de transcrição Foxp3 (Sakaguchi 2004) sendo que células T CD4⁺ com essas atividades regulatórias também podem ser geradas de células T *naive* após o encontro desta com antígenos estranhos na periferia (Mills & McGuirk 2004; O'Garra *et al.* 2004). Células CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ conhecidas também como Tr1 e células Treg adaptativas já foram encontradas regulando processos infecciosos causados por *Helicobacter hepaticus* e suprimindo a resposta protetora Th1 em camundongos infectados com *Bordetella pertussis* (Kullberg *et al.* 2002; McGuirk *et al.* 2002). Em humanos a IL-10 produzida por células Treg induzidas pode limitar a resposta imune contra os antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* e contra aos antígenos de helmintos em pacientes com oncocercose (Boussiotis *et al.* 2000; Satoguina *et al.* 2002). A IL-10 produzida pelas células T CD25⁻ Foxp3⁻ é necessária para a evolução do fenótipo de persistência da lesão em camundongos infectados

com *L.major* enquanto que, surpreendentemente, células Treg naturais promovem a resistência do hospedeiro à infecção (Anderson *et al.* 2007). IL-10 produzida por células T CD8⁺ podem suprimir certas respostas auto-imunes representando assim outra linhagem distinta de células Tregs induzidas (Noble *et al.* 2006) embora seu papel em doenças infecciosas ainda não tenha sido demonstrado. Deste modo, múltiplas fontes de IL-10 (células T e células não T) podem potencialmente contribuir para a supressão das respostas curativas em infecções crônicas e a IL-10 produzida pelas células T CD4⁺ são heterogêneas quanto à origem, requerimentos para a ativação e mecanismos de ação (Anderson *et al.* 2007).

A diferenciação funcional dos linfócitos T CD4⁺ auxiliares nos fenótipos T_H1 e T_H2 depende do microambiente inicial de citocinas dominantes no local da inflamação (Kupper & Fuhlbrigge 2004). Quimiocinas específicas também influenciam na diferenciação de células T_H0 em T_H1 ou T_H2 (Rossi & Zlotnik 2000). As DCs constituem o tipo celular mais importante envolvido na ativação inicial de células T CD4⁺ T_H0 e na indução da diferenciação de células T CD8⁺ para CTLs (Banchereau *et al.* 2000). A IL-12 derivada de DCs ativadas influencia a diferenciação de células T CD4⁺ para o fenótipo T_H1 (Trichieri 1993), as quais produzem principalmente IFN- γ , ativando assim macrófagos para eliminar microrganismos fagocitados (e secretar mais IL-12) (Pashine *et al.* 2005; Stenger & Rollinghoff 2001). A ativação diferencial de DCs gera respostas imunes adaptativas qualitativamente distintas. No caso de DCs derivadas de linfonodos, quando ativadas, promovem resposta tipo T_H1 (pela sua maior capacidade de secretar IL-12), enquanto que DCs mielóides ativadas geram resposta tipo T_H2 (Pulendran 2004).

A expressão precoce de citocinas tipo T_H1 é relevante na imunidade contra infecções intracelulares (O'Regan *et al.* 2000). Em contraste, a resposta tipo T_H2 inibe a capacidade microbicida dos macrófagos, além de estimular a produção de anticorpos, ativando assim as funções de mastócitos e eosinófilos (Coffman *et al.* 1988; Fiorentino *et al.* 1991). Essas sub-populações auxiliam de maneira diferenciada linfócitos B na produção de anticorpos. Assim, enquanto os linfócitos T_H1 medeiam a produção de IgG2a e IgG3 em camundongos, as células T_H2 auxiliam a expressão de IgG1, IgG2b, IgA e IgE (Stevens *et al.* 1988). Merece registro o papel funcional ainda desconhecido dos anticorpos específicos na proteção contra as leishmânias. Títulos de anticorpos anti-*Leishmania* da classe IgG são detectados em pacientes com formas pleomórficas da doença (Grimaldi & Tesh 1993).

O principal mecanismo de defesa contra *Leishmania* é a imunidade mediada por linfócitos CD4⁺ T_H1 que secretam IFN- γ (ativando assim os macrófagos para eliminar os parasitas), enquanto que a suscetibilidade do hospedeiro está associada com a atividade supressora de macrófagos por citocinas derivadas de linfócitos CD4⁺ T_H2 (IL-4) efetores ou T_H3 reguladores (IL-10 e/ou TGF- β) (Belkaid *et al.* 2002; Mendez *et al.* 2004). As células T CD8⁺ específicas parecem atuar mais nas respostas de memória, associadas com a imunidade de longa duração (Coler & Reed 2005). A produção de IL-6 pelas DCs pode inibir a atividade supressora de células T_H3 reguladoras (Pasare & Medzhitov 2004).

1.3.3. Recrutamento e retenção de células T nos sítios inflamatórios

Os estudos são ainda escassos quanto à expressão diferencial de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas/receptores) em pacientes com LTA. Na fase aguda da infecção dérmica por *L. major*, os primeiros leucócitos recrutados para o local da inflamação são neutrófilos (Chen *et al.* 2005). Há um fator quimiotático de *Leishmania* (LCF), produzido pelas promastigotas metacíclicas no sítio inflamatório, que medeia o recrutamento de neutrófilos, porém não de leucócitos mononucleares (Awasthi *et al.* 2004). As quimiocinas parecem ter papel importante na contenção ou progressão da LTA em humanos (Ritter *et al.* 1996) uma vez que controlam a migração e atividade das células imunes nos tecidos inflamados e LFNs drenantes (Bromley *et al.* 2008). Assim, a expressão elevada da MCP-1 atrai monócitos e certas populações de linfócitos T, além de estimular o metabolismo oxidativo de macrófagos para reduzir a carga parasitária. Em contraste, a expressão da MIP-1 α predomina (quando comparada com a CCL2/MCP-1) em pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD). Estudos pioneiros indicaram que linfócitos T presentes em lesões de LCD expressam pouco mRNA de IFN- γ , fato este associado com a replicação parasitária descontrolada (Castes *et al.* 1988). Em contraste, na LTA com tendência auto-resolutiva, os fagócitos e linfócitos T ativados expressam regularmente IFN- γ , reduzindo assim o número de parasitas nas lesões (Castes *et al.* 1984a; Pirmez *et al.* 1990a; Pirmez *et al.* 1993). O IFN- γ também potencializa a expressão de HLA-DR (molécula MHC de classe II) em queratinócitos na LTA (Pirmez *et al.* 1990b). As lesões cutâneas auto-resolutivas apresentam uma elevada expressão de quimiocinas Th1 como CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 e pouca expressão de

CCL3/MIP-1 α . Na leishmaniose cutânea difusa (LCD) a expressão dessas quimiocinas é invertida onde a CCL3/MIP-1 α é a dominante e as quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 são expressas em baixos níveis. A quimiocina CCL2/MCP-1 induz atividade leishmanicida nos monócitos de humanos em contraste com CCL3/MIP-1 α . Esse efeito é intensificado pelo IFN- γ e revogado pela IL-4 (Ritter & Korner 2002). Tratamentos com IP-10 ou MCP-1 reduzem significativamente a carga parasitária, sendo este processo dose dependente e tem como alvo a indução da produção de óxido nítrico (Vasquez & Soong 2006). A produção desequilibrada de mediadores inflamatórios em resposta a infecção por *L.braziliensis* contribui para o recrutamento celular e severidade da doença. Enquanto a infecção por *L.braziliensis* induz a produção de CXCL10 e IL-10 em PBMCs e macrófagos de humano, o aumento da expressão de CXCL10 e do receptor do CXCR3 é detectado predominantemente em monócitos CD14 $^{+}$ (Vargas-Inchaustegui *et al.* 2009)

A fase ativa da LTA é marcada por um infiltrado inflamatório crônico rico em macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Ambroise-Thomas 2001). Vários aspectos histopatológicos foram observados em diferentes lesões ou mesmo na mesma lesão (Bittencourt & Barral 1991). A lesão dérmica pode resolver espontaneamente (quando removidos os estímulos injuriantes, há substituição fibrosa cicatricial da lesão) ou persistir (Ridley 1987; Grimaldi & McMahon-Pratt 1991), neste caso surgindo outros danos causados pela ação de macrófagos fortemente ativados pelas células T, que liberam produtos microbicidas (como ROIs e NO) no ambiente extracelular, causando assim destruição tecidual (Ward *et al.* 1988; Romagnani 1994) e tentativas de reparo induzindo angiogênese e fibrose (Murray 2001). Após a morte celular, neutrófilos e macrófagos liberam enzimas lisossomais para o interstício, causando focos de necrose tecidual (Tapper 1996).

Os dados de análises *in situ* de linfócitos T efetores/de memória presentes em LTA, causada principalmente pela *L. braziliensis* são por vezes contraditórios (Modlin *et al.* 1985; Barral *et al.* 1987; Morsy *et al.* 1989; Pirmez *et al.* 1990a; Conceição-Silva *et al.* 1990; Martinez-Arendes *et al.*1991; Esterre *et al.* 1992; Uyemura *et al.*1993; Lima *et al.*1994; Da-Cruz *et al.* 1994). Embora os linfócitos T predominem nas lesões, as proporções entre células T CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ são muito variáveis no decurso da reação inflamatória (Martinez-Arendes *et al.* 1991, Lima *et al.* 1994; Vieira *et al.* 2002; Da-Cruz *et al.* 2005; Souza-Lemos *et al.* 2008). Na LTA com tendência auto-resolutiva (Oliveira

Neto *et al.* 1997) os números de linfócitos T CD8⁺ aumentam em lesões dérmicas mais avançadas, sugerindo assim sua ação curativa (Da-Cruz *et al.* 2005; Souza-Lemos *et al.* 2008). Entretanto, ainda não está claro o papel funcional que linfócitos T CD8⁺ exercem na imunidade adaptativa contra *Leishmania*. Uma proporção de linfócitos T CD8⁺ ativados funciona como células de memória, induzindo assim imunidade de longa duração contra a re-infecção (Muller 1992). Outras atividades biológicas de linfócitos T CD8⁺ efetores (como citotoxicidade mediada pela perforina e a apoptose induzida em macrófagos parasitados) poderiam conter a infecção (Tsagozis *et al.* 2003). A ação citotóxica de linfócitos T CD8⁺ ativados poderia liberar eventualmente amastigotas residentes em fibroblastos (Sacks e Noben-Trauth 2002).

1.3.4. Formação e manutenção de granulomas nas lesões

A reação granulomatosa, descrita há mais de cem anos por Virchow é um substrato morfológico de muitas doenças infecciosas, sendo os granulomas marcas de doenças crônicas como tuberculose, brucelose, esquistossomose e hanseníase podendo também se desenvolver devido à presença de alérgenos e metais (Fuller *et al.* 2003). A lesão granulomatosa é geralmente considerada como resultado de uma estimulação antigênica crônica (Boros 1978; Mariano 1995) apresentando morfológicamente uma coleção focal de células mononucleares circundadas por tecido conectivo (fibroblastos, fibras de colágeno e vasos recém formados). Um halo de monócitos recém chegados e um pequeno número de linfócitos é observado entre células do tecido conectivo em proliferação e o foco da lesão. Muitas células mononucleares arranjadas numa formação paliçada ocupam o centro da lesão. Essas células são chamadas de células epitelióides devido sua semelhança com as células epiteliais. Entre as células epitelióides, células gigantes multinucleadas e macrófagos são observadas áreas centrais de necrose (Adams 1974; Aschoff 1950). O dano tecidual como a necrose e a fibrose durante o processo de cicatrização é uma complicação freqüente de alguns granulomas. Essa lesão inflamatória crônica foi por muito tempo considerada necessária para a contenção da infecção (Rubin 2009). Estudos recentes, no entanto, sugerem que os granulomas podem ajudar a promover a infecção em vez de simplesmente contê-la (Davis & Ramakrishnan 2009). Granulomas estão presentes em indivíduos imunologicamente competentes, mas ausentes ou mal formados em indivíduos imunologicamente comprometidos (Rubin 2009).

A reação granulomatosa ocorre quando macrófagos infectados ficam rodeados por outros macrófagos tentando assim fazer uma espécie de barreira para prevenir a disseminação do microrganismo (Fuller *et al.* 2003). Esse desenvolvimento do granuloma depende do movimento das células rumo ao sítio inflamatório através da expressão de moléculas quimiotáticas (Ferrero *et al.* 2003). O sítio inflamatório produz citocinas como IFN- γ e TNF- α que induzem a produção de quimiocinas pro-inflamatórias (Baggiolini 1998; Roach *et al.* 2002), com um papel importante no recrutamento de células para o tecido (Baggiolini 1998; Luster 1998). O TNF- α é uma citocina importante na formação e manutenção do granuloma (Bean *et al.* 1999; Dixon *et al.* 2000; Roach *et al.* 2002). IFN- γ induz a produção pelos macrófagos e DCs de ligante do CXCR3, CXCL9, CXCL10, CXCL11 que recruta células CXCR3⁺ (Sallusto *et al.* 1998). A expressão abundante de ligantes do CXCR3 e de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α sugere o recrutamento contínuo de células e um estado de inflamação crônica contribuindo assim para a formação e manutenção do granuloma (Fuller *et al.* 2003). Avaliando-se a composição celular do granuloma verifica-se uma predominância de macrófagos (CD68⁺) que se apresentam completamente distribuídos na lesão. Os linfócitos T (CD3⁺) estão dispersos nas porções celulares da lesão granulomatosa crônica enquanto que raros linfócitos B (CD20⁺) se apresentam localizados na periferia, como coleções focais (Fuller *et al.* 2003)

A lesão é mantida pelo constante recrutamento de células da circulação, principalmente monócitos, que podem se transformar em macrófagos ativados ou células epitelióides e ocasionalmente podem se fundir formando células gigantes (Mariano 1995). Estudos utilizando timidina triciada demonstraram que células do granuloma, incluindo células epitelióides e células gigantes multinucleadas são da mesma linhagem (Spector & Lykke 1966; Mariano & Spector 1974) fato este confirmado quando monócitos em cultura de tecidos se desenvolvem em células epitelióides e células gigantes (Sutton & Weiss 1966). A função das células epitelióides e células gigantes na fisiopatologia do granuloma ainda é obscura. A célula epitelióide, secreta fatores biológicos ativos sendo a principal função dessa célula (Papadimitriou & Spector 1971). A ultra-estrutura das células gigantes indica igualmente que essas células apresentam importantes funções biossintéticas e secretoras (Williams & Williams 1983)

Uma importante complicação, a longo prazo, da inflamação granulomatosa vem a ser a injúria tecidual ocasionada pelo recrutamento continuado de leucócitos. Essa injúria não específica é dependente de leucócitos, via liberação de proteases, ácido aracdônico e metabólitos de oxigênio reativos (Chensue et al.1983). A injúria também pode ser dependente de fibroblasto devido a deposição de colágeno e formação de uma estado terminal de fibrose (Kunkel et al. 1993).

No caso de lesões dérmicas pela *L. (V.) braziliensis*, a resposta patológica é a inflamação granulomatosa de longa duração, geralmente associada com proliferação de vasos sanguíneos, necrose tecidual e fibrose (Ridley 1987). Na forma persistente da doença, há formação de granulomas imunes (forma de resposta DTH crônica contra alguns microrganismos intracelulares), que consiste de uma agregação de macrófagos diferenciados, com aumento de volume do citoplasma e das organelas citoplasmáticas, se transformando então em células epitelióides, circundados por linfócitos e plasmócitos. A fusão de membranas plasmáticas de macrófagos ativados origina as células gigantes multinucleadas tipo Langhans, que apresentam com freqüência 20 ou mais núcleos arranjados perifericamente (Gutierrez *et al.* 1991; Horvath *et al.* 1993). Os granulomas imunes são mediados principalmente pela ação de IFN- γ derivado de macrófagos fortemente ativados (Lammas *et al.* 2002).

1.4. Leishmaniose experimental em símios

Vários animais de laboratório são empregados de rotina em pesquisas biomédicas. O valor do modelo experimental reflete-se, contudo na maior ou menor habilidade do sistema animal usado em reproduzir o mais próximo possível (quando infectado com o mesmo patógeno) a doença pesquisada (Kennedy *et al.* 1997). Os modelos experimentais de leishmaniose têm contribuído muito no avanço do conhecimento da doença, embora os estudos sejam feitos predominantemente em roedores (camundongos e hamsters), cuja relação geneticamente distante com a espécie humana se reflete em parte na natureza diversa das suas respostas imunológicas (Probst *et al.* 2001). Os 210 milhões de anos de divergência entre roedores e humanos limita a relevância dos modelos murinos nos ensaios de vacinas humanas (Nikolich-Zugich et al. 2007).

Devido à proximidade filogenética entre humanos e símios hominóides (chimpanzés, orangotangos e gorilas), que divergiram entre si apenas há 5 milhões

de anos, estes primatas constituem, em princípio, o melhor sistema animal capaz de reproduzir uma determinada doença humana. Problema relacionado com custo operacional e outros fatores (espécies em extinção) limitam, contudo o emprego desses primatas em pesquisa biomédica. Na escala de proximidade genética com o homem, seguem-se outros símios do Velho Mundo (rhesus, babuíno, mandril, etc.) que divergiram 25 milhões de anos atrás (Gibbs et al. 2007). Os símios neotropicais (aotus, cebus, saguís, etc.) constituem os mais distantes, tendo divergido da linha humana há mais de 30 milhões de anos (Kennedy et al. 1997a, 1997b). Ensaios pré-clínicos de vacinas candidatas seriam mais adequados em primatas do Velho Mundo (Watkins et al. 1993), considerando a expressão similar das moléculas MHC de classe I e de classe II (no caso, ligantes envolvidos nas interações específicas entre as APCs e os linfócitos T) nesses sistemas animais, quando comparado ao homem. Em contraste, o sistema MHC apresenta-se mais condensado em símios neotropicais (Kennedy et al. 1997a). Além disso, os reagentes imunológicos produzidos contra antígenos humanos (imunoglobulinas, citocinas ou antígenos CD) apresentam reatividade cruzada mais freqüentemente com os antígenos análogos expressos em primatas do Velho Mundo (Kennedy et al. 1997b) Considerando a aplicabilidade de reagentes específicos de humanos como marcadores imunológicos, macacos Rhesus e outras espécies de primatas não humanos estão sendo extensivamente usados como modelo para AIDS, terapia genética, câncer assim como desenvolvimento de vacinas (Hel et al. 2002; Pahar et al. 2006; Grimaldi 2008). Um conjunto de 57 anticorpos de humanos com reatividade cruzada contra linfócitos, monócitos e granulócitos de sangue periférico de macacos Rhesus já foram descritos (Sestak et al. 2007). Devido a homologia existente entre *Macaca mulatta* e o sistema imune humano (Kennedy et al. 1997b; Pahar et al. 2003; Giavedoni 2005) estes primatas são frequentemente utilizado para se determinar qual das vacinas candidatas é a mais passível de desenvolvimento (Jonhston 2000; Nikolich-Zugich et al. 2007).

O uso de primatas como modelo para se estudar as doenças humanas (incluindo estudos imunológicos e desenvolvimento de drogas e vacinas contra doenças infecciosas) tem se tornado cada vez mais importante (Campos-Neto et al. 2001; Delgado et al. 2005; Giavedoni 2005; Gibbs et al. 2007). Primatas não-humanos parecem ter vantagens significativas (comparados aos modelos convencionais) em termos de reproduzir a leishmaniose humana. Os símios são suscetíveis às leishmânias, inclusive do subgênero *Viannia*, reproduzindo assim a LTA (Lujan et al. 1990; Cuba Cuba et al. 1990; Garcez et al. 1997; Teva et al. 2003). O modelo *Macaca*

mulatta é passível de infecção por diferentes espécies de *Leishmania* como: *L. (L.) amazonensis* (Amaral *et al.* 1996), *L. (L.) major* (Amaral *et al.* 2001), *L. (V.) braziliensis* (Teva *et al.* 2003), ou *L. (L.) infantum* (Porrozzi *et al.* 2006). Este sistema animal reproduz os eventos clínico-patológicos observados em humanos tanto com LTA como LVA. Os experimentos revelaram a influência de vários fatores na expressão da doença, como a natureza do parasita, o tamanho e o local do inóculo (Amaral *et al.* 1996, 2001). Os animais infectados com *L. (V.) braziliensis* reproduzem o espectro clínico da LTA humana, inclusive a forma mucosa e disseminada da doença (Teva *et al.* 2003). Os re-isolados de rhesus infectados com este agente etiológico representam genótipos diferenciados dos clones parentais (Teva *et al.* 2003). Macacos apresentam vários níveis de susceptibilidade a *Leishmania* e o curso específico da doença depende do parasita utilizado no desafio (Amaral *et al.* 1996, 2001; Teva *et al.* 2003), da espécie hospedeira ou da dose (Porrozzi *et al.* 2006). Há variação mais marcada no curso clínico da infecção quando grupos de macacos são inoculados com diferentes cepas de *Leishmania braziliensis* (Teva *et al.* 2003).

Os rhesus infectados com leishmânias produzem anticorpos (IgG e IgG1) específicos, adquirindo imunidade (no caso, associada com a resposta Th1 específica) no decurso da infecção, inclusive sendo igualmente protegidos com vacinas candidatas contra a doença (Porrozzi *et al.* 2004; Kenney *et al.* 1999; Campos-Neto *et al.* 2001). A resposta terapêutica de macacos infectados por *L. braziliensis* à droga de referência (Glucantime®) foi consistente com a verificada nos humanos (Teva *et al.* 2005). Os primatas foram curados das lesões cutâneas após o tratamento, porém evoluindo com infecção latente e/ou recidiva. Os animais convalescentes da infecção primária resistem aos re-desafios homólogos (Amaral *et al.* 1996, 2001; Porrozzi *et al.* 2004), inclusive podendo adquirir imunidade cruzada contra algumas leishmânias heterólogas (Porrozzi *et al.* 2004). No seu conjunto, esses dados mostram o paralelo nas respostas à *Leishmania* entre humanos e macacos rhesus, refletindo assim a proximidade filogenética de seus sistemas imunológicos (Makitalo *et al.* 2002; Giavedoni 2005).

2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

Empregando-se um modelo primata (*Macaca mulatta*) reprodutivo da leishmaniose tegumentar humana causada pela *Leishmania braziliensis*, a meta principal do projeto foi tentar esclarecer mecanismos celulares e moleculares envolvidos na regulação da imunidade localizada em lesões cutâneas resolutivas e persistentes. Foi admitido como hipótese de trabalho, que a expressão clínica diferenciada da doença (humana/macacos rhesus) reflete, em última análise, o balanço entre funções de linfócitos T efetores e reguladores do processo inflamatório reacional à infecção.

Objetivos específicos:

- 2.1. Caracterizar, comparativamente, as diferentes fases da resposta inflamatória granulomatosa à *L. braziliensis* em macacos com lesões dérmicas crônicas. Para isto, foram identificados os leucócitos e mediadores inflamatórios (quimiocinas/receptores específicos e citocinas) componentes dos granulomas imunes no decurso da infecção de caráter auto-resolutivo ou persistente.
- 2.2. Investigar os mecanismos de regulação da imunidade localizada em lesões dérmicas auto-resolutivas e persistentes no modelo *Leishmania braziliensis*-macaco rhesus. Para isto, determinamos a contribuição relativa das diferentes populações ($CD4^+Foxp3^+$ e $CD4^+Foxp3^-$) de células T reguladoras (Tregs) produtoras de IL-10 no local da infecção, controlando então a inflamação crônica mediada por células T efectoras ($CD4^+T_H1$ e $CD8^+$) produtoras de IFN- γ e TNF- α .
- 2.3. Analisar a resposta imune em diferentes compartimentos (no caso, caracterizando por citometria de fluxo os fenótipos e atividade funcional de linfócitos T efectoras e reguladores) associada com a cura de lesões dérmicas pela *L. braziliensis* em macacos, tentando assim determinar correlatos de imunidade protetora contra *Leishmania*.

3. Artigos

3.1 Dynamics of immune granuloma formation in *Leishmania (Viannia) braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*

C Souza-Lemos, SN de-Campos, A Teva, S Côrte-Leal, EC Fonseca, R Porrozzi, and G Grimaldi Jr

Neste trabalho tivemos como objetivo avaliar a dinâmica de formação do granuloma imune em uma infecção cutânea auto-resolutiva induzida por *Leishmania braziliensis* no primata *Macaca mulatta*. Foi verificada a formação de granulomas bem organizados, consistindo de todos os tipos celulares específicos encontrados nos granulomas humanos. Nós mostramos também que os leucócitos polimorfonucleares são decisivos para controle do parasita nos eventos iniciais da inflamação *in vivo*. Fagócitos mononucleares que fagocitam a maioria dos granulócitos apoptóticos parasitados parecem ser a chave principal no estabelecimento da infecção nos macacos. Este modelo também indica que células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ e/ou TNF- α presentes nas lesões parecem ser importantes na cura de leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*. Ainda, o acúmulo de CD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10 nas lesões dérmicas sugerem que estas células devem desativar os sinais que levariam a involução do granuloma.

Original Paper

Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*

C Souza-Lemos,¹ SN de-Campos,¹ A Teva,¹ S Côrte-Real,² EC Fonseca,³ R Pomozzi¹ and G Grimaldi Jr^{1*}

¹Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Biologia Ultraestrutural, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Imunohistoquímica (SAP/HUAP), Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil

*Correspondence to:

G Grimaldi Jr, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, IOC/Fiocruz, Pavilhão Leônidas Deane, Sala 509, Av. Brasil 4365, 21045-090 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail: grimaldi@ioc.fiocruz.br

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this article.

Abstract

In order to unravel the physiopathology of leishmaniasis in humans, it is necessary to better understand how *Leishmania* are able to survive for years within immunologically active granulomas. In the present study, we used a macaque (*Macaca mulatta*) model of infection with *Leishmania braziliensis* as a means of assessing the usefulness of this primate system. This model more closely mirrors human protective immunity to *Leishmania* than the murine model; therefore, we used it to study the host inflammatory granulomatous response involved in the control of cutaneous leishmaniasis. Infected primates developed localized long-term skin ulcerations, but complete spontaneous clinical healing occurred in all infected animals. The infection induced the recruitment and activation of inflammatory mast cells, granulocytes, mononuclear phagocytes, and lymphocytes at the site of infection. During the acute reaction, polymorphonuclear leukocytes were more prominent than other cell types and apparently destroyed many parasites; macrophages then rapidly engulfed dying neutrophils together with their parasitic cargo. In the chronic phase, persisting parasites induced a typical T helper (Th) cytokine, type 1-mediated, immunity-induced granulomatous reaction. By this time, more or less differentiated macrophage accumulations were found, and these evolved to become mature tissue granulomas consisting of all the specific cell types found within human granulomas. In the healing stage, fibroblasts proliferated at the periphery and finally invaded the granulomas with fibrotic substitution. These findings point to the feasibility of using this model to elucidate the potentially disabling Th1-cell mechanisms that may eventually render the host granulomatous response inadequate for fighting *L. braziliensis* infections.

Copyright © 2008 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; cutaneous infection; primate model; human-like granulomatous response

Received: 26 February 2008
Revised: 30 May 2008
Accepted: 26 June 2008

Introduction

Infections with the parasitic protozoa *Leishmania braziliensis* cause severely debilitating human illnesses in many areas of tropical and subtropical America, representing an important public health problem [1]. This pathogen can cause a spectrum of clinical diseases, ranging from a self-healing cutaneous ulcer to non-healing cutaneous or mucocutaneous lesions [1,2]. Even though the molecular basis of *Leishmania* pathogenesis remains uncharacterized [3], it has been suggested that the disease phenotype may be related to parasite gene expression [4]. Nevertheless, host genetic variability and specific immune responses also influence the outcome of the infection [5,6].

The intracellular parasitism of macrophages by *Leishmania* spp. can stimulate different types of

inflammatory reactions, and in this manner, it gives rise to the various clinical and pathological patterns of the disease. Ultimately, a fine immunological balance determines the type of response in subjects infected with *L. braziliensis*. The response can either effectively promote parasite clearance with little pathology or induce immunopathological changes [7,8]. Non-healing forms of the disease in humans are commonly associated with elevated levels of the deactivating interleukin (IL)-10 [9,10], and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Th1 cells are likely to be the main source of IL-10-mediated immune suppression [11].

Leishmania braziliensis-induced granuloma formation at infection sites is a major histopathological feature of the human disease [12]. The immunologically active granulomas are thought to restrain the infection,

kill and remove the microbial target, and repair any accompanying tissue injuries. However, the overall antimicrobial efficacy of the granulomatous response appears to be variable, and it depends on host determinants and pathogen virulence. Even with an intense granulomatous response, leishmanial parasites are able to survive at low levels throughout the host's lifetime [13]. A more detailed investigation of the interaction between *Leishmania* and granuloma cells is needed to improve our understanding of this persistence and explain the pathogenesis of the disease.

Much of the information on the structure and function of tissue granuloma is derived from studies in the murine model of *L. donovani* infection [14]; however, the important challenge of relating these findings to the situation in humans remains. Because of their genetic, physiological, and metabolic similarities with humans, non-human primates appear to have significant advantages over conventional laboratory animals in terms of modelling human disease [15]. We have previously shown that leishmanial infections in out-bred rhesus macaques produced a human-like disease [16–19]. The homology between the immune system in *M. mulatta* and that in humans [20,21] has prompted us to evaluate the sequential events in the *L. braziliensis*-induced macaque granulomatous inflammatory response at the subcutaneous inoculation site. The rhesus monkey model proved to be a very useful tool for further characterizing the modulation of granuloma formation by this important human pathogen.

Materials and methods

Infection of macaques

Colony out-bred [22] young adult male rhesus macaques from the Fiocruz Primate Research Centre (Brazil) were used in this study. Their care and maintenance have been described previously [16]. Animal experimentation was approved by the Institutional Ethical Review Board. Figure 1 gives details of macaque infection with *L. braziliensis*.

Pathological analyses

Table 1 gives details of all time points and modes of analysis of the histology of *L. braziliensis*-induced skin lesions in macaques. Paraffin- and Epon-embedded tissue samples were sectioned and stained according to standard protocols [23]. Paraffin and semi-thin sections of each lesion were examined and electron microscopy examinations were performed to confirm the identification of the different cell populations of the skin infiltrates. For a semi-quantitative evaluation of the inflammatory cell types in ultra-thin sections of lesions, 20 electron micrograph fields were evaluated for each case ($\times 4000$).

Immunohistochemistry

Representative tissue sections were tested for the immunodetection of diverse cell markers (Table 2) using a horseradish peroxidase (HRP)-labelled dextran polymer and heat-induced antigen retrieval. The DAKO LSAB system (DAKO Corp, Carpinteria, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, after being mounted on silane-coated slides, tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and submitted to heat-induced antigen retrieval in citrate buffer (pH 6) for 30 min at 96 °C, with cooling for 10 min before immunostaining. All tissues were then exposed to 3% hydrogen peroxide for 5 min, primary antibody for 30 min, labelled polymer HRP for 30 min, and diaminobenzidine, the chromogen, for 5 min. All incubation steps were performed at room temperature and sections were washed between incubations with Tris-buffered saline (TBS) solution. After counterstaining with alcoholic haematoxylin for 1 min, the slides were dehydrated and mounted for examination. Table 2 summarizes the technical specifications of the antibodies used in the immunohistochemical reactions.

Quantitative analysis of cell populations

Automatic counting of immunostained cells was performed using Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) [24]. Briefly, the sections were examined under a Nikon E400 light microscope and digital images were captured by an attached colour video camera (Sony DXC-151A CCD, Tokyo, Japan) connected to a 500 MHz Pentium-III (Intel Corp, Austin, TX, USA) personal computer by a 4 MB PCI All-in-Wonder Pro Image card (ATI Technologies, Santa Clara, CA, USA). Spatial and light intensity calibrations of the images were obtained by the method of Wells *et al* [25]. The different positive cells within the infiltrate were scored from three chosen microscopic fields at a magnification of 600 \times . In order to obtain a representative counting value for each cell marker, three macaque lesions were tested at each time point during the experiment.

Cytometry analysis of ex vivo granuloma-derived leukocytes

Recovery of inflammatory leukocytes from macaque skin lesions present for 8 weeks was performed according to a published protocol [9]. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Cell surface and intracellular staining were performed as described by Bottrel *et al* [26]. Briefly, cells were washed and stained for 30 min at 4 °C with the optimal dilution of each antibody, followed by washes and fixation using 2% formaldehyde solution. Monoclonal antibodies (MAbs) to human CD3 (clone SP34), CD4 (clone L200), CD8 (clone SK1), CD25 (clone 2A3), and appropriate IgG1 and IgG2

Table 1. Evolution of the histopathological events acting in self-healing skin lesions of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*-infected macaques

Group (time PI) and monkey code	Lesion stage (size, mm ²) ^a	Extent of infiltrate ^b	Cellular components of the dermal inflammatory infiltrate ^c												
			Mas	Eos	Neu	p_Neu	p_M ₂	m_M ₂	Epc	Lgc	Lym	Plc	Fib	Col	
I (90 min)															
U37	Acute	1+	2+	1+	3+	3+	3+	1+	—	—	—	—	—	—	
N22	Acute	1+	1+	1+	3+	2+	2+	2+	—	—	—	—	—	—	
B12	Acute	2+	2+	1+	3+	2+	2+	1+	—	—	—	—	—	—	
II (20 h)															
U43	Acute	3+	2+	1+	3+	2+	1+	3+	—	—	1+	1+	—	—	
F28	Acute	2+	1+	1+	3+	2+	1+	2+	—	—	1+	1+	—	—	
D6	Acute	2+	1+	1+	3+	1+	1+	2+	—	—	1+	—	—	—	
III (72 h)															
O15	Acute	2+	1+	1+	2+	1+	1+	3+	1+	—	2+	1+	—	—	
D14	Acute	2+	1+	—	2+	1+	1+	3+	1+	—	2+	1+	—	—	
I22	Acute	2+	—	—	2+	1+	1+	3+	1+	—	2+	1+	—	—	
IV (2 weeks)															
U37	Active CL (20)	2+	—	—	1+	—	1+	3+	2+	1+	3+	1+	—	—	
N22	Active CL (13)	3+	—	—	1+	—	1+	3+	2+	—	3+	1+	1+	1+	
B12	Active CL (29)	3+	—	—	1+	—	1+	3+	2+	1+	3+	1+	—	—	
V (3 weeks)															
U43	Active (612)	3+	—	—	1+	—	1+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	1+	
F28	Active (377)	3+	—	—	1+	—	1+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	1+	
D6	Active (706)	3+	—	—	1+	—	1+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	1+	
VI (8 weeks)															
O15	Resolving (88)	3+	—	—	1+	—	—	—	—	1+	—	2+	—	2+	
D14	Active (301)	3+	—	—	1+	—	—	1+	3+	2+	3+	1+	1+	1+	
I22	Active (242)	3+	—	—	1+	—	—	1+	3+	1+	2+	1+	1+	1+	
VII (16 weeks)															
I22	Resolving (126)	1+	—	—	—	—	—	—	—	—	1+	—	3+	2+	
F28	Resolving (260)	2+	—	—	—	—	—	—	—	—	1+	—	3+	2+	
N22	Resolving (157)	3+	—	—	—	—	—	—	—	—	1+	—	3+	2+	
VIII (24 weeks)															
O15	Healed	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3+	
U37	Healed	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1+	3+	
D6	Healed	2+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3+	

^a Skin lesion size was estimated using the formula area = $\pi \times$ greatest radius \times least radius.
^b The dermal inflammatory pattern was graded as follows: — = absent; 1+ = isolated foci of inflammatory cells; 2+ = isolated to coalescing areas of inflammatory infiltrate; 3+ = diffuse areas of inflammatory infiltrate.
^c Each cell population in the infiltrate was scored as follows: — = absent; 1+ = slight; 2+ = moderate; 3+ = intense. For details of morphological assessment, see the Materials and methods section. Mas = mast cell; Eos = eosinophil; Neu = neutrophil; p_Neu = parasitized neutrophil; p_M₂ = parasite-laden vacuolated macrophage; m_M₂ = mature macrophage; Epc = epithelioid cell; Lgc = Langhans-type giant cell; Lym = lymphocyte; Plc = plasma cell; Fib = fibroblast; Col = collagen.

Table 2. Antibodies used for immunohistochemistry on macaque skin lesions

Primary antibody (clone)	Specificity	Supplier	Dilution used
Rabbit-derived anti-human CD3 polyclonal	T-cell receptor	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1/600
Murine-derived anti-human CD4 monoclonal (1F6)	Helper/inducer T cells	NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK	1/40
Murine-derived anti-human CD8 monoclonal (1A5)	Suppressor/cytotoxic T cells	NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK	1/20
Murine-derived anti-human CD20 monoclonal (L26)	B cells	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1/300
Murine-derived anti-human CD68 monoclonal (KP1)	Macrophages	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1/500
Murine-derived anti-human HLA-DR monoclonal (LN-3)	APCs/activated T cells	Zymed Laboratory Inc, CA, USA	1/200

isotype controls were from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). All antibodies were fluorescein isothiocyanate (FITC)- or peridinin chlorophyll protein (PERCP)-conjugated. The cells were permeabilized with a 0.5% saponin solution (BD Pharmingen) and further stained with phycoerythrin (PE)-labelled anti-interferon-gamma (IFN- γ) (clone 25 723.11; BD Pharmingen), anti-tumour necrosis factor (TNF)- α (clone 6401.1111; BD Pharmingen), or anti-IL-10 (clone JES3-9D7; Caltag Laboratories, San Francisco, CA, USA) MAbs. Data were acquired on a FACSCalibur™ flow cytometer and analysed with CellQuest Pro™ software (both Becton Dickinson, San José, CA, USA).

Statistical analysis

Quantifiable data were analysed using Student's *t*-test. Significance of the difference at a given time point was analysed using a one-way ANOVA (confidence level of 99%) with the Tukey–Kramer post-test using the GraphPad Prism version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The level of significance was set at a *p* value of less than 0.05.

Results

Lesion development

All of the *L. braziliensis*-infected monkeys developed self-limiting cutaneous leishmaniasis (CL) that became prominent several weeks post-infection (PI) and resolved within 6 months PI (Figure 1). As shown in Figure 2, over a period of time after infection with this pathogen, macaques develop a condition similar to that in humans, which is characterized by chronic ulcerative skin lesions of varying severity. An erythematous papule was first visible at week 2 PI (Figure 2A). The initial growth of the nodular lesion progressed rapidly (nodules varied between approximately 10 and 200 mm² in area) and peaked at week 5 PI (Figure 1). All lesions were ulcerated after 3 weeks PI (Figure 2B) and subsequently regressed, and this was followed by spontaneous healing (Figure 2C) and scarring (Figure 2D).

The evolution of the inflammatory response to *L. braziliensis*

The sequential morphological findings in the dermis of infected macaques are summarized in Table 1. As shown in Figures 3 and 4, the anti-*L. braziliensis* inflammatory response at the infection site could be separated into distinct phases with regard to the cell types activated in each respective phase. In the acute

inflammatory reaction, up to 72 h after parasite injection, there was a progressive accumulation and activation of cells of the innate immune system (such as resident mast cells, granulocytes, and mononuclear phagocytes) with a predominance of neutrophils (Figures 3A–3C). In this early phase, neutrophils were found in the intervascular connective tissue of the dermis (Figures 4A and 4B), together with normal and occasionally degranulating mast cells. Evidence of extrusion of intact mast cell granules was observed in semi-thin sections (Figure 3B), as well as electron micrographs. Mast cell granule alterations included the loss of electron-dense particle content and fusion of granule membranes with the formation of interconnected and enlarged granules (data not shown). By this time, concurrent with the degeneration of most granulocytes, intracellular destruction of the majority of the inoculated parasite had occurred (Figures 4C and 4D). Moreover, infected neutrophils underwent apoptosis and were then engulfed together with their parasitic cargo by inflammatory macrophages (Figure 4D).

In the early phases (2–3 weeks PI) of the developing primary ulcerated skin lesions, the histopathological findings in the dermis showed a non-specific chronic mononuclear infiltrate containing indistinctly delimited differentiated macrophage accumulations. Some of these accumulations contained amastigotes and they gave rise to poorly organized granulomas that were interspersed with lymphocytes and plasma cells (Figures 3D and 3E). In the late stages (8–16 weeks PI), more differentiated macrophages represented the principal feature of this inflammatory process. These macrophages evolved to form tuberculoid-type granulomatous nodules consisting of epithelioid cells (Figures 3E and 4F) that fused to form Langhans-type multinucleated giant cells (Figure 3F). A rim of lymphocytes and plasma cells surrounded the macrophage aggregate and a tight coat of fibroblasts closed the structure in later stages (Figure 3G). In the cutaneous scars, fibroblasts proliferated and finally invaded the granulomas with fibrotic substitution (Figure 3H).

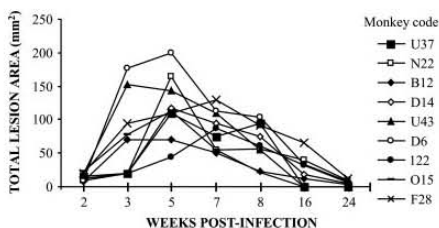


Figure 1. The course of skin lesion development in rhesus macaques following infection with *Leishmania braziliensis* (strain MHOM/BR/97/SIS). A standardized inoculum of 10^7 promastigotes [16] was injected intradermally into the left forearm of each monkey. All of the challenge-infected monkeys developed a typical ulcerated skin lesion at the site of inoculation (Figure 2). Skin lesions were measured as previously described [18].

Kinetics of mononuclear cell influx into skin lesions

The cellular nature of the infiltrate in the dermis of macaques with *L. braziliensis* CL was characterized by immunoperoxidase staining. Biopsies were taken from lesions over time after parasite challenge and sections were immunostained to quantitate inflammatory cell types. Figure 5 shows the profile and percentage of positive cells in the cellular infiltrate; also illustrated (Figure 6) are some of the results describing the characterization of cells from an 8-week lesion obtained using antibodies directed against CD3 (A), CD20 (B), CD68 (C), HLA-DR (D), CD4 (E), and CD8 (F) markers. The macaques showed marked variation in the number of positive cells for all phenotypes. Except for the CD20 phenotype, these markers tended to decrease with time. Of note, CD68⁺



Figure 2. The pictures show the characteristic clinical features of the self-healing *L. braziliensis* cutaneous infection observed in a macaque (Rh U43) over time PI: (A) the initial lesion (an erythematous papule); (B) the ulcerated skin lesion; (C) the healing (fibroblastic substitution) lesion; and (D) the scar

macrophages were not consistently more numerous in active lesions than in healing ones, and activated cells expressing class II antigen (HLA-DR⁺) were present in approximately equal numbers in lesions present for various lengths of time (Figure 5A). The number of CD3⁺ T cells was higher ($p < 0.01$) in biopsies collected at 72 h PI ($11.7 \pm 1.6\%$) than in lesions present for 3 ($5.4 \pm 1.8\%$) and 16 ($5.1 \pm 2.2\%$) weeks PI. Except for an increase at week 3, however, the number of CD4⁺ cells remained fixed during the time period under study (Figure 5B). Moreover, T-cell ratios favoured CD4⁺ cells only at week 3 PI, with a CD4 : CD8 ratio of 2.07. In contrast, the percentage of CD8⁺ T cells was higher ($p = 0.01$) in healing lesions than in active ones (Figure 5B).

Identification of cytokine-expressing T cells in the skin lesions

Next, we used flow cytometry to characterize leukocytes derived from skin lesions of macaques at week 8 PI (Figures 7A and 7B). CD3⁺ T cells (ranging from 2.5×10^5 to 5×10^5 cells per biopsy) accounted for $42.86 \pm 21.64\%$ (range 21.27–64.55%) of the stained cells, with a predominance of CD3⁺CD4⁺

($16.02 \pm 5.99\%$) and CD3⁺CD8⁺ ($29.72 \pm 19.29\%$) over CD4⁺CD25⁺ ($4.67 \pm 0.70\%$) T cells in these lesions. Conversely, the percentage of IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ T cells ($95.58 \pm 0.70\%$) was significantly higher ($p < 0.01$) than the percentages of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells expressing either IFN- γ ($73.28 \pm 6.86\%$ and $71.93 \pm 10.31\%$, respectively) or TNF- α ($73.85 \pm 2.43\%$ and $63.92 \pm 6.30\%$, respectively); these cells accumulated in approximately equal numbers at the infection sites (Figure 7A).

Discussion

A variety of New World monkeys, including *Saimiri sciureus*, *Cebus apella* [27], and *Callithrix penicillata* [28], are susceptible to infection with *L. braziliensis*. The issues of pathological consequence and mimicry of the human disease state, however, are not as clear cut in these animals as they are in Old World rhesus monkeys. In an original report [18] on infections with *L. braziliensis* in macaques, we characterized the evolution of different parasite strains in this experimental host. Inoculation produced lesions of variable

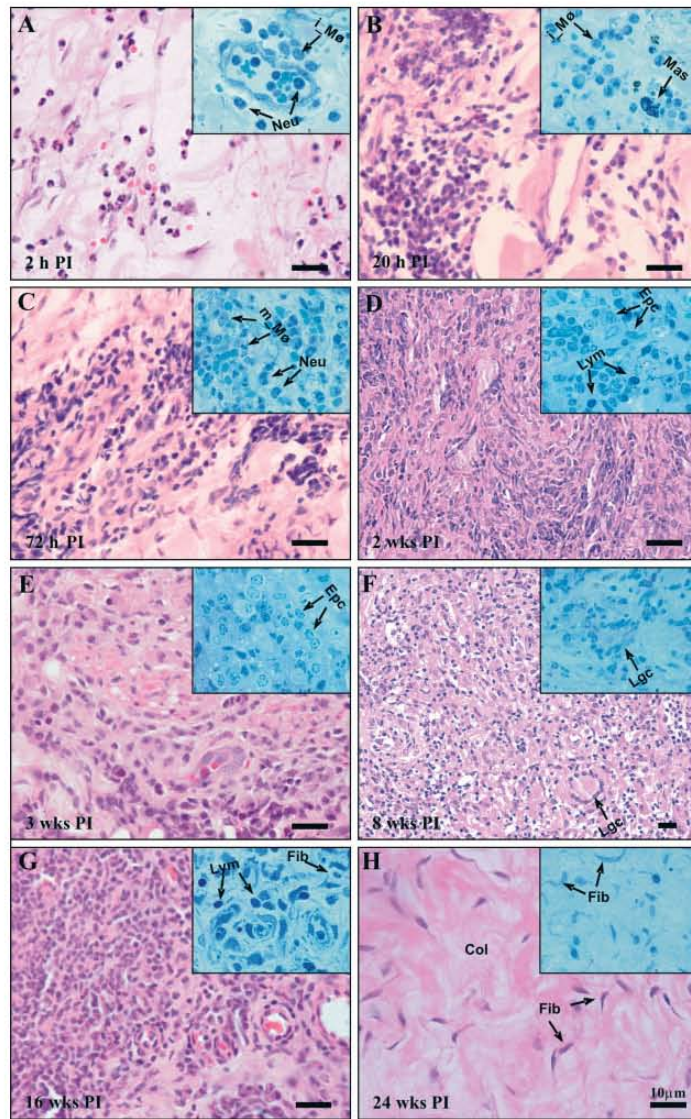


Figure 3. Sequential histopathological changes in the self-healing skin lesions of *L. braziliensis*-infected macaques. In the acute phase, inflammatory neutrophils and monocytes are recruited to the skin (A–C). In the chronic phase, persisting parasites may account for the development of immune granulomas composed of an aggregation of parasite-containing macrophages, epithelioid cells (activated macrophages), and multiple Langhans-type giant cells surrounded by lymphocytes and plasma cells (D–F). In the healing phase, fibroblasts proliferated at the periphery of the granulomas (G) and finally invaded them with fibrotic substitution (H). Paraffin-embedded sections stained with haematoxylin and eosin; bar = 10 μ m. Insets: Epon-embedded sections stained with toluidine blue stain; original magnification 100 \times . Details of inflammatory cells: Mas = mast cell; Neu = neutrophil; i_Mo = immature macrophage; m_Mo = mature macrophage; Epc = epithelioid cell; Lgc = Langhans-type giant cell; Lym = lymphocyte; Fib = fibroblast; Col = collagen

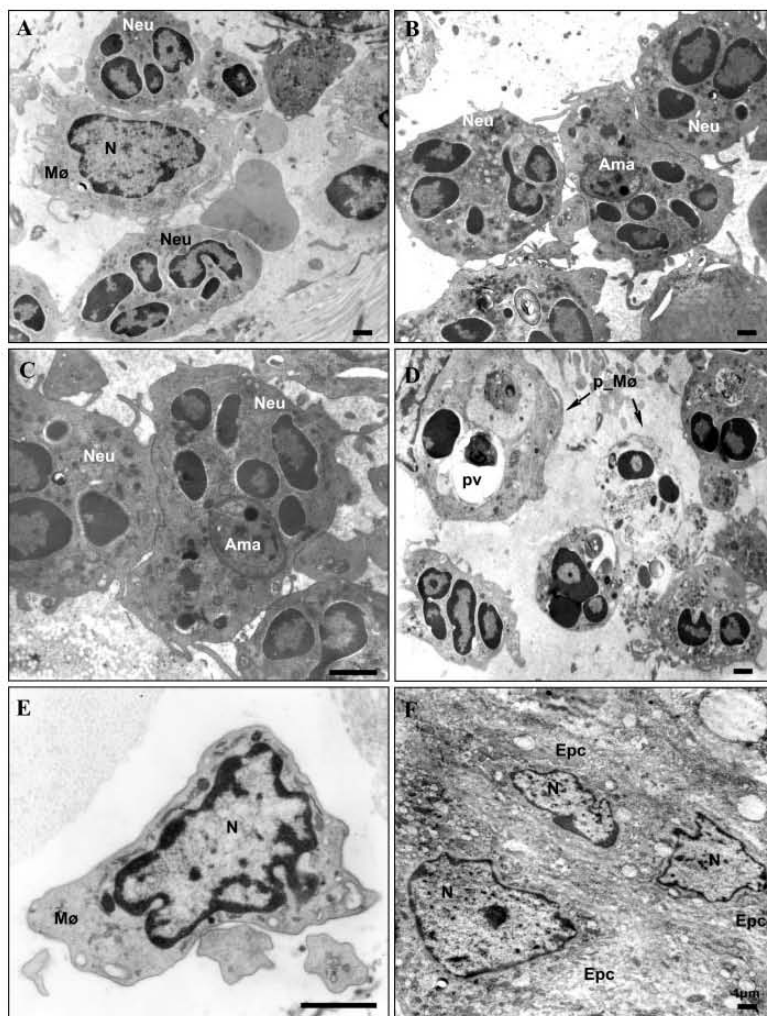


Figure 4. Electron micrographs illustrating the initial control of the protozoan *L. braziliensis* by macaque polymorphonuclear and mononuclear phagocytes 24 h PI (A–E) and the ultrastructural morphology of the granuloma generated at week 3 PI (F). Neu = neutrophil; Mø = macrophage; p_Mø = scavenger macrophage engulfing apoptotic neutrophil together with its parasitic cargo; Epc = epithelioid cell; N = nucleus; pv = parasitophorous vacuole

severity, ranging from self-healing to non-healing disease (including persistent metastatic skin and mucosal lesions), which lasted until the end of the observation period (33 months). It is likely that the macaques in this study had a sustained course of *L. braziliensis* cutaneous infection, but complete clinical healing was achieved in all animals 6 months after infection. We have previously shown that an antigen-specific

Th1-like response controls clinical resistance in *L. braziliensis*-infected macaques [18]. It is by now well established that healing in leishmaniasis is dependent on the ability to mount an IL-12-driven Th1 response, which activates infected macrophages by the production of IFN- γ to kill intracellular parasites [5,14].

Through the use of the *L. braziliensis*-macaque model, we have examined here the evolution of the

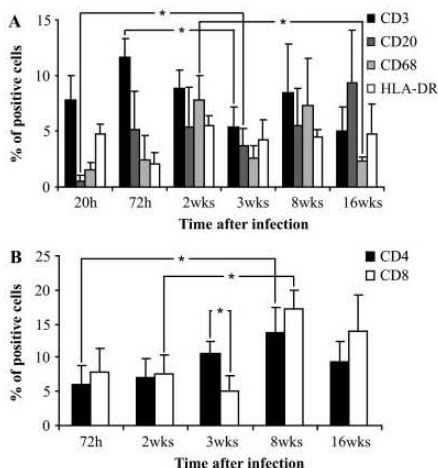


Figure 5. Kinetics of mononuclear cell influx into skin lesions in *L. braziliensis*-infected rhesus macaques. Cryostat (A) and paraffin-embedded (B) sections obtained from biopsies of lesions were stained with monodonal antibodies and the cells in the inflammatory infiltrate were counted as described in the Materials and methods section. Bars show the mean \pm SD results for three experimental monkeys, with CL tested individually by immunohistochemistry. *Significant differences ($p < 0.01$ – 0.05) between mean values of positive cells with time

host inflammatory response acting in self-resolving CL. We provide evidence that polymorphonuclear neutrophil leukocytes are decisive for parasite containment by early inflammatory events *in vivo*. In addition, scavenger mononuclear phagocytes engulfing most of the parasite-laden apoptotic granulocytes are likely to be key players in establishing the infection in macaques. Results similar to ours have been previously reported after a study of skin infiltrates from *L. major*-infected mice [29]. In humans, parasitized neutrophils infiltrating the infection site begin to secrete chemokines such as IL-8 (also known as CXCL8), which acts early to recruit leukocytes [30]. The parasite appears to modulate this process by releasing a granulocyte chemotactic factor that induces IL-8 production by neutrophils [31]. However, *Leishmania* can survive within these phagocytes for hours or even days following infection, and the clearance of dying parasitized neutrophils by macrophages does not activate their microbicidal function [32,33].

The development of clinically evident skin lesions in macaques coincides with the recruitment and activation of mononuclear cells into the dermis. By this time, blood monocytes provide a second wave of inflammatory cells entering the infection site. A description of similar events taking place in *L. major*-infected mice revealed that monocytes are recruited by tissue MIP-1 α -producing neutrophils [32]. *Leishmania* can also

induce high CCL2 expression in human macrophages; CCL2 is a chemokine capable of attracting not only monocytes, but also other CCR2⁺ cells of the innate immune system such as dendritic cells (DCs) and natural killer (NK) cells. These cells are important in the early stages of granuloma formation because of their ability to rapidly produce large quantities of inflammatory cytokines (ie IL-12, IFN- γ , and TNF- α) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [6,34]. In patients with localized CL, activated Th1 lymphocytes migrate back from the draining lymph nodes to the infection site because they are attracted by CXCL10 and CXCL9, and likely by CCL2 [35]. While mice undergo a rapid hepatic accumulation of MIP-1 α , CCL2, and CXCL10 following infection with *L. donovani*, it is clear that only CXCL10 expression amplified by antigen-specific Th1 cells is essential for liver granuloma formation [6].

At later stages of granuloma development in infected macaques, activated tissue macrophages evolved to histologically well-formed granulomas containing a variable number of cytokine-secreting T-cell populations, and thus they effectively promote parasite clearance and clinical healing of the skin lesions. In *L. donovani*-infected mice, the development of effective hepatic granulomas requires early IL-12-dependent IFN- γ production by T cells for the activation of monocytes/macrophages [13]. Indeed, the number of tissue CD4⁺ and CD8⁺ cells increases by the first week PI and this increase likely reflects both local expansion and recruitment from the spleen [14]. The pattern noted above is consistent with that reported here (Figure 5), suggesting that T-cell responses are continually generated during leishmanial infection.

In *L. braziliensis*-infected subjects, the immunological effectiveness of intralesional granulomas appears to be related less to the number of T-cell phenotypes [12,36,37] than it is to their ability to generate differential expression of cytokines [38–40]. Our results also indicated that distinct cell populations (such as CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, and HLA-DR) change uniformly during the infection, suggesting that the same components of the local immune response are working in unison at least at the level of the listed cell markers. Except for that of the CD20, the number of mononuclear cells trafficking into the skin lesions tends to decrease with time. Accordingly, B (CD20⁺) cells were more numerous in patients with CL that may heal spontaneously than they were in patients with disseminated CL [40]. It seems that antigen-specific B-cell-derived IgG antibodies are required for the priming of T-cell immunity by DCs [34]. This model also indicates that IFN- γ - and/or TNF- α -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells present in the lesions (Figure 7) are likely to be important in promoting healing in *L. braziliensis* CL. It is interesting to note that the frequency of CD8⁺ T cells was higher ($p = 0.01$) in healing lesions in macaques than it was in active ones. This feature is consistent with the hypothesis that specific CD8⁺ T cells capable of releasing IFN- γ

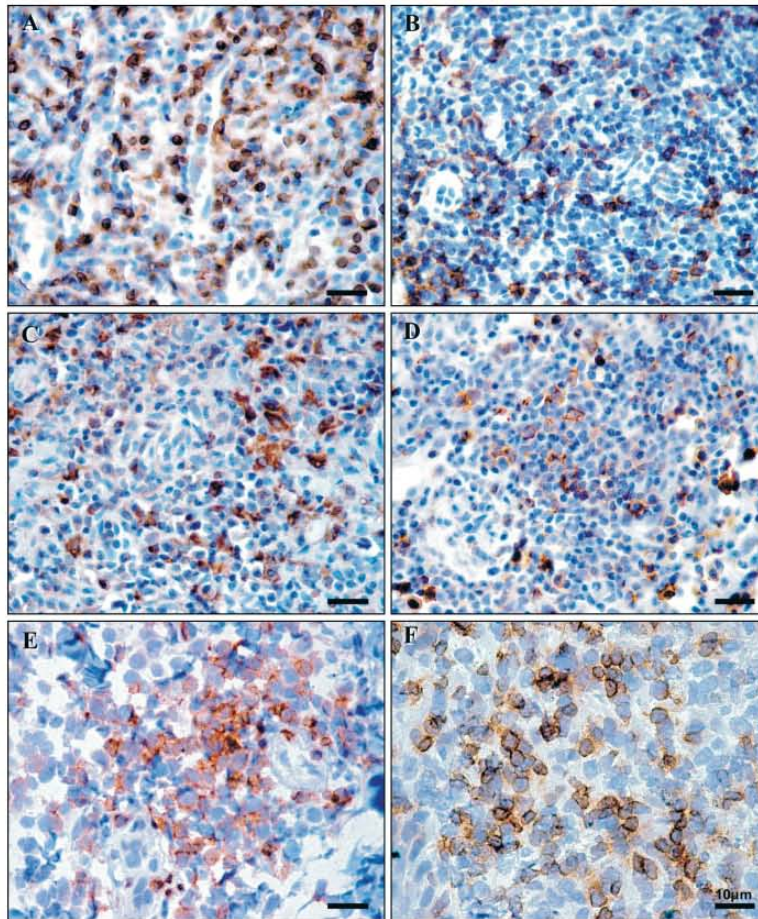


Figure 6. Cell populations in self-healing cutaneous leishmaniasis of *L. braziliensis*-infected macaques. Immunoperoxidase staining of an 8-week lesion using human anti-CD3 (A), anti-CD20 (B), anti-CD68 (C), anti-HLA-DR (D), anti-CD4 (E), and anti-CD8 (F) antibodies. DAB with haematoxylin counterstain; original magnification 40 \times

contribute to protective immunity in human [41] and murine CL [5,34]. Finally, the accumulation of IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ T cells in self-healing skin lesions, like those described here, suggests that these cells may deactivate signals that lead to granuloma involution in the infected host.

Collectively, these findings lead us to propose the *L. braziliensis* macaque model for further investigation under more controlled conditions than are possible in clinical studies of the cellular immune host responses that act *in vivo* during the course of resolving versus persistent CL. By increasing our understanding of the fine immune mechanisms controlling tissue granuloma

structure and function in experimental leishmaniasis, it may prove possible to devise and develop clinical strategies to improve the treatment of this infection.

Acknowledgements

We thank Dr Antonio da Mota Marinho and the staff at the Fiocruz Animal Care Facility for their assistance with daily care and procedures on the macaques. Financial support was received from Fiocruz, Edital MCT/CNPq-470269/2006-5 (Brazil), and the Millennium Institute for Vaccine Development and Technology (MCT/CNPq-420067/2005-1).

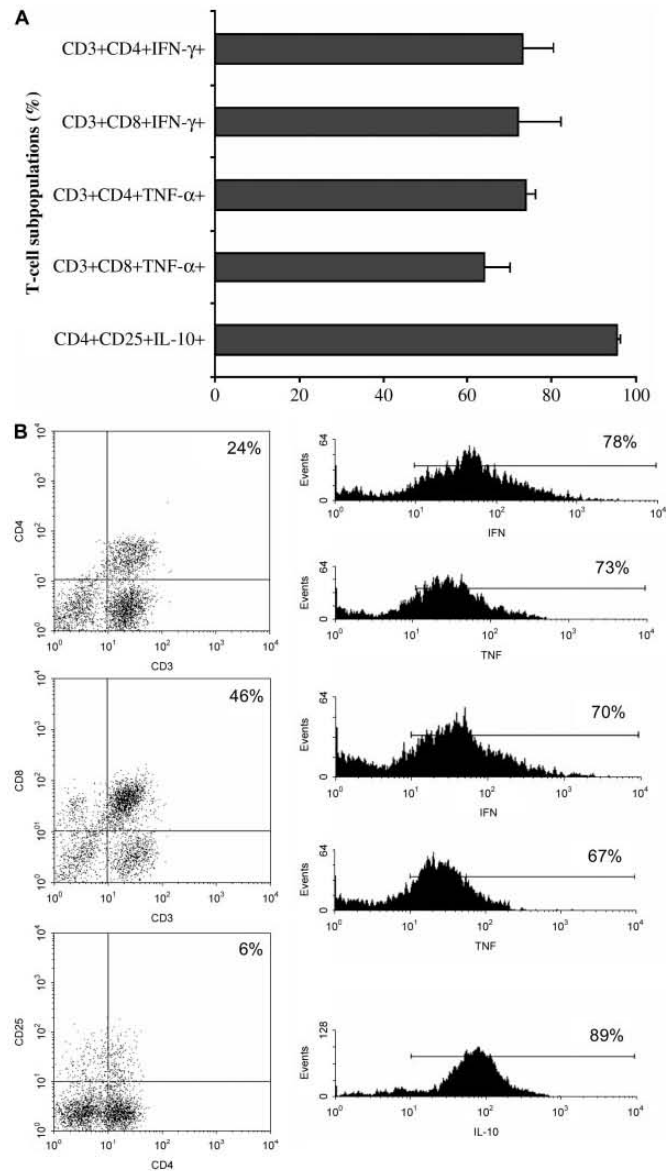


Figure 7. Phenotypic and functional characterization of *ex vivo* skin lesion-derived leukocytes from macaques with *L. braziliensis* CL. Biopsy samples of skin lesions were digested with liberase, disrupted, filtered, and washed, and cell concentration and viability were determined. Panel A shows the proportion of skin lesion-derived cytokine-expressing T-cell subpopulations. Values represent the mean \pm SD of three macaque lesions collected 8 weeks after infection. The histograms in panel B show the percentages of gated lymphocytes and the intracellular cytokine staining of these leukocytes from one macaque with active disease.

References

1. Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:230–250.
2. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2002;186:1829–1834.
3. McConville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol* 2007;37:1047–1051.
4. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genet* 2007;39:839–847.
5. Vanloubbeek Y, Jones DE. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1026:267–272.
6. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Neto M, Barral A. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2006;22:32–38.
7. Gaze ST, Dutra WO, Lessa H, Guimarães LH, de Jesus AR, Carvalho LP, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a non-balanced monocyte population. *Scand J Immunol* 2006;63:70–78.
8. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 2007;29:251–258.
9. Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MSF, Mortara RA, Brodsky CI, et al. CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 2006;193:1313–1322.
10. Antonelli LRV, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KCL, Guimarães LH, Bacellar O, et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4–CD8–) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2006;74:6317–6323.
11. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks DL. CD4 + CD25 – Foxp3 – Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007;204:285–297.
12. Pimez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Tonigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 1990;145:3100–3104.
13. Murray HW. Tissue granuloma structure–function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 2001;82:249–267.
14. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol* 2007;85:138–147.
15. Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, Bumgarner R, Weinstock GM, Mardis ER, et al. Rhesus macaque genome sequencing and analysis consortium. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* 2007;316:222–234.
16. Amaral VF, Ransatto VAO, Conceição-Silva F, Molinaro E, Ferreira V, Coutinho SG, et al. The Asian rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1996;82:34–44.
17. Amaral VF, Teva A, Porrozzì R, Silva AJ, Pereira MS, Grimaldi G Jr. *Leishmania (Leishmania) major*-infected rhesus macaques (*Macaca mulatta*) develop varying levels of resistance against homologous reinfections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:795–804.
18. Teva A, Porrozzì R, Cupolillo E, Pimez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G Jr. *Leishmania (Viannia) braziliensis* induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology* 2003;127:437–447.
19. Porrozzì R, Pereira MS, Teva A, Volpini AC, Pinto MA, Marchevsky RS, et al. *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:926–937.
20. Pahar B, Li J, Rourke T, Miller CJ, McChesney MB. Detection of antigen-specific T cell interferon- γ expression by ELISPOT and cytokine flow cytometry assays in rhesus macaques. *J Immunol Methods* 2003;282:103–115.
21. Giavedoni LD. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. *J Immunol Methods* 2005;301:89–101.
22. Andrade MCR, Penedo MCT, Ward T, Silva VF, Bertolini LR, Roberts JA, et al. Determination of genetic status in a closed colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Primates* 2004;45:183–186.
23. Grimaldi G Jr, Soares MJ, Moriarty PL. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1984;6:397–408.
24. Silva Francisco J, Moraes HP, Dias EP. Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. *Braz Oral Res* 2004;18:100–104.
25. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Equipment, standardization and application of image processing. *Am J Clin Pathol* 1993;99:48–56.
26. Bottrel RLA, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Neto M, et al. Flow cytometry determination of cellular sources and frequencies of key-cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2001;69:3232–3239.
27. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. *J Trop Med Hyg* 1977;80:29–35.
28. Cuba Cuba CA, Ferreira V, Bampi M, Magalhães A, Marsden PD, Vexenat A, et al. Experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the marmoset, *Callithrix penicillata* (primates: callithricidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:459–467.
29. Lima GMAC, Valocchi AL, Silva UR, Bevilacqua E, Kiffer MMF, Abrahamsen IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 1998;64:145–151.
30. Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 2002;70:826–835.
31. van Zandbergen GM, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun* 2002;70:4177–4184.
32. van Zandbergen GM, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004;173:6521–6525.
33. Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol* 1992;52:269–273.
34. Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 2007;17:115–122.
35. Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker E, Velazco O, Becker I, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996;173:699–709.
36. Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Neto M, Costa JM, et al. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1987;9:487–497.

37. Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lemer EA. American cutaneous leishmaniasis: *in situ* characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg* 1994;**50**:743–747.
38. Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR, Gallinoto ME, Castes M, Rondon AJ, et al. *In situ* characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1985;**60**:241–248.
39. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993;**91**:1390–1395.
40. Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA Jr, Barral-Neto M, et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;**97**:979–983.
41. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto M, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;**9**:251–256.

3.2 Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis

SN de-Campos, C Souza-Lemos, A Teva, R Porrozzi and G Grimaldi Jr

Neste estudo tivemos como objetivo avaliar a resposta imunológica localizada e sistêmica de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) experimentalmente infectados com *Leishmania braziliensis*. A análise da resposta imune nos diferentes compartimentos durante a infecção crônica pode ser importante na correlação com a proteção imune à *Leishmania*. Evidenciamos que IFN- γ e TNF- α expressos por células CD4⁺ e CD8⁺ são provavelmente decisivos para a eficácia imunológica dos granulomas, sendo que sua resolução pode ser atribuída ao recrutamento concomitante de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10 que suprimem a resposta inflamatória mediada por células T. Comprovamos que a análise *ex vivo* de células derivadas das lesões, corresponde ao método mais eficaz (quando comparado com a análise de células estimuladas *in vitro*), para avaliar a resposta funcional de linfócitos T efetores e linfócitos T reguladores na resposta imune durante a leishmaniose experimental.

Systemic and compartmentalized immune response in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis

Short title: A primate model of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis

SN de-Campos, C Souza-Lemos, A Teva, R Porrozzi and G Grimaldi Jr*

Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro (Brazil)

*Correspondence to: G Grimaldi Jr, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, IOC/Fiocruz, Pavilhão Leônidas Deane, Sala 509, Av. Brasil 4365 Av. Brasil 4365, 21045-090 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: grimaldi@ioc.fiocruz.br

Abstract

This study characterizes the systemic and local immune responses in the course of *Leishmania braziliensis*-induced cutaneous infection in a primate (*Macaca mulatta*) model. Cytometry analysis showed more numerous key-cytokine-producing T cell subsets in *ex vivo* granuloma-derived leukocytes as compared to those obtained following antigen-specific restimulation *in vitro* of freshly isolated cells from the skin-dLNs. We provide evidence that antigen-specific interferon-gamma (IFN- γ)- or tumour necrosis factor alpha (TNF- α)-expressing CD4⁺ and CD8⁺ cells are likely decisive for the immunological effectiveness of granulomas, but their resolution could be ascribed to a concomitant recruitment of interleukin (IL)-10-producing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells for the suppression of effector T cell-mediated inflammatory response. The findings confirm the feasibility of using this model to fully elucidate regulatory mechanisms that may render granulomas inadequate for fighting intracellular pathogens, which will need to be considered in any therapeutic strategy designed to prevent immune pathology.

Key Words: *Leishmania braziliensis* cutaneous infection; primate model; human-like granulomatous response

1. Introduction

Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis (CL) is characterized by its chronicity, latency, and tendency to metastasize, resulting in recurrent lesions with the potential for mucosal involvement (Grimaldi and Tesh, 1993). At the tissue

level, *L. braziliensis* induces a T-helper cytokine type 1 (Th1)-mediated granulomatous inflammation that contain infection (Pirmez et al., 1993), but local IL-10-mediated immune suppression may promote persistent infection, resulting in non-healing disease (Campanelli et al., 2006; Nylen and Sacks 2007). Although the outcome of the infection largely depends on both the host genetic variability and the virulence of the infecting parasite strain, the cellular and molecular mechanisms underlying the establishment, maintenance, and disruption of the homeostatic balance between host and pathogen remain unclear (Sojka et al., 2009).

Infections of mice with *L. major* parasites have proved to be very useful models to characterize the development and regulation of immune responses during leishmaniasis (Sacks and Noben-Trauth, 2002). The progressive disease in susceptible BALB/c mice have been correlated with a Th2-type immune response (characterized by production of IL-4, IL-5, and IL-6) that is unable to mediate pathogen clearance. In contrast, resistant mouse strains rapidly control infection due to their ability to mount an IL-12-driven Th1 response that provide IFN- γ for the activation of the infected macrophage to kill intracellular parasites. Contributions by central memory CD4⁺ T-cells as well as CD8⁺ cells to the mediation of resistance have also been shown in mice (Vanloubbeeck and Jones, 2004). However, naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory (nTreg) cells expressing IL-10 (Belkaid et al., 2002) and/or CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ Th1 cells expressing both IFN- γ and IL-10 (Anderson et al., 2007) appear to limit the

number of IFN- γ producers at the infection site thus facilitating chronic parasite persistence.

The use of murine models of *L. braziliensis* infection is limited, because mice are naturally resistant to this parasite species. In contrast, we have previously shown that rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are susceptible to *L. braziliensis* cutaneous infection and develop a human like disease, including the non-healing granulomata mucosal leishmaniasis (Teva et al., 2003). Although an effector T-cell mediated inflammation controls clinical resistance in *L. braziliensis*-infected macaques (Teva et al., 2003; Souza-Lemos et al., 2008), it remains unclear what T-cell responses in primates will be required for vaccine-induced protective immunity (Grimaldi, 2008). Nevertheless, analysis of the immune response in different compartment during chronic infection could prove useful for determining correlates of immune protection to *Leishmania* (Barbosa Reis et al., 2009). To address this issue, here we use the immunophenotypic approaches by flow cytometry to further characterize the parasite-specific cell-mediated immune responses both *in vivo* [i.e., as detected by measuring *ex vivo* granuloma-derived cells, without any further re-stimulation] and *in vitro* [i.e., by assessing recall proliferative and cytokine responses to parasite antigen of either peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or skin-draining lymph node-derived leukocytes (dLNs)] associated with cure of cutaneous lesions in this *L. braziliensis*-macaque model.

2. Materials and methods

2.1. Infection of macaques and pathological analysis

All animal studies were performed under the guidance and with the approval of the Oswaldo Cruz Foundation Institutional Animal Care and Use committee. Seven outbred adult rhesus macaques (*M. mullata*) were used in this study. A high dose (10^7 promastigotes) of virulent *L. braziliensis* (MHOM/BR/97/SIS strain) was injected intradermally into the left forearm of each monkey. The infection was allowed to proceed until the macaques reached skin disease progression and spontaneously resolution. In the chronic phase, tissue samples from skin lesions and dLNs were collected and processed for histological analyses. Paraffin-embedded tissue sections were stained with haematoxylin eosin and observed under the light microscope at 40 x magnification in order to confirm the identification of different cell populations of the inflamed tissues.

2.2. Preparation of cells

Recovery of inflammatory leukocytes from macaque skin lesions present for 8 weeks was performed as previously described (Souza-Lemos et al., 2008). Blood and tissue samples were also harvested from macaques at week 8 after infection. PBMCs were purified by Ficoll-Hypaque (Amersham) gradient centrifugation. *Ex vivo* inflamed skin- and dLN-derived cells were homogenized into single cell suspensions using cell dissociation sieves. The red blood cell content was reduced by a 5-min incubation in cold ACK lysis buffer. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion and labelled as described below.

2.3. Restimulation of leukocytes for cytokine analysis

For *in vitro* restimulation, whole PBMCs or dLN-derived cells were incubated for 24 h at 37°C, 5% CO₂ at a concentration of 1 x 10⁷/ml in 200 µl RPMI 1640 containing 10% FCS, 10 mM HEPES, L-glutamine, and penicillin/streptomycin in round-bottom 96-well plates. with or without 50 µg/ml crude *L. braziliensis* antigen [prepared as described previously (Teva et al., 2003)].

2.4. Immunolabeling and flow cytometry

After preparation, cells were analyzed for surface markers and intracytoplasmic staining for cytokines by flow cytometry using the optimized conditions previously described (Souza-Lemos et al., 2008). Briefly, cells were washed and stained for 30 min at 4°C with the optimal dilution of each antibody, followed by washes and fixation using 2% formaldehyde solution. Monoclonal antibodies (MAbs) to human CD3 (clone SP34), CD4 (clone L200), CD8 (clone SK1), CD25 (clone 2A3), and appropriate IgG1 and IgG2 isotype controls were from BD Pharmingen (San Diego, CA). All antibodies were fluorescein isothiocyanate (FITC)- or peridinin chlorophyll protein (PERCP)-conjugated. The cells were permeabilized with a 0.5% saponin solution (BD Pharmingen) and further stained with phycoerythrin (PE)-labelled anti-IFN-γ (clone 25723.11; BD Pharmingen), anti-TNF-α (clone 6401.1111; BD Pharmingen), or anti-IL-10 (clone JES3-9D7; Caltag Laboratories, San Francisco, CA) MAbs. Data were acquired on a FACSCalibur™ flow cytometer and analyzed with CellQuest Pro™ software (both Becton Dickinson San José, CA).

2.5. Statistical analysis

Statistical differences of the immune response in different compartments were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) with the aid of Graph Pad Prism 4 Software. The level of significance was set at a *P* value of <0.05.

3. Results and discussion

In the present study, all seven *L. braziliensis*-infected macaques developed localized chronic skin ulcerations (Fig. 1A), but primary lesions had disappeared from all animals by 16 to 24 weeks PI. A similar specific disease course was reported (Souza-Lemos et al., 2008) when macaques were challenged using the same parasite strain/dose and route of exposure. However, a more marked variation in the disease phenotype (ranging from self-healing CL to non-healing metastatic skin and mucosal lesions) was found when groups of macaques were infected with different strains of *L. braziliensis* (Teva et al., 2003). Accordingly, wide-ranging differences of clinical manifestations define *Leishmania* virulence (degree of pathogenicity) in human infections (Grimaldi and Tesh, 1993). This is likely linked to genetic variabilities found in natural populations of *L. braziliensis* from different geographic areas in Brazil (Cupolillo et al., 2003). These observations reinforce the notion that an interplay exists between the host immune system and parasite pathogenic capabilities in the clinical outcome of leishmanial infection.

A self-healing phenomenon in rhesus macaques is indicative of the development of an acquired immunity. Pathological findings confirm that this model mirrors the human host inflammatory granulomatous response involved in the control of *L. braziliensis* CL (Pirmez et al., 1993). In this study, infected macaques developed mature granulomas consisting of all cell types (Fig. 1B) found within human granulomas (Muse and Ramakrishnan, 2009). The tissue granulomas have long been considered host-protective structures formed to restrain the infection, kill and remove the microbial target, and repair any accompanying tissue injuries (Murray et al., 2005). Moreover, the chronic lymphadenitis (Fig. 1C-D) observed in all infected animals is a characteristic histological feature of the human disease (Barral et al., 1992). Evidence show that an almost immediate result of tissue inflammation is a transient decrease in LN egress and enhanced homing of T cells to LNs, which together contribute to the initial increase in LN cellularity; chemokines then guide activated T cell subsets out of the lymphoid compartment and into sites of inflammation or infection to deliver the 'newly minted' adaptative immune response (Bromley et al., 2008).

Most reports concerning characterization of leukocytes in active skin lesions of patients with *L. braziliensis* CL have shown that T cells constituted 37-75% of the inflammatory cells and the ration of CD4+ T cells to CD8+ T cells ranged from 0.8 to 1.8 (Barral et al., 1987; Lima et al., 1994). Moreover, differential expression of cytokines parallels the variation observed on the nature of cellular inflammatory infiltrate, with particular reference to the T cell phenotypes (Pirmez et al., 1993). Similarly, a marked heterogeneity characterized the systemic and local immune

responses in the chronic stage (at week 8 PI) of *L. braziliensis* infection in macaques. Antigen-activated CD3⁺ T cells account for 73.83 ± 10.20% of the stained PBMCs, with an expressive predominance of both CD4⁺ (40.48 ± 6.78%) and CD8⁺ (32.82 ± 9.75%) T-cell subsets over CD4⁺CD25⁺ (5.34 ± 3.12%) T regulatory (Treg) cells. Whereas CD3⁺ T-cells were recruited in approximately equal numbers into inflamed skin (51.43 ± 16.89%) and dLNs (49.10 ± 14.08%), cytokine-expressing T cell subsets were found more numerous in *ex vivo* granuloma-derived leukocytes as compared to those obtained following antigen-specific restimulation *in vitro* of freshly isolated cells from the skin-dLNs (Fig. 2). Consistent with our data, the differences in CD4⁺ T-cell functions observed between healer and non-healer strains of mice differed *ex vivo* and *in vitro* (Choi and Kropf, 2009).

It is thought that IL-10, which is produced by Treg cells, contributes directly to parasite persistence and concomitant immunity (Belkaid et al., 2002). The mechanism by which IL-10 allows parasite growth and survival is not fully defined, but it is likely due to its potent deactivating role of infected antigen presenting cells (APCs) that would become unresponsive to activation by IFN γ (Sojka et al., 2009). Interesting, IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ Treg cells responding to chronic *L. braziliensis* infection in macaques dominate over effector mechanisms producing IFN γ and TNF- α at the inflamed skin and dLNs (Fig. 3). Accordingly, skin-dLN-derived IL-10 mRNA⁺ cells have also been detected in both healing and progressive murine leishmaniasis (Choi and Kropf, 2009). These observations support the notion that there must be regulatory mechanisms whereby Treg

activity itself is attenuated to ensure that immune response successfully clears the infectious agent (Bromley et al., 2008).

In conclusion, the parallels found between humans and this primate species with regard to clinicopathological changes and specific immunological responses to *L. braziliensis* are not surprising given their close phylogenetic relationship (Grimaldi, 2008), thus providing an acceptable *in vivo* model for further studies with additional probes aiming to elucidate regulatory mechanisms by which granulomas successfully eliminate intracellular parasites. Defining the environmental cues and the processing events involved in targeting *in vivo* immune responses will provide new opportunities for therapeutic control of lymphocyte trafficking, with potential applications to enhancing the efficiency of vaccine-induced immunity and to suppressing the pathology of inflammatory diseases (Murray et al., 2005; Mackay, 2008). Further development of the *Leishmania*-macaque model should also prove useful to identify correlates of protection in future vaccine studies. Without such knowledge, vaccine design strategies will remain largely empirical, and further failures are likely.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants (470269/2006-5 and 420067/2005-1) from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

References

- Anderson, C.F, Oukka, M., Kuchroo, V.J., Sacks, D.L., 2007. CD4+CD25-Foxp3- Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 204, 285-297.
- Barbosa Reis, A., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. Systematic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87-95.
- Barral, A., Barral-Neto, M., Almeida, Ribeiro de Jesus, A., Grimaldi Jr., G., Netto, M.E., Santos, I., Bacellar, O., Carvalho, E.M., 1992. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 587-592.
- Barral, A., Jesus, A.R., Almeida, R.P., Carvalho, E.M., Barral-Neto, M., Costa, J.M., Badaró, R., Rocha, H., Johnson, W.D., 1987. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 9, 487-497.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L., 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.
- Bromley, S.K., Mempel, T.R., Luster, A.D. 2008. Orchestrating the orchestrators: Chemokines in control of T cell traffic. *Nature Immunol.* 9, 970-980.

Campanelli, A.P., Roselino, A.M., Cavassani, K.A., Pereira, M.S.F., Mortara, R.A., Brodskyn, C.I., Goncalves, H.S., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., Silva, J.S. 2006. CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J. Infect. Dis.* 193, 1313-1322.

Choi, B.-S., Kropf, P. 2009. Evaluation of T cell responses in healing and non-healing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization *ex vivo* and *in vitro*. *Parasite Immunol.* 31, 199-209.

Cupolillo, E., L. R. Brahim, C. B. Toaldo, M. P. Oliveira-Neto, M. E. F. de Brito, A. Falqueto, M. F. Naiff, and G. Grimaldi, Jr. 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different host and geographic areas in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41,3126-3132.

Grimaldi Jr., G. 2008. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* vaccine candidates – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 629-644.

Grimaldi Jr., G., Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 230-250.

Lima, H.C, Vasconcelos, A.W., David, J.R., Lerner, E.A. 1994. American cutaneous leishmaniasis: *in situ* characterization of the cellular immune response with time. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 743-747.

- Mackay, C.R. 2008. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat. Immunol.* 9, 988-999.
- Murray, H.W., Flanders, K.C., Donaldson, D.D., Sypeck, J.P., Gotwals, P.J., Liu, J., Ma, X. 2005. Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73, 3903-3911.
- Muse Davis, J. Ramakrishnan, L. 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136, 37-49.
- Nylen, S., Sacks, D. 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 28, 378-384.
- Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceição-Silva, F., Modlin, R.L. 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 91, 1390-1395.
- Sacks, D., Noben-Trauth, N. 2002. The immunology of susceptible and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 845-858.
- Sojka, D.K., Lazarski, C.A., Huang, Y.-H., Bromberg, I., Hughson, A., Fowell, D.J. 2009. Regulation of immunity at tissue sites of inflammation. *Immunol. Res.* DOI 10.1007/s12026-009-8105-x.
- Souza-Lemos, C., de-Campos, S.N., Teva, A., Côrte-Real, S., Fonseca, E.C., Porrozzzi, R., Grimaldi Jr.,G. 2008. Dynamics of immune granuloma formation in

a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. J. Pathol. 216, 375-386.

Teva, A., Porrozzzi, R., Cupolillo, E., Pirmez, C., Oliveira-Neto, M.P., Grimaldi Jr., G. 2003. *Leishmania (Viannia) braziliensis* induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. Parasitology 127, 437-447.

Vanloubbeeck, Y., Jones, D.E. 2004. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1026, 267-272.

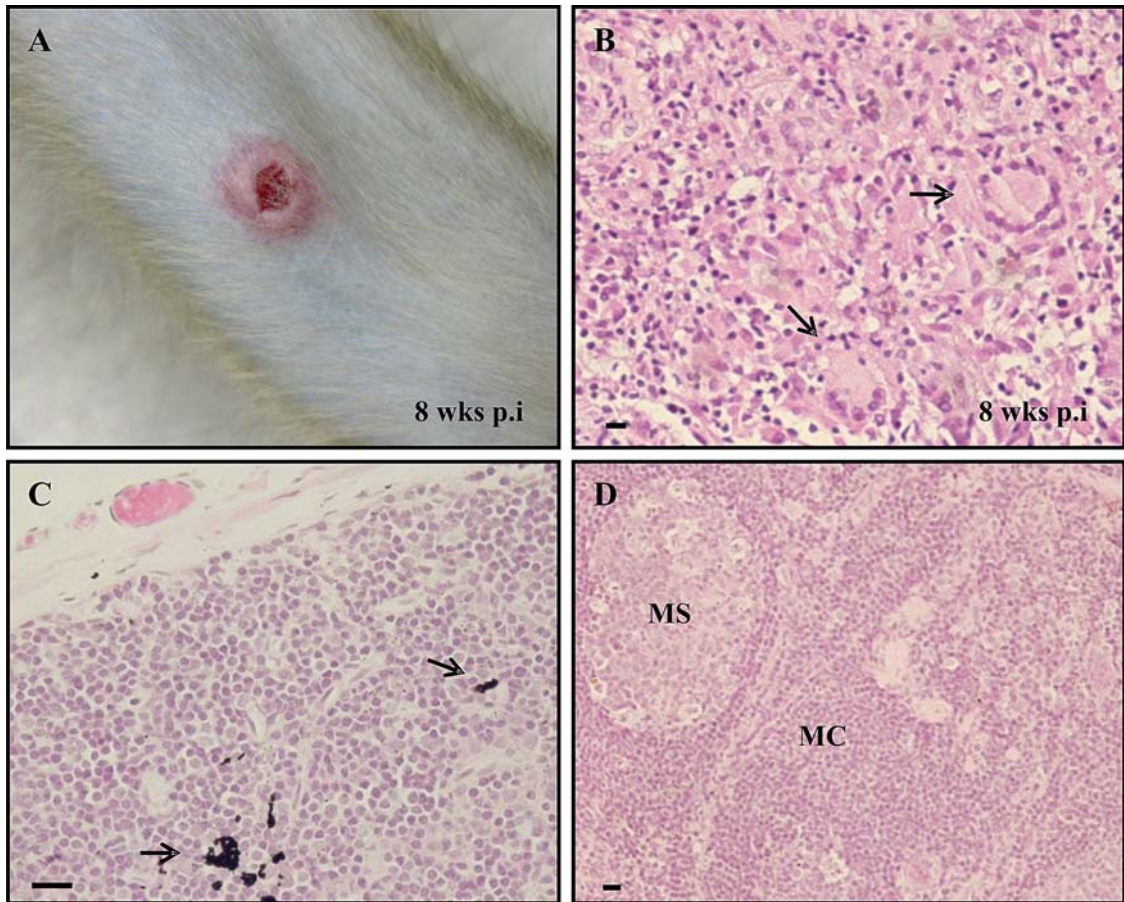


Figure 1. Characteristic clinicopathological changes in self-healing cutaneous infection with *L. braziliensis* in a macaque (Rh U43) at week 8 PI. Shown are [A] the ulcerated skin lesion; [B] a fragment section of that lesion, demonstrating histologically well-formed granulomas that consist of an aggregation of activated macrophages (epithelioid cells) and multiple Langhans-type giant cells (arrows) surrounded by lymphocytes and plasma cells; [C] a fragment section of a skin-dLN, demonstrating the chronic inflammatory infiltrate throughout the subcapsular sinus and cortical zones and hemosiderin deposits (arrows); and [D] a conspicuous hypertrophy and hyperplasia of medullar cords (MC) and sinus cells (MS). Sections were stained with haematoxylin and eosin; scale bar = 50 μ m.

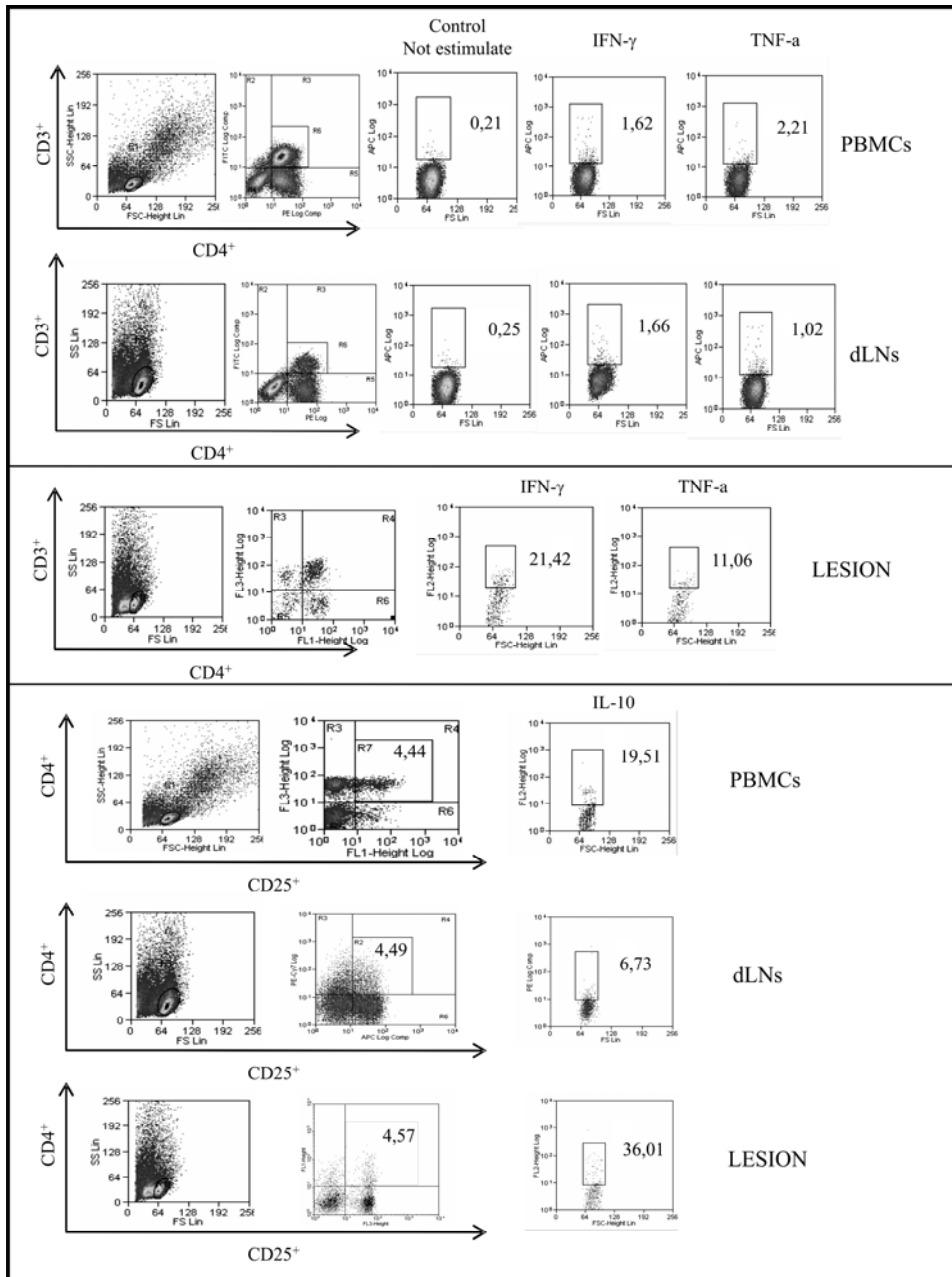


Figure. 2. Flow cytometry specific T-cell effector and regulatory functions *in vitro* (recall responses following re-stimulation of either PBMCs or dLN-derived cells) and *ex vivo* (skin lesion-derived leukocytes analysed directly, without further re-stimulation). The gates used to define T-cells are shown, and the numbers represent the percentage of cytokine-expressing T-cells from one *L. braziliensis*-infected macaque with active disease.

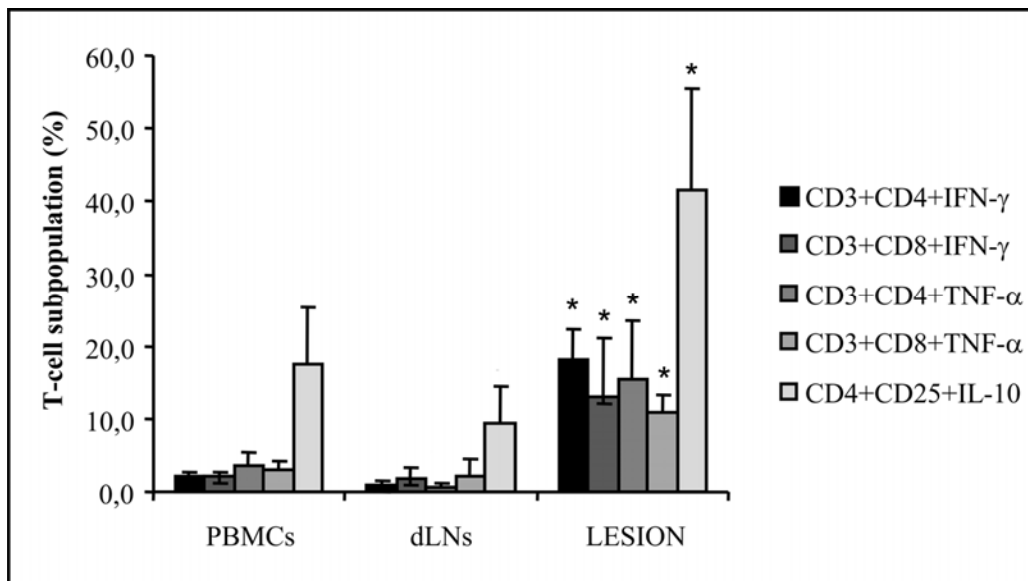


Figure 3. Distribution by compartment of cytokine-expressing T-cell subsets responding to *L. braziliensis* infection in rhesus macaques. Tissue samples were harvested from macaques at week 8 after infection. Flow cytometry of T-cell effector and regulatory functions *ex vivo* and *in vitro* were performed as described in the Materials and Methods section. The data are presented as the mean and SD of values obtained from seven animals. * indicates a significant difference ($p < 0.0001-0.05$) comparing the mean value of positive cells in a compartment to other compartments (PBMCs or dLNs).

3.3. In situ characterization of the granulomatous immune response with time in non-healing lesional skin of *Leishmania braziliensis*-infected macaques (*Macaca mulatta*)

Camila Souza-Lemos, Simone Neves de-Campos, Antonio Teva, Renato Porrozzi, and Gabriel Grimaldi Jr*

Neste trabalho tivemos como objetivo investigar os mecanismos de regulação da imunidade localizada em lesões dérmicas persistentes induzidas por *Leishmania braziliensis* no primata *Macaca mulatta*. A formação do granuloma verificada nos macacos é direcionada por diversos mediadores inflamatórios que são importantes para o desenvolvimento das células Th1 e da função de macrófagos efetores. A análise cinética da resposta inflamatória revelou variados marcadores fenotípicos de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, Foxp3 e HLA-DR. Agregados de células B CD20⁺ foram encontrados na lesão crônica, o qual serve como um substrato morfológico no desenvolvimento da resposta duradoura na infecção persistente. Nossos achados indicam que ambos os subgrupos de células regulatórias CD4 Foxp3⁺ e Foxp3⁻ expressando interleucina-10 previne a erradicação da *L. braziliensis* da pele inflamada, desse modo, suprimindo uma eventual resposta curativa em macacos com LC persistente. Estes resultados demonstram que o modelo macaco pode ser usado para elucidar os mecanismos moleculares pelos quais as células T regulatórias mediadoras da supressão da resposta imune permitem o crescimento dos granulomas em pacientes com leishmaniose. Estes mecanismos devem ser considerados no desenho de estratégias terapêuticas de controle dessa importante doença inflamatória.

Manuscript category: Immunopathology and Infectious Diseases

***In situ* characterization of the granulomatous immune response with time in nonhealing lesional skin of *Leishmania braziliensis*-infected macaques (*Macaca mulatta*)**

Camila Souza-Lemos, Simone Neves de-Campos, Antonio Teva, Renato Porrozi, and Gabriel Grimaldi Jr*

From the Leishmaniasis Research Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro (Brazil)

Number of text pages (18) and figures (5).

Running head: Uncontrolled inflammation in leishmaniasis

Supported by the National Council for Scientific and Technological Development of the Ministry of Science and Technology (Brazil), MCT/CNPq, grants numbers 420067/2005-1 and 470269/2006-5.

*Correspondence to: G Grimaldi Jr, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, IOC/Fiocruz, Pavilhão Leônidas Deane, Sala 509, Av. Brasil 4365 Av. Brasil 4365, 21045-090 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: grimaldi@ioc.fiocruz.br

We have recently introduced a macaque (*Macaca mulatta*) model of *Leishmania braziliensis*-mediated self-healing cutaneous leishmaniasis (CL) in which the T cell-mediated inflammatory response effectively promotes parasite clearance and granuloma resolution. Using an *L. braziliensis* strain that produces nonhealing dermal lesions in macaques, we examined the granulomatous immune response that led to uncontrolled growth of granulomas in the infected host. Serial tissue sections stained with cell type-specific antibodies revealed that the cellular infiltrates composing the granulomas at different stages of differentiation consisted of the same cell types found within human granulomata. We show that granuloma formation in macaques is orchestrated by diverse inflammatory mediators that are important for T helper type 1 (Th1) cell development and macrophage effector functions. Additionally, our findings indicate that both Foxp3⁺ and Foxp3⁻ CD4⁺ regulatory T cell (Treg) subsets expressing interleukin-10 may prevent clearance of *L. braziliensis* from the inflamed skin, thereby suppressing the healing response in macaques with persistent CL. These results demonstrate that the macaque model can be used to fully elucidate the molecular mechanisms by which Treg-mediated suppression of immune

responses allows the uncontrolled growth of granulomas in patients with leishmaniasis. These mechanisms must be considered in the design of strategies for therapeutic control of this important inflammatory disease.

Infections with the parasitic protozoa *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) or strain variants cause human illness associated with significant morbidity in many areas of tropical and subtropical America.¹ The clinical presentations of *L. braziliensis* cutaneous leishmaniasis (CL) are diverse, ranging from a localized cutaneous ulcer that spontaneously heals to chronic cutaneous or mucosal lesions that are nonhealing or slow to resolve in the absence of treatment. It is generally held that the host immune system and the pathogenic capability of the parasite both contribute to the clinical outcome of leishmanial infection.

At infection sites, *L. braziliensis* induces T helper type 1 (Th1)-mediated inflammation, leading to the formation of well-organized granulomas.² It has been shown that lesions of patients with localized CL contain high levels of not only proinflammatory chemokines and cytokines^{3,4} but also interleukin (IL)-10.⁵ Recent findings show that 'natural' IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells (Tregs) obtained from chronic *L. braziliensis* CL lesions exhibit powerful anti-proliferative activity *in vitro*.⁶ In *L. major*-resistant C57BL/6 mice, CCR5-dependent migration of antigen-specific IL-10-producing Foxp3⁺ Tregs into the inflamed skin favors chronic parasite persistence and immune pathology.⁷ It has also been reported

that a CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Th1 subset appears to be the dominant source of IL-10-mediated immune suppression in chronic forms of leishmanial disease in mice^{8,9} and humans.¹⁰ Despite these findings, the way in which IL-10 functions in a Th1-polarized setting to prevent clinical cure in *L. braziliensis*-infected subjects remains unclear.¹¹⁻¹³

The local cross-talk between *L. braziliensis* and the host immune system has not been thoroughly examined in patients^{2,14-17} because such studies would entail repeated biopsies. The use of mouse models to address this issue is limited because mice are naturally resistant to infection with this species. In contrast, we have previously shown that Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) experimentally infected with *L. braziliensis* develop a granulomatous immune response similar to that observed in humans that can either effectively promote parasite clearance with little pathology or induce uncontrolled Th1-polarized inflammation.^{18,19} Because of the scarcity of data obtained from human patients infected with *L. braziliensis*, the aim of the present study was to gain insights into the functional and structural properties of the cellular infiltrates composing the immune granulomas developed in a macaque model of *L. braziliensis* nonhealing CL. Our findings clearly show that infection with virulent *L. braziliensis* in this primate system drives local IL-10 production by both CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Tregs, suggesting that these cells are actively involved in granuloma formation and maintenance.

Materials and methods

Animals and Infection Procedure

Five outbred²⁰ young adult male Rhesus macaques were obtained from the primate breeding facility at the Oswaldo Cruz (CECAL/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) and were subsequently maintained in a conventional animal facility. The institutional animal ethics committee (FIOCRUZ-CEUA) approved all experiments. The virulent *L. braziliensis* strain (MHOM/BR/2000/LTCP-13396) used in this study was isolated from a patient with disseminated CL (provided by E.M. Carvalho, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil). A standardized inoculum of 10⁷ stationary phase promastigotes was injected intradermally into the left forearm of each monkey. The infection was allowed to proceed until the macaques displayed advanced disease. Skin lesion development was assessed each week by measuring the diameter of the lesion as previously described.¹⁸

Pathological Analyses

Biopsies obtained from skin lesions after parasite challenge were fixed in 10% buffered formalin, stained with hematoxylin and eosin (H&E) and studied by routine light microscopy. The local immune response underlying granuloma development was systematically analyzed by immunohistochemical staining with the following anti-human antibodies: CD3 (polyclonal, diluted 1:600; Dako, Glostrup, Denmark), CD4 (1F6, 1:40; NovoCastra, Newcastle upon Tyne, UK), CD8 (1A5, 1:20; NovoCastra), Foxp3 (PCH101, 1:50; eBioscience, San Diego, CA), CD20 (L26, 1:300; Dako), CD68 (KP1, 1:500; Dako), HLA-DR (LN-3, 1:200;

NovoCastra), CCL2 (polyclonal, 1:100; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), and CXCL-10 (polyclonal, 1:500; R&D Systems Inc.). Sections were viewed and images were captured using a light microscope (Nikon E400) equipped with a color video camera (Sony DXC-151A CCD, Tokyo, Japan) connected to a 500 MHz Pentium-III (Intel Corp., Austin, TX) personal computer by a 4 MB PCI All-in-Wonder Pro Image card (ATI Technologies, Santa Clara, CA). Cell populations in each biopsy were quantified by automatic counting of immunostained cells using Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) as described elsewhere.¹⁹ Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL)-positive apoptotic cells were detected in tissue sections with the fluorescein *In situ* Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Detection of Cytokine-expressing T Cell Subsets in Skin Lesions

We used flow cytometry to directly characterize *ex vivo* granuloma-derived leukocytes. Inflammatory cells obtained from macaque skin lesions at different time points following infection were stained with combinations of the following fluorochrome-labeled anti-human antibodies: CD3-FITC or -PECy5 (SP34), CD4-PECy5 (L200), CD8-PECy5 (SK1), CD20-FITC (2H7), CD25-APC (2A3), CD80-APC (L307.4), CD195-APC (3A9), IFN- γ -FITC (25723.11), TNF- α -FITC (6401.1111) (BD Biosciences, San Jose, CA) and IL-10-PE (JES3-9D7) (Caltag, Burlingame, CA). The isotype controls used were IgG1 and IgG2 (BD Biosciences). After staining cell surface markers, cells were permeabilized, and intracytoplasmic markers were stained. A FACSCalibur flow cytometer (BD

Biosciences) and Cyan and Summit software (DAKO) were used to measure fluorescence of lymphocytes gated based on their forward (linear scale) and side (log scale) light scatter.

Statistical Analysis

Quantitative data were analyzed using the Student's *t*-test. Significance of the differences between means at different timepoints was analyzed using a one-way ANOVA (confidence level of 99%) with the Tukey-Kramer post-test using GraphPad Prism version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Means were defined as significantly different when $P < 0.05$.

Results

Different Clinical Outcomes in L. braziliensis-infected Macaques

We previously reported on an isolate of *L. braziliensis* (strain MHOM/BR/1997/SIS) that produces self-healing skin lesions after high dose (10^7 promastigotes) intradermal inoculation in outbred Rhesus macaques.¹⁹ In the present study, all of the monkeys challenged with a highly pathogenic *L. braziliensis* strain using the same dose and route of exposure developed chronic granulomatous lesions of varying severity. As shown in Figure 1, the initial growth of the nodular lesion (A) progressed rapidly; nodule sizes reached 70 to 190 mm² in area and peaked three weeks after infection. All lesions ulcerated three weeks after infection and persisted until covered by a crust (C). All infected macaques subsequently displayed persistent long-standing plaque-like infiltrative satellite

lesions peripheral to the primary nodule (E and G). These observations reinforce the hypothesis that the disease phenotype may be related to differential parasite gene expression.²¹

Classic Granulomatous Inflammation Arises in Macaques at the Infection Site

We have previously described the different stages of granuloma development in an *L. braziliensis*-macaque model of self-healing CL.¹⁹ As shown in Figure 1 (panels B, D, F, and H), macaques in this study also developed and maintained lesional granulomas remarkably similar to those seen in humans infected with this pathogen.² Serial tissue sections stained with cell type-specific antibodies (Figure 2) were analyzed to identify the cellular infiltrates composing and surrounding the granulomas. Abundant CD68⁺ macrophages (A), activated HLA-DR⁺ cells (B), CD3⁺ (C), CD4⁺ (D), CD8⁺ (E), and Foxp3⁺ (F) T cells were found in small foci or dispersed throughout the cellular portions of the granulomatous lesions, whereas CD20⁺ dense B cell aggregates (G) forming lymphoid-like structures were identified in late-stage granulomas.

Kinetic analyses of the granulomatous immune response performed 2-52 weeks post-infection revealed marked variation in the number of cells expressing CD3, CD4, CD8, CD20, or HLA-DR (Figures 3A and B). The frequency of CD20⁺ B cells in skin lesions increased during the chronic phase of disease (Figure 3A), but the frequency of those expressing the co-stimulatory molecule CD80, which provides the second signal to activate cognate T cells, decreased with time (Figure 4A). The numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells remained fixed throughout

most of the study but decreased during later stages of infection (Figure 3B). Notably, CD4:CD8 T cell ratios favored CD8⁺ T cells at all time points after infection (CD4:CD8 mean ratio, 0.62; range, 0.17-0.92). This finding is consistent with the hypothesis that specific CD8⁺ T cells capable of releasing IFN- γ contribute to protective immunity in human²² and murine CL.²³

Chemokines and cytokines organize and direct infiltrating leukocytes to sites of infection, and these molecules likely play crucial roles in granuloma formation and maintenance. Chronic CL lesions in humans contain high levels of monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1], also known as CC chemokine ligand 2 [CCL2], and IFN- γ -inducible CXCR3 ligands such as monokine induced by IFN- γ [Mig]/CXCL9 and IFN- γ -inducible protein with a size of 10 kDa [IP-10]/CXCL-10, whereas samples from patients with chronic diffuse CL predominantly express macrophage inflammatory protein 1 α [MIP-1 α]/CCL3, suggesting that different chemokine patterns may be linked to the unique disease phenotypes observed in human leishmaniasis.⁴ Here we demonstrated the presence of CCL2⁺ cells (Figure 2H) and CXCL-10⁺ cells (Figure 2I) in macaque granulomata during different stages of differentiation by immunohistochemical staining of tissue sections. The expression levels of both chemokines were significantly reduced ($P < 0.05$) with time (Figure 3C), but the number of CXCL-10⁺ cells was significantly ($P < 0.05-0.001$) greater than that of CCL2⁺ cells at all time points after infection.

Apoptosis (programmed cell death) of mycobacterium-containing macrophages appears to be a driving factor in granuloma expansion;²⁴ therefore, we sought to determine the degree of apoptosis in non-healing granulomatous

lesions of *L. braziliensis*-infected macaques. We used the TUNEL staining method to identify individual apoptotic cells, which were labeled by the terminal transferase-mediated addition of fluorescein-dUTP at strand breaks (Figure 2J). The frequency and distribution of apoptotic cells in macaque granulomatous lesions changed uniformly during infection (Figure 3C), suggesting that cell death continuously occurs during leishmanial infection.

Distinct Functional Lymphocyte Subsets Accumulate in Chronic Granulomatous Lesions

Flow cytometry analyses of skin lesion-derived leukocytes harvested from *L. braziliensis*-infected macaques during granuloma development revealed continuous migration of both CD20⁺CD80⁺ B cells and CCR5/CD195 receptor-bearing CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets into the inflamed tissue (Figure 4A). We next examined the cytokine producing capacity of distinct T cell subsets in non-healing lesions (Figures 4B and 5). Except for IL-10-producing CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells, the number of cytokine-producing T cells remained fixed during the time period of our study. We also found that chronic lesions present 24 weeks post-infection contained significantly ($P < 0.01$) more IL-10-producing CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (58.4 ± 18.7%) than CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells expressing either IL-10 (20.5 ± 11.1%) or IFN- γ (10.1 ± 5.6%). Moreover, 24 weeks after infection, the IL-10 producing capacity of the CD4⁺Foxp3⁺ T cells was greater than that of IFN- γ /IL-10-producing CD4⁺Foxp3⁻ T cells (Figure 5). These results are consistent with observations in mice⁹ and in humans¹⁰ that IL-10 is

produced by both Foxp3⁺ and Foxp3⁻ CD4⁺ T cells in response to *Leishmania* infection.

Discussion

Granulomas, organized aggregates of immune cells, are generally considered to be the result of chronic antigenic stimulation. This complex process requires adaptive immunity and is critical in restraining the infection, clearing the microbial target, and repairing any accompanying tissue injuries; however, the overall antimicrobial efficacy of the granulomatous inflammatory response appears to be variable and dependent on the homeostatic balance between host and pathogen.²⁴

Despite extensive evaluation of granulomas in rodent models of *L. donovani* infection,²⁵ little is known about the functional dynamics underlying the formation, persistence, and resolution of *Leishmania*-induced granulomas in humans. Through the use of a macaque model of progressive *L. braziliensis*-mediated disease, we have examined the temporal sequence of infiltrating leukocytes during the course of infection. The results of these experiments are consistent with our previous findings^{18,19} showing that cellular components of macaque granulomas are indeed similar to the inflammatory cells observed in human granulomas.^{26,27} Strikingly, we observed a high rate of apoptotic cell death in the granulomatous lesions of *L. braziliensis*-infected macaques. Macrophage apoptosis has been noted in human tuberculosis granulomas and likely plays a role in bacterial expansion.²⁴

The development of a granuloma likely depends on the inflammatory cytokine- and chemokine-mediated recruitment of receptor-bearing cells toward the site of infection.²⁸ Our *in situ* detection of diverse inflammatory mediators, including MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL-10, IFN- γ , and TNF- α , and abundant CCR5⁺ cells provides evidence that continued leukocyte recruitment into inflamed skin affects overall granuloma size and structure. Comparable results were obtained in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*.²⁹ In humans, CCL2 promotes macrophage migration, and CXCL10 induces migration of activated T cells (preferentially memory T cells) to tissue granulomas,³⁰ whereas CCL-3 and CCL-4 are chemoattractants for CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, respectively.³¹ Moreover, local environmental signals such as IFN- γ and TNF- α influence chemokine gradients, which facilitate the temporal and spatial coordination of antigen presenting cells and activated T cells in granulomas.³⁰ Further development of the macaque model of *L. braziliensis* infection should prove useful in defining the importance of chemokine receptor-ligand interactions in controlling T cell trafficking both in the lymphoid compartment and in peripheral tissue. These interactions must be considered in therapeutic strategies designed to suppress the maintenance of inflammation.

Classically, B cells and specific antibodies are thought to offer no significant contribution to protection against leishmanial parasites;¹ however, B lymphocytes can play an important role in shaping host defense against intracellular pathogens through a variety of interactions with the cellular immune response (including the presentation of antigens in the context of class II MHC to T cells).³² It has been

demonstrated that CD4⁺ Th1 cell-mediated granulomatous pathology in murine leishmaniasis is downregulated through a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling.³³ Here we observed that the frequency of CD20⁺ cells in *L. braziliensis*-induced granulomatous lesions in macaques increased with time. Moreover, dense CD20⁺ B cell aggregates were also found in chronic lesions (Figure 2G). These B cell follicle-like structures seen within the ectopic infiltrates that can accompany chronic inflammation likely serve as a morphological substrate for the orchestration of the enduring host response to persistent infection.²⁶

The effector functions of CD4⁺ T lymphocytes are generally thought to be carried out by distinct populations of Tregs and their soluble products. In fact, several studies in C57BL/6 mice have shown that naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs accumulate at the site of *L. major* infection and function in an IL-10-dependent manner to prevent sterile cure.⁷ However, recent studies have shown that IL-10-producing CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Th1 cells activated early in a strong inflammatory setting as a mechanism of feedback control are the principal mediators of IL-10-dependent immune suppression in chronic CL.^{8,9} Accordingly, we show that fully functional CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells accumulate within chronic granulomatous lesions of *L. braziliensis*-infected macaques. These results thus reinforce the notion that both of these regulatory T cell subsets can cause uncontrolled Th1 cell-mediated granulomatous pathology in chronic CL. Collectively, these findings lead us to propose the *L. braziliensis* macaque model for further investigation of the molecular mechanisms of the Treg-

mediated suppression of immune responses that initiates the disease and for development of new treatments for this infection.

Acknowledgements

We thank Antonio da Mota Marinho and Felipe de Carvalho Resende for expert technical assistance and the staff in the Fiocruz Animal Care Facility for daily care of the animals.

References

1. Grimaldi JrG, Tesh RB: Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993, 6:230-250
2. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL: Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993, 91:1390-1395
3. Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A: Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994, 62:837-842
4. Ritter U, Moll H, Laskay T, Bröcker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R: Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996, 173:699-709
5. Louzir H, Melby PC, Bem Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Bem Ismail R, Dellagi K: Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* 1998, 177:1687-1695

6. Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodsky CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS: CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 2006, 193:1313-1322
7. Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA: CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med* 2006, 203:2451-2460
8. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks DL. CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007, 204:285-297
9. Nagase H, Jones KM, Anderson CF, Noben-Trauth N: Despite increased CD4⁺Foxp3⁺ cells within the infection site, BALB/c IL-4 receptor-deficient mice reveal CD4⁺Foxp3-negative T cells as a source of IL-10 in *Leishmania major* susceptibility. *J Immunol* 2007, 179: 2435-2444
10. Nylén S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, Sacks D: Splenic accumulation of IL10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 2007, 204:805-817
11. Antonelli LRV, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KCL, Guimarães LH, Bacellar O, Gollob KJ: Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4⁻ CD8⁻) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2006, 74:6317-6323

12. Gaze ST, Dutra WO, Lessa H, Guimarães LH, de Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ: Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol* 2006, 63:70-78
13. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR: Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 2007, 29:251-258
14. Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR, Gallinoto ME, Castes M, Rondon AJ, Rea TH, Convit J: *In situ* characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1985, 60:241-248
15. Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Neto M, Costa JM, Badaró R, Rocha H, Johnson WD: Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1987, 9:487-497
16. Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA: American cutaneous leishmaniasis: *in situ* characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 50:743-747
17. Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA Jr, Barral-Neto M, Barral A.: B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, 97:979-983
18. Teva A, Porrozzì R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi Jr G. *Leishmania (Viannia) braziliensis* induced chronic granulomatous cutaneous

- lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology* 2003, 127:437-447
19. Souza-Lemos C, de-Campos SN, Teva A, Côrte-Real S, Fonseca EC, Porrozzi R, Grimaldi JrG: Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *J Pathol* 2008, 216:375-386
20. Andrade MCR, Penedo MCT, Ward T, Silva VF, Bertolini LR, Roberts JA, Leite JP, Cabello PH: Determination of genetic status in a closed colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Primates* 2004, 45:183-186
21. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M: Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007, 39:839-847
22. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto M, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG: T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 9:251-256
23. Vanloubbeeck Y, Jones DE: The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1026:267-272

24. Davis JM, Ramakrishnan L: The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 2009, 136:37-49
25. Murray HW: Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 2001, 82:249-267
26. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jorg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SHE: Human tuberculous granulomas induces peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 2004, 204:217-228
27. Taflin C, Miyara M, Nochy D, Valeyre D, Naccache J-M, Altare F, Salek-Peyron P, Badoual C, Bruneval P, Haroche J, Mathian A, Amoura Z, Hill G, Gorochov G: Foxp3⁺ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. *Am J Pathol* 2009, 174:497-508
28. D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F: Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:1266-1275
29. Fuller CL, Flynn JL, Reinhart TA: *In situ* study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003, 71:7023-7034
30. Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton J, Krahenbuhl L, Adams LB: Lymphotoxin- α and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol* 2009, 174:1379-1389

31. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ: Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993, 260:355-358
32. Maglione PJ, Chan J: How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 2009, 39:676-686
33. Jankovic D, Cheever AW, Kullberg MC, Wynn TA, Yap G, Caspar P, Lewis FA, Clynes R, Ravetch JV, Sher A: CD4⁺ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signalling. *J Exp Med* 1998, 187:619-629

Figure Legends

Figure 1. Progression of cutaneous leishmaniasis in macaques experimentally infected with a highly pathogenic *L. braziliensis* strain (MHOM/BR/2000/LTCP-13396). Skin lesions were measured as previously described.¹⁹ The pictures show the following sequential clinicopathological changes in the persistent granulomatous lesions observed in a macaque (Rh F13) after infection: (A) the initial nodular ulcerating lesion; (C) the ulcerated skin lesion; and (E and G) the persistent plaque-like infiltrating satellite lesions peripheral to the primary nodule. H&E-stained tissue sections of the developing granulomatous lesions (panels B, D, F, and H) provide an overview of the structural properties of granulomata identified during the course of infection. All five animals examined in this study developed granulomas composed of concentric layers of macrophages, epithelioid cells, Langhans-type multinucleated giant cells (arrows), and lymphocytes (bar, 50 μ m).

Figure 2. Cell populations in nonhealing cutaneous leishmaniasis in *L. braziliensis*-infected macaques. Immunoperoxidase staining of a granulomatous lesion 52 weeks post-infection using specific antibodies to human CD68 (A), HLA-DR (B), CD3 (C), CD4 (D), CD8 (E), Foxp3 (F), CD20 (G), CCL2 (H), and CXCL10 (I). A parallel analysis with isotype control antibodies yielded no immunohistochemical signal (insets in panels A and B). Diaminobenzidine (the chromogen) with hematoxylin counterstain. Immunostaining images are shown at two different magnifications, x 60 (E and G) and x 40 (all other panels). Also

shown are fluorescein-stained apoptotic cells visualized in situ by fluorescence microscopy (J). TUNEL was performed with the Roche Mannheim Kit.

Figure 3. Kinetics of leukocyte infiltration into *L. braziliensis*-induced granulomatous lesions in macaques. Paraffin- (A, C) and cryostat-embedded (B) sections obtained from biopsies of lesions were stained with monoclonal antibodies and the cells in the inflammatory infiltrate were counted as described in Materials and Methods. All values are presented as the mean \pm standard deviation obtained from five monkeys. *Significant differences ($P < 0.01-0.05$) between mean values of positive cells at different timepoints.

Figure 4. Relative numbers of different types of cells measured by flow cytometry in *ex vivo* skin lesion-derived leukocytes from five *L. braziliensis*-infected macaques. Tissue samples were harvested at different stages of granulomatous lesion development, and cells were isolated as described elsewhere.¹⁹ Values are presented as mean \pm SD in panels A and B.

Figure 5. Distinct functional subsets of effector and regulatory T cells accumulate within *L. braziliensis*-induced nonhealing skin lesions in macaques. The histograms in panels A and B illustrate the cytokine-producing capacity of gated T cell subsets recovered from a representative 24-week granulomatous lesion. Lesion cells were stimulated in vitro with PMA and ionomycin for 4 h before measurement of intracellular cytokine production. The gates used to define T cells are shown, and quadrant values represent the percentage of cytokine-expressing T cells.

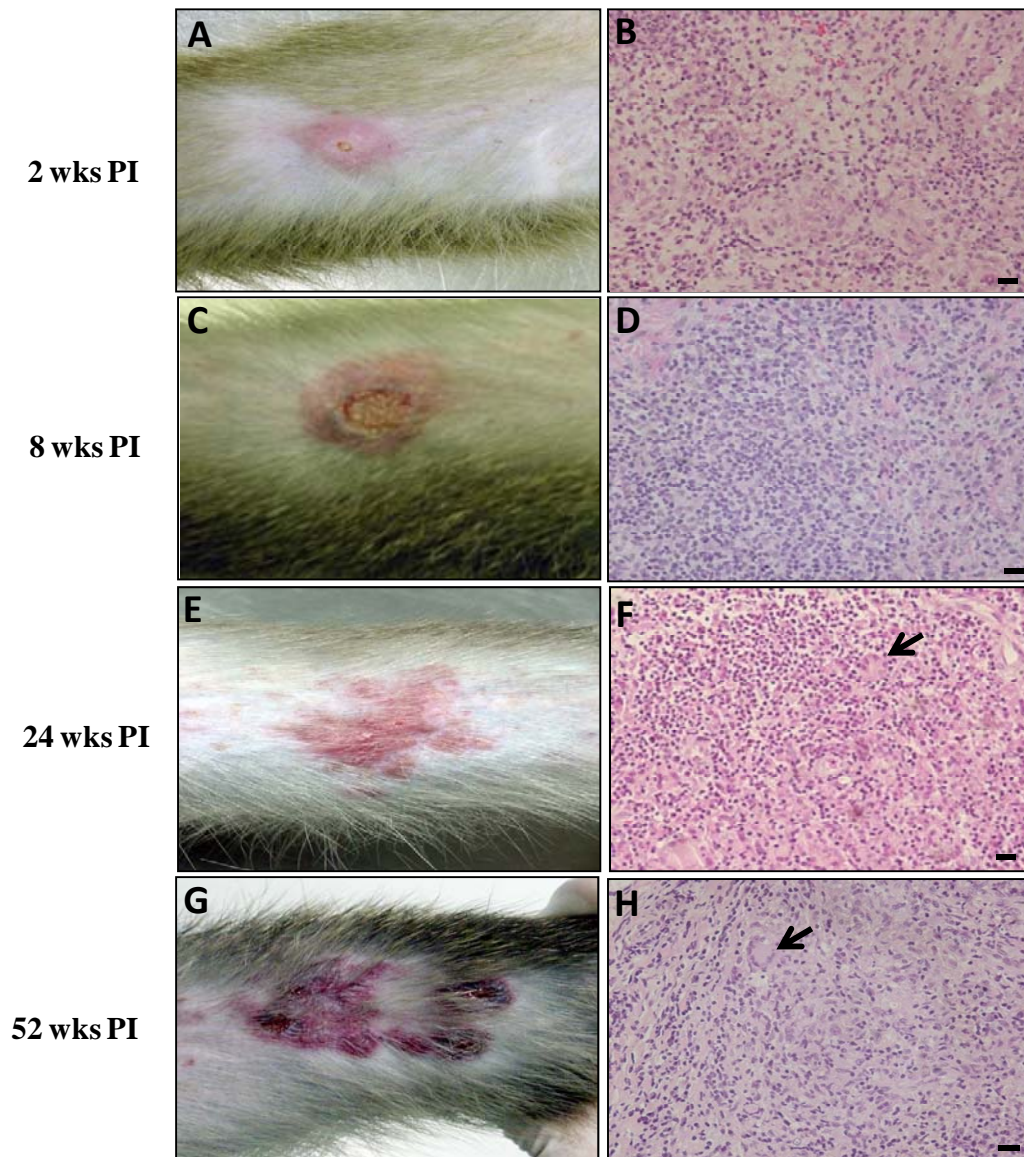
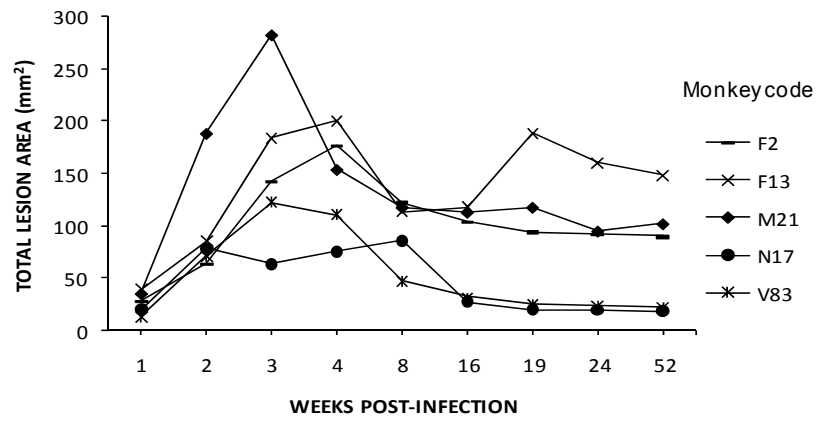


Figure 1

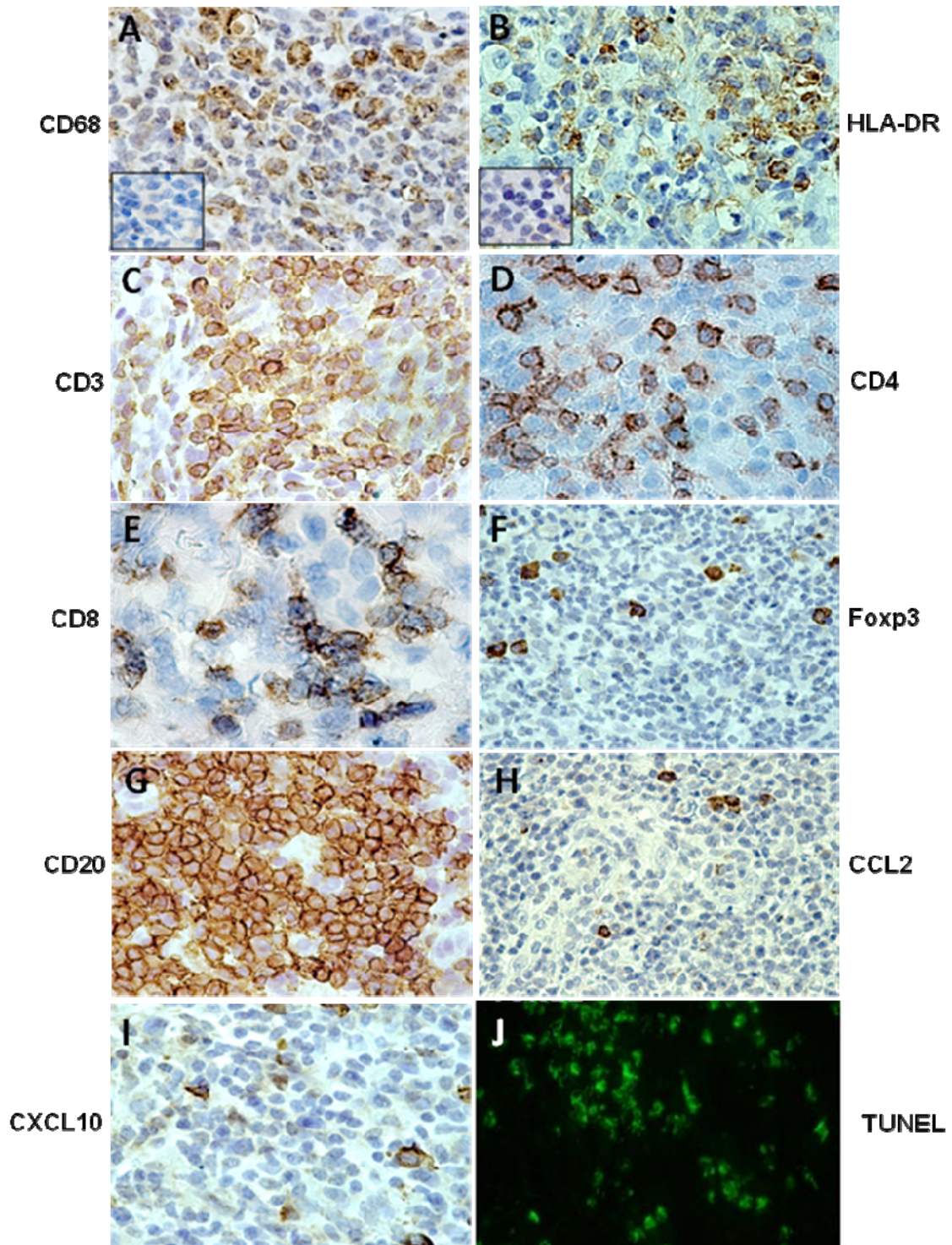


Figure 2

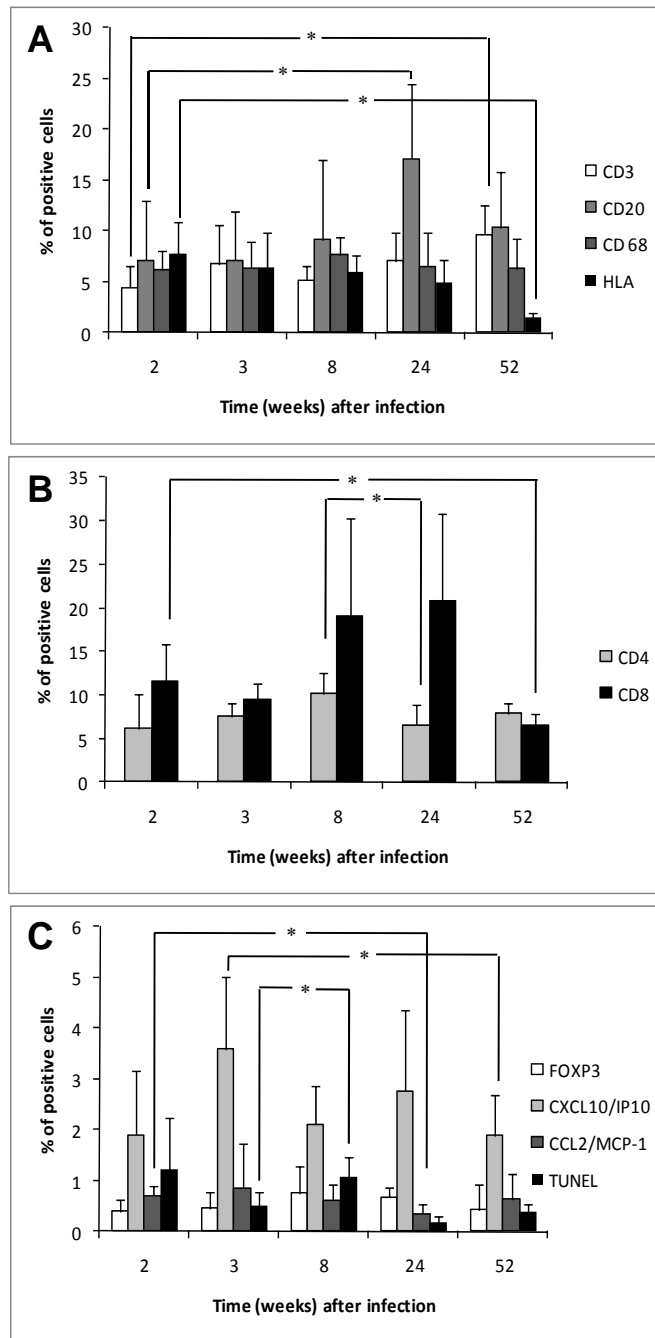


Figure 3

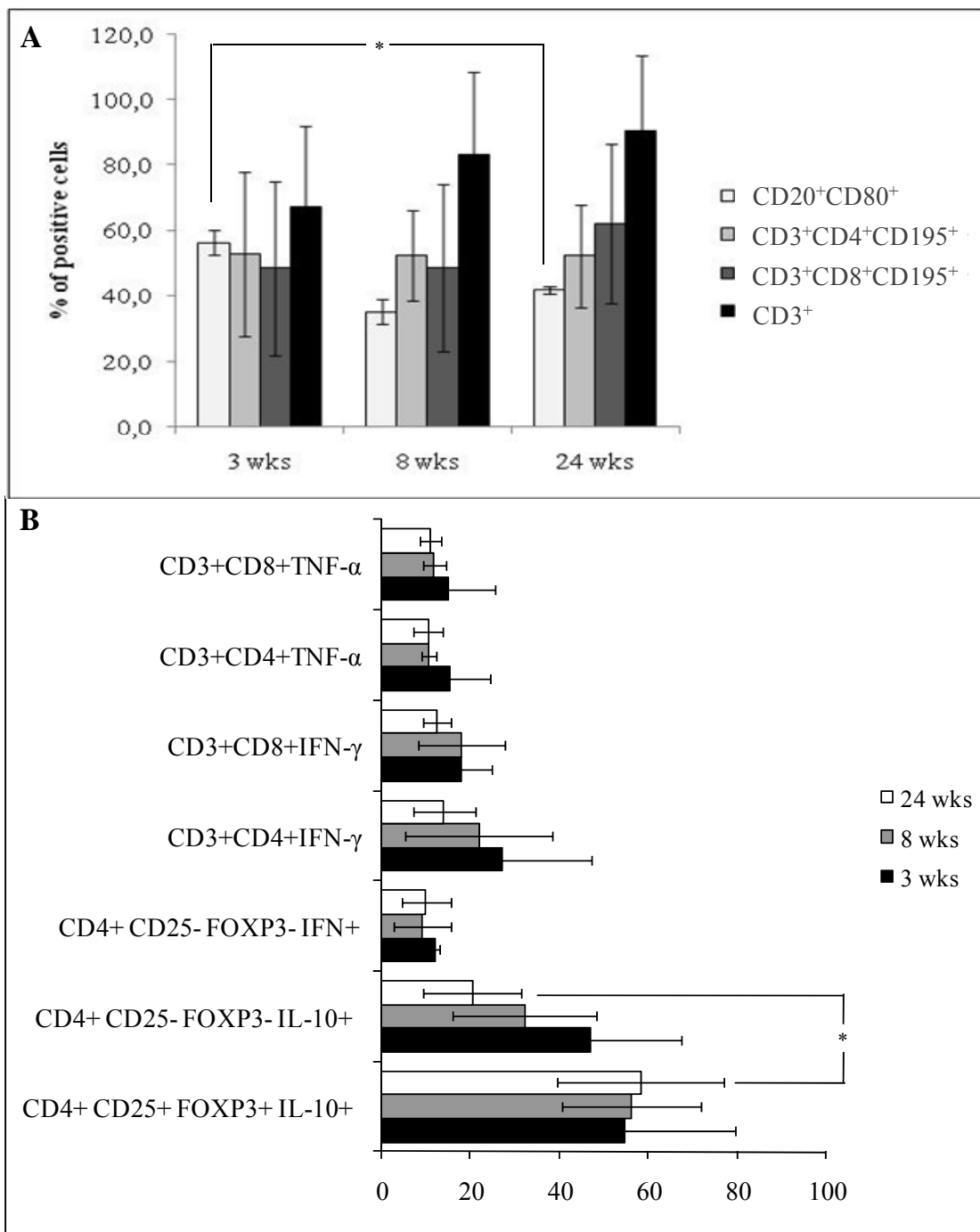


Figure 4

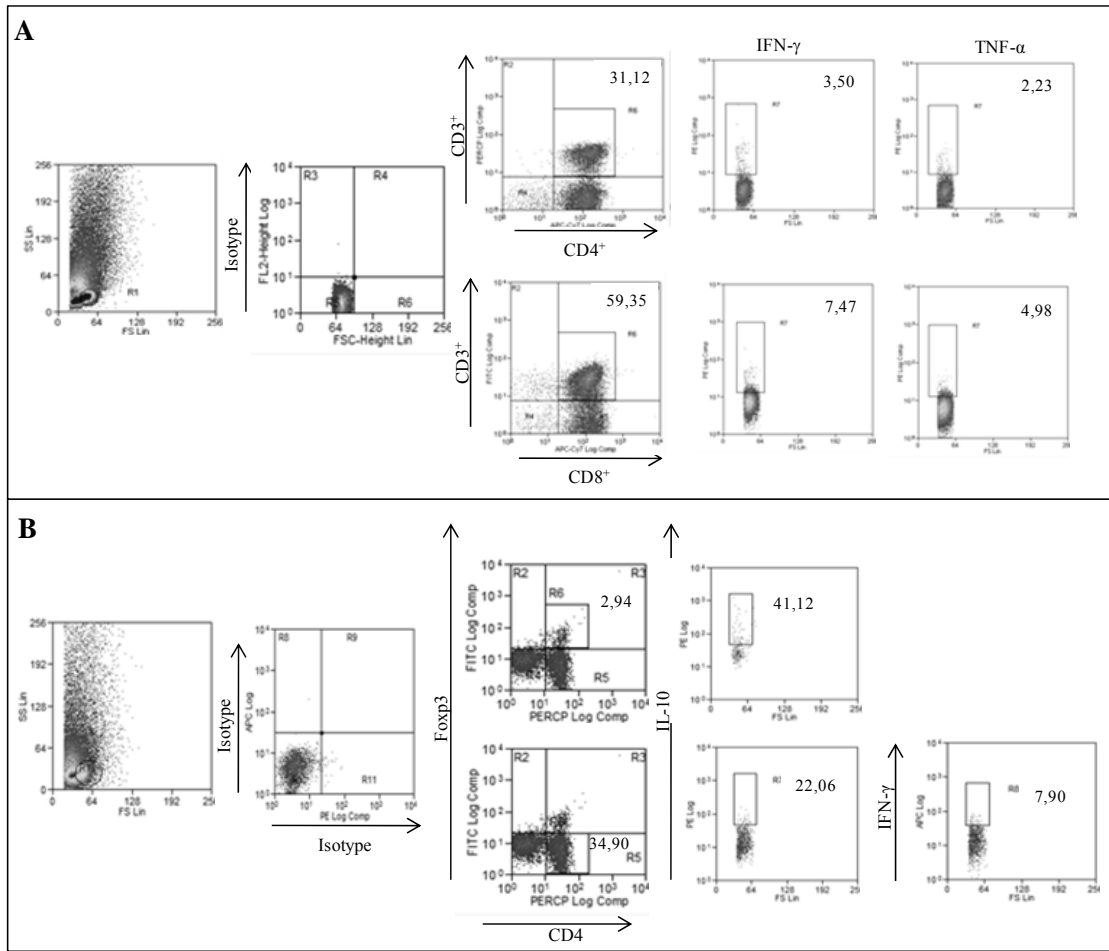


Figure 5

4. DISCUSSÃO

A infecção experimental pela *L. braziliensis* em *M. mulatta* produz uma série de reações complexas, relacionadas com a natureza do agente infectante e as respostas imunes do hospedeiro. No primeiro trabalho nossos resultados mostraram que as lesões dérmicas ulcerativas regrediram espontaneamente, evoluindo para a cicatrização e cura dentro de 16-24 semanas PI nos animais infectados com cepa MHOM/BR/97/SIS. Em contraste, no terceiro experimento, a marcha da infecção com a cepa MHOM/BR/2000/LTCP-13396 foi mais insidiosa e a doença mais grave por causar lesões primárias e secundárias, que persistiram até 52 semanas PI. Em estudo anterior (Teva *et al.* 2003) foi demonstrado que grupos de macacos rhesus infectados com diferentes cepas de *L. braziliensis*, mostrou a influência de determinantes intra-específicos do parasita na expressão clínica diferenciada da doença. Diferenças na manifestação clínica em humanos também retrata a virulência da *Leishmania* (grau de patogenicidade) nas infecções (Grimaldi & Tesh 1993). Considerando que a expressão das infecções por leishmania depende tanto da natureza do agente infectante como da resposta imune do hospedeiro infectado nossos experimentos tentam entender como a resposta imune influencia as diferentes manifestações clínicas da doença.

Na primeira parte dos estudos em questão, onde lesões auto-resolutivas foram analisadas, verificamos que o tipo de leucócito que migra para o sítio da infecção varia de acordo com o estágio inflamatório. Nossos dados comprovam a participação de células da imunidade inata nas primeiras 20 horas PI com influxo predominante de neutrófilos ativados (muitos apresentando sinais de fagocitose e destruição parasitária). Estes neutrófilos são importantes no processo de imunoregulação, através da secreção de citocinas (IL-1, IL-12, IFN- γ , TNF- α) e de quimiocinas que servem de quimioatraentes para células T_H1 (Chen *et al.* 2005). Nesta fase, grande parte dos parasitas é destruída, seja extracelularmente (Dominguez *et al.* 2003), seja no interior dos fagócitos ativados. Esses neutrófilos rapidamente dão lugar aos monócitos de exsudação que constituem o tipo celular predominante dentro de 48-72 horas. Os monócitos de exsudação sofrem rapidamente transformação em macrófagos apresentando aumento de volume celular e produção elevada de enzimas lisossomais, resultando então em fagocitose e atividade microbicida mais intensa.

Nesta primeira parte do estudo, a caracterização *in situ* pela imunohistoquímica, nas lesões dérmicas auto-resolutivas dos primatas demonstrou que populações celulares distintas (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD68⁺ e HLA-DR⁺) variaram durante a infecção, sugerindo que os componentes da resposta imune local trabalhem em conjunto. As freqüências de células CD8 imunopositivas foi maior nas lesões em fase de cicatrização (8 semanas) do que nas lesões de fase ativa. Este fato foi consistente com a hipótese de que linfócitos T CD8⁺ específicos são capazes de produzirem IFN- γ contribuindo para a imunidade protetora como observado em humanos (Stanley *et al.* 2007). No caso da expressão de moléculas de classe II (HLA-DR⁺), os valores observados em lesões ativas (2-8 semanas PI) não foram significativamente maiores ($P > 0,05$) comparado aos de lesões em fase resolutiva (16 semanas PI). Dados esses contraditórios aos achados em rhesus infectados com *L. (L.) amazonensis*, onde as freqüências de células HLA-DR⁺ são menores na fase resolutiva das lesões dérmicas (Amaral *et al.* 2000). Digno de registro foi o maior número de linfócitos CD20⁺ (9,7%) em relação aos linfócitos CD3⁺ (5,1%) ocorrido na fase de cura (16^a semana PI) das lesões. Resultados experimentais indicam que pacientes com a forma auto-resolutiva da doença apresenta um maior número de células B do que pacientes com a forma disseminada (Vieira *et al.* 2002). Célula B antígeno específica produtora de anticorpos estão envolvidas também na ativação celular via DCs (Von Stebut 2007). Este modelo também indica que IFN- γ e/ou TNF- α produzidos por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes nas lesões são igualmente importantes na promoção do processo de eliminação parasitária e cicatrização tissular na leishmaniose cutânea por *Leishmania (V.) braziliensis*. Por fim, o acúmulo de IL-10 produzida por células T CD4⁺CD25⁺ nas lesões auto-resolutivas sugere que estas células desativam sinais que levariam à involução do granuloma no hospedeiro infectado. Estes primeiros achados nos levaram a propor o modelo macaco rhesus - *L (V) braziliensis* para continuar a investigação da resposta imune celular *in vivo* do hospedeiro estudando o curso resolutivo *versus* persistente da leishmaniose cutânea.

A análise da resposta imune em diferentes compartimentos durante a infecção crônica pode ser útil para determinação de correlações de proteção imune à *Leishmania* (Barbosa Reis *et al.* 2009). No segundo trabalho caracterizamos a resposta imune sistêmica (PBMC) e localizada (células derivadas das lesões e linfonodos drenantes da lesão) em animais infectados com a cepa MHOM/BR/97/SIS. Todos os animais infectados desenvolveram uma lesão crônica

de pele, regredindo e desaparecendo entre a 16-24^a semana PI. Os macacos infectados desenvolveram granulomas maduros com os mesmos tipos celulares observados nos granulomas encontrados em humanos (Muse & Ramakrishnan 2009) parecendo estar envolvido na restrição da infecção. Uma marcada heterogeneidade caracterizou a resposta imune localizada e sistêmica durante a infecção crônica (8 semanas PI) de macacos com *L (V) braziliensis*. Enquanto que células T CD3⁺ foram recrutadas em frequências semelhantes para a pele inflamada ($51.43 \pm 16.89\%$) e linfonodo drenante ($49.10 \pm 14.08\%$), a produção tanto de IFN- γ e TNF- α pelas células CD4⁺ e CD8⁺ quanto de IL-10 pelas células CD4⁺CD25⁺ foram maiores em leucócitos derivados do granuloma, demonstrando assim o estado de ativação e o papel funcional dos linfócitos efetores e reguladores no sítio da infecção. Os leucócitos da lesão foram analisados diretamente *ex vivo* ao contrário das células derivadas do linfonodo que foram re-estimuladas *in vitro*. Comprovamos a análise direta *ex vivo* de leucócitos derivados das lesões como método mais eficaz (quando comparado com células derivadas de linfonodo ou sangue periférico re-estimuladas *in vitro*) para avaliar a capacidade funcional de linfócitos T efetores e reguladores da resposta imune durante a leishmaniose experimental. Estes dados corroboram assim com resultados obtidos em outro estudo (Choi & Kropf 2009) onde foi utilizado tanto a abordagem *in vivo* quanto *ex vivo* para definir melhor o papel funcional do linfócito.

Após a confirmação do estado de ativação desses leucócitos no local da infecção, uma terceira série de experimentos foi desenhada para investigar os mecanismos de regulação dessa imunidade localizada só que agora em lesões dérmicas persistentes no modelo *Leishmania braziliensis*-macacos rhesus. Como hipótese de trabalho, foi admitida que formas persistentes da leishmaniose cutânea (lesões primárias ou secundárias na derme e mucosa) podem resultar de uma resposta imune hiperérgica (seja por aumento de co-estimulação ou diminuição de morte de células ativadas por apoptose) modulada por células T reguladoras promovendo assim a destruição tecidual progressiva de natureza imunopatológica.

Assim, através do uso do modelo experimental *L. braziliensis*-macaco para doença progressiva, foi avaliado a sequência de infiltração de leucócitos durante o curso da infecção. Componentes celulares nos granulomas de macacos foram bem similares aos observados em células inflamatórias nos granulomas humanos (Ulrichs *et al.* 2004; Taflin *et al.* 2009) conforme nossos achados anteriores (Teva *et al.*

2003). Foi verificada uma alta taxa de morte celular por apoptose nas lesões granulomatosas dos macacos infectados por *L. braziliensis*. Macrófagos apoptóticos foram observados em granulomas de tuberculose humanos e provavelmente desempenham um papel na expansão bacteriana (Davis *et al.* 2009)

O desenvolvimento do granuloma provavelmente depende do recrutamento de células para o local da inflamação devido à expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias (D'Ambrosio *et al.* 2001). A detecção *in situ* de diversos mediadores inflamatórios (MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL-10, IFN- γ , e TNF- α), assim como abundantes células CCR5⁺ (receptor de MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, ou RANTES/CCL5) comprovam que o recrutamento de leucócitos contínuo na pele inflamada pode afetar o tamanho e estrutura do granuloma. Resultados similares foram obtidos em macacos cynomolgus experimentalmente infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Fuller *et al.* 2003). Em humanos, CCL2 promove a migração e CXCL10 induz a migração de células T ativadas (preferencialmente células T de memória) para os granulomas do tecido (Hagge *et al.* 2009), enquanto que CCL3 e CCL4 são quimioatraentes para linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente (Taub *et al.* 1993). Além disso, sinais locais (tais como IFN- γ e TNF- α) influenciam os gradientes de quimiocinas, que facilitam a coordenação temporal e espacial das células apresentadoras de antígeno e células T ativadas nos granulomas (Hagge *et al.* 2009). Adicionalmente, o modelo de *L. braziliensis*-macacos Rhesus deve ser útil na definição da importância do receptor de quimiocina-ligante no controle do tráfico de células T, tanto no compartimento linfóide quanto em tecidos periféricos, que precisam ser considerados em qualquer estratégia terapêutica destinada a suprimir a inflamação.

Classicamente, as células B e anticorpos específicos não oferecem contribuição significativa para a proteção contra parasitos de leishmania (Grimaldi *et al.* 1993). No entanto, os linfócitos B, através de uma variedade de interações com a resposta imune celular (incluindo a apresentação de antígenos no contexto de MHC de classe II células T), podem desempenhar um papel importante na elaboração da defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares (Maglione *et al.* 2009). Tem sido demonstrado que células CD4⁺ Th1-mediadoras da patologia granulomatosa na leishmaniose murina são suprimidas por célula B através de um mecanismo dependente da sinalização através da ligação ao receptor Fc (Jankovic *et al.* 1998). No trabalho, observou-se aumento da frequência de células CD20⁺ ao longo do

curso da infecção nas lesões granulomatosas em macacos induzidas por *L. braziliensis*. Além disso, densos agregados de células CD20+ foram encontrados em lesões crônicas. Estas células B, que formam estruturas semelhantes a folículos linfóides, vistas dentro do infiltrado, podem acompanhar a inflamação crônica servindo provavelmente como substrato morfológico para a dinâmica da resposta do hospedeiro voltada para resistir à infecção persistente (Ulrichs et al. 2004)

As funções efetoras dos linfócitos T CD4⁺ são geralmente controladas por populações distintas de células Tregs e seus produtos solúveis. De fato, diversos estudos em camundongos C57BL/6 mostraram que a ocorrência natural de CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, que acumulam no local da infecção por *L. major*, funcionam de uma maneira dependente de IL-10, prevenindo então a cura estéril (Yurchenko *et al.* 2006). No entanto, estudos recentes têm demonstrado a produção de IL-10 por células Th1 CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻, (ativadas precocemente em um ambiente inflamatório intenso, como um mecanismo de controle de feedback) atuam na imunossupressão crônica da LTA (Anderson *et al.* 2007; Nagase *et al.* 2007). Em concordância com estes achados, mostramos que células T funcionais CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ acumulam dentro das lesões granulomatosas crônicas de macacos infectados por *L. braziliensis*. Estes resultados reforçam a noção de que ambos os grupos de células T reguladoras podem ser causa do processo inflamatório descontrolado que ocorre na leishmaniose cutânea crônica. Coletivamente, estes resultados nos levam a propor o modelo *L. braziliensis*-macaco Rhesus para investigação dos mecanismos moleculares de imunossupressão mediados pelas células Tregs que iniciam a doença.

5. CONCLUSÕES

- Os experimentos confirmam a suscetibilidade variada de macacos rhesus (*M. mulatta*) à infecção pela *L. braziliensis*, quando desafiados com cepas distintas do parasita. Os dados revelam claramente os determinantes intra-específicos do parasita (diferentes antígenos patogênicos ou outros fatores de virulência?) influenciando a expressão clínica diferenciada da infecção em macacos.

- O modelo *M. mulatta* reproduz os principais eventos histopatológicos da doença humana, incluindo a formação de granulomas bem organizados, consistindo dos mesmos componentes celulares e moleculares encontrados em granulomas humanos.

- O estudo demonstra que na fase aguda da reação inflamatória *in vivo*, os neutrófilos controlam em grande parte o parasitismo tissular. Macrófagos ativados fagocitam os granulócitos apoptóticos (mas com parasitas viáveis no seu interior) estabelecendo-se assim a infecção. Com o estímulo antigênico persistente, dar-se início então ao processo complexo da inflamação crônica granulomatosa.

- O desenvolvimento de granulomas reacional à *L. braziliensis* em macacos resulta da migração de leucócitos inflamatórios para o sítio da infecção, processo este orquestrado pela produção local de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias.

- A neo-gênese linfóide ectópica (consistindo de agregados de células B CD20⁺, próximos de linfócitos T) vista nas lesões não-resolutivas facilitaria maior interação entre células imunocompetentes envolvidas na persistência dos granulomas.

- Linfócitos T produtores de IL-10 em resposta à infecção com *L. braziliensis* em macacos representam duas populações (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻) reguladoras da resposta imune. Contrário aos dados da literatura, nossos achados indicam que as células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ constituem a fonte principal de IL-10 envolvida no controle da reação granulomatosa mediada por linfócitos T efetores.

- Esses resultados apontam o potencial promissor desse modelo na investigação dos mecanismos supressores das células T regulatórias associados à formação e manutenção de granulomas imunes durante a leishmaniose, o qual deverá ser considerado em qualquer estratégia voltada para o controle terapêutico dessa importante doença inflamatória.

- Finalmente, comprovamos a análise direta *ex vivo* de leucócitos derivados das lesões como método mais eficaz (quando comparado com células derivadas de linfonodo ou sangue periférico re-estimuladas *in vitro*) para avaliar a capacidade funcional de linfócitos T efetores e reguladores da resposta imune durante a leishmaniose experimental.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH 2003. Cellular and molecular immunology. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Adams DO 1974. The structure of mononuclear phagocytes differentiating in vivo. I. Sequential fine and histologic studies of the effect of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). *Am J Pathol* 76:17-48.

Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387:713-717.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112:2993-3002.

Amaral V, Pirmez C, Goncalves A, Ferreira V, Grimaldi G Jr 2000. Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected rhesus macaques, *Macaca mulatta*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:209-216.

Amaral VF, Ransatto VAO, Conceição-Silva F, Molinaro E, Ferreira V, Coutinho SG, McMahon-Pratt D, Grimaldi Jr G 1996. The Asian Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 82:34-44.

Amaral VF, Teva A, Porrozzi R, Silva AJ, Pereira MS, Oliveira-Neto MP, Grimaldi Jr G 2001. *Leishmania (L) major*-infected rhesus macaques (*Macaca mulatta*) develop varying levels of resistance against homologous reinfections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:795-804.

Ambroise-Thomas P 2001. Parasitic diseases and immunodeficiencies. *Parasitology*.122 Suppl:S65-71. Review

Anderson CF, Mendez S, Sacks DL 2005. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol* 174:2934-41.

Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 204:285-97.

Aschoff L 1950. Tratado de anatomia patológica. Barcelona, Ed. Labor 546-555.

Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S 2008. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 7:370-5.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119:238-258

Baggiolini M 1988. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-8. Review.

Baldwin T, Henri S, Curtis J, O'Keeffe M, Vremec D, Shortman K, Handman E 2004. Dendritic cell populations in *Leishmania major* infected skin and draining lymph nodes. *Infect Immun* 72:1991-2001.

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

Barbosa Reis, A., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. Systematic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87-95.

Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Netto M, Costa JM, Badaro R, Rocha H, Johnson WD 1987. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 9:487-497.

Barton GM, Medzhitov R 2002. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 270:81-92.

Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, Britton WJ 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 162:3504-11.

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

Belkaid Y 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7:875-88.

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 165:969-77.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.

Bittencourt AL, Barral A 1991. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86:51-56. Erratum in: *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991 86:following 378

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795.

Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* 191:2121-2130.

Bogdan C, Rollinghoff M 1999. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today* 15:22-28.

Boros DL 1978. Granulomatous inflammations. *Prog Allergy* 24:183-267. Review

Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 105:1317-25.

Brandonisio O, Spinelli R, Pepe M 2004. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and Infection* 6:1402-1409.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE Vigilância em Saúde. 2009. Available at: www.saude.gov.br/svs (accessed July 2009)
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_lta_br_gr_uf_1990_2008.pdf

Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, Félix SM, Abath FG, da Graça GC, Porrozzi R, Ishikawa EA, Shaw JJ, Cupolillo E, Brandão-Filho SP 2009. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites

circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health* 14:1278-86.

Broide DH, Wasserman SI, Alvaro-Gracia J, Zvaifler NJ, Firestein GS 1989. Transforming growth factor-beta 1 selectively inhibits IL-3-dependent mast cell proliferation without affecting mast cell function or differentiation. *J Immunol* 143:1591-7.

Bromley SK, Mempel TR, Luster AD 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 9:970-80.

Buates S, Matlashewski G 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* 166:3416-3422.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS 2006. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 193:1313-22.

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167:416-423.

Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky YA, Reed SG, Grimaldi G Jr 2001. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun* 69:4103-8.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 56:315-325.

Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondon AJ 1984a. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol* 27:176-186.

Castes M, Cabrera M, Trujillo D, Convit J 1988. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 26:1207-

1213.

Chang KP, Akman L, Nielsen JS 1999. Leishmania virulence and genetic heterogeneity. Clin Dermatol 17:269-273.

Chang KP, McGwire BS 2002. Molecular determinants and regulation of Leishmania virulence. Kinetoplastid Biol Dis 1:1.

Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L 2003. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Trop 85:375-90.

Chang, KP, Chaudhuri G, Fong D 1990. Molecular determinants of Leishmania virulence. Ann Rev Microbiol 44:499-529.

Channon JY, Kasper LH 1995. Parasite subversion of the host cell endocytic network. Parasitol Today 11:47-48.

Chen L, Zhang Z, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H, Sendo F 2005. The involvement of neutrophils in the resistance to Leishmania major infection in susceptible but not in resistant mice. Parasitol Int 54:109-118.

Chensue SW, Kunkel SL, Higashi GI, Ward PA, Boros DL 1983. Production of superoxide anion, prostaglandins, and hydroxyeicosatetraenoic acids by macrophages from hypersensitivity-type (Schistosoma mansoni egg) and foreign body-type granulomas. Infect Immun 42:1116-25.

Choi, B.-S., Kropf, P. 2009. Evaluation of T cell responses in healing and non-healing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization *ex vivo* and *in vitro*. Parasite Immunol. 31, 199-209.

Clark EA, Ledbetter JA 1994. How B and T cells talk to each other. Nature.367:425-428.

Cocco RE, Ucker DS 2001. Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. Mol Biol Cell 12:919-30.

Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW,1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. Immunol Rev 102:5-28.

Coler RN, Reed SG 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. Trends Parasitol 21:244-249.

Colucci F, Caligiuri M, Di SJ 2003. What does it take to make a natural killer? Nat Rev Immunol 3:413-425.

Conceição-Silva F, Dórea RC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG 1990. Quantitative study of *Leishmania braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol 79: 221-226.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C 2002. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis 186:1314-1320.

Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonca SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D 1996. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. Exp Parasitol 84:144-155.

Coutinho SG, Pirmez C, Da-Cruz AM 2002. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. Trans R Soc Trop Med Hyg Suppl 1:S173-8.

Cuba-Cuba CA, Ferreira V, Bampi M, Magalhães A, Marsden P, Vexenat A, de Mello MT 1990. Experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in marmoset (*Callithrix penicillata*) (primates, callithricidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85:459-467.

Cunningham AC 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp Mol Pathol 72:132-141.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol 41:3126-3132.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H 1997. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. Ann Trop Med Parasitol 91:617-626 .

D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F 2001. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1266-1275.

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

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG 1994. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62:2614-2618.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S 2003. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 326:377-382.

Davis JM, Ramakrishnan L 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136:37-49.

De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:861-870.

Delgado G, Carlos PL, Clara S, Elkin PM 2005. Phenotypical and functional characterization of non-human primate *Aotus spp.* dendritic cells and their use as a tool for characterizing immune response to protein antigens. *Vaccine* 23:3386-95.

Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 149:3008-3015.

Descoteaux A, Turco SJ 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1455:341-352.

Descoteaux A, Turco SJ 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect* 4:975-81. Review.

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

Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ 2002. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol* 11:34-41.

Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates

Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 172:4733-4743.

Dixon AE, Mandac JB, Madtes DK, Martin PJ, Clark JG 2000. Chemokine expression in Th1 cell-induced lung injury: prominence of IFN-gamma-inducible chemokines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L592-9.

Domínguez M, Moreno I, Aizpurua C, Toraño A 2003. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect* 5:507-13. Review.

Esterre P, Dedet JP, Frenay C, Chevallier M, Grimaud JA. 1992. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421: 239-247.

Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM 2001. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol* 166:6847-54.

Ferrero E, Biswas P, Vettoretto K, Ferrarini M, Uguccioni M, Piali L, Leone BE, Moser B, Rugarli C, Pardi R 2003. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. *Immunology* 108:365-74

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146:3444-351.

Fuller CL, Flynn JL, Reinhart TA 2003. *In situ* study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71:7023-7034.

Fuller CL, Flynn JL, Reinhart TA 2003. In situ study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71:7023-34.

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

Garcez LM, Silveira FT, El Harith A, Lainson R, Shaw JJ 1997. Experimental cutaneous leishmaniasis IV. The humoral response of *Cebus apella* (Primates: Cebidae) to infection of *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) braziliensis* using direct agglutination test. *Acta Trop* 68: 65-76.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6115-6119.

Getti GT, Cheke RA, Humber DP 2008. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? *Parasitology* 135:1391-9.

Giavedoni LD 2005. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. *J Immunol Methods* 301:89-101.

Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, Bumgarner R, Weinstock GM, Mardis ER, Remington KA, Strausberg RL, Venter JC, Wilson RK, Batzer MA, Bustamante CD, Eichler EE, Hahn MW, Hardison RC, Makova KD, Miller W, Milosavljevic A, Palermo RE, Siepel A, Sikela JM, Attaway T, Bell S, Bernard KE, Buhay CJ, Chandrabose MN, Dao M, Davis C, Delehaunty KD, Ding Y, Dinh HH, Dugan-Rocha S, Fulton LA, Gabisi RA, Garner TT, Godfrey J, Hawes AC, Hernandez J, Hines S, Holder M, Hume J, Jhangiani SN, Joshi V, Khan ZM, Kirkness EF, Cree A, Fowler RG, Lee S, Lewis LR, Li Z, Liu YS, Moore SM, Muzny D, Nazareth LV, Ngo DN, Okwuonu GO, Pai G, Parker D, Paul HA, Pfannkoch C, Pohl CS, Rogers YH, Ruiz SJ, Sabo A, Santibanez J, Schneider BW, Smith SM, Sodergren E, Svatek AF, Utterback TR, Vattathil S, Warren W, White CS, Chinwalla AT, Feng Y, Halpern AL, Hillier LW, Huang X, Minx P, Nelson JO, Pepin KH, Qin X, Sutton GG, Venter E, Walenz BP, Wallis JW, Worley KC, Yang SP, Jones SM, Marra MA, Rocchi M, Schein JE, Baertsch R, Clarke L, Csürös M, Glasscock J, Harris RA, Havlak P, Jackson AR, Jiang H, Liu Y, Messina DN, Shen Y, Song HX, Wylie T, Zhang L, Birney E, Han K, Konkel MK, Lee J, Smit AF, Ullmer B, Wang H, Xing J, Burhans R, Cheng Z, Karro JE, Ma J, Raney B, She X, Cox MJ, Demuth JP, Dumas LJ, Han SG, Hopkins J, Karimpour-Fard A, Kim YH, Pollack JR, Vinar T, Addo-Quaye C, Degenhardt J, Denby A, Hubisz MJ, Indap A, Kosiol C, Lahn BT, Lawson HA, Marklein A, Nielsen R, Vallender EJ, Clark AG, Ferguson B, Hernandez RD, Hirani K, Kehrer-Sawatzki H, Kolb J, Patil S, Pu LL, Ren Y, Smith DG, Wheeler DA, Schenck I, Ball EV, Chen R,

Cooper DN, Giardine B, Hsu F, Kent WJ, Lesk A, Nelson DL, O'brien WE, Prüfer K, Stenson PD, Wallace JC, Ke H, Liu XM, Wang P, Xiang AP, Yang F, Barber GP, Haussler D, Karolchik D, Kern AD, Kuhn RM, Smith KE, Zwiag AS 2007. Rhesus Macaque Genome Sequencing and Analysis Consortium. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* 316:222-34.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection *J Biol Chem* 278:8869-8872.

Gordon S 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.

Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R 2004. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 16:323-333.

Grimaldi G Jr, Moriearty PL, Hoff R 1980. *Leishmania mexicana*: immunology and histopathology in C3H mice. *Exp Parasitol* 50:45-56.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 41:687-725.

Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D 1991. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: An overview, p. 73-118. In 3d. T. Sun (ed.), *Progr. Clin. Parasitol* vol 2. Field, Wood Med. Publ, Inc., New York

Grimaldi Jr G, Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol* 6:230-250.

Grimaldi Jr G. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* candidate vaccines 2008. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:629-44. Review.

Grimsley C, Ravichandran KS 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 13:648-56.

Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG 1991. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 45:281-289.

Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton J, Krahenbuhl L, Adams LB 2009. Lymphotoxin- α and TNF have essential but

independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol* 174:1379-1389.

Hayday AC 2000. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18:975-1026.

Hel Z, Nacsa J, Trynieszewska E, Tsai WP, Parks RW, Montefiori DC, Felber BK, Tartaglia J, Pavlakis GN, Franchini G 2002. Containment of simian immunodeficiency virus infection in vaccinated macaques: correlation with the magnitude of virus-specific pre- and postchallenge CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. *J Immunol* 169:4778-87.

Henson PM 2004. Fingering IL-12 with apoptotic cells. *Immunity* 21(5):604-6.

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA 2001. Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11(19):R795-805.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057-61.

Horvath CJ, Hunt RD, Simon MA, Sehgal PK, Ringler D 1993. An immunohistologic study of granulomatous inflammation in SIV-infected rhesus monkeys. *J Leukoc Biol* 53:532-540.

Ilg T 2000. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today* 16:489-497.

Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3:352-63. Review.

Iwasaki a, Medzhitov R 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune response. *Nat Immunol* 5:987-95.

Janeway CA, Medzhitov R 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.

Jankovic D, Cheever AW, Kullberg MC, Wynn TA, Yap G, Caspar P, Lewis FA, Clynes R, Ravetch JV, Sher A 1998. CD4⁺ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signalling. *J Exp Med* 187:619-629.

Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L 2005. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 174:7147-53.

Johnston MI. The role of non-human primate in AIDS vaccine development 2000. *Mol Med Today* 6:267-270.

Kane MM, Mosser DM 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 166:1141-7.

Kennedy RC, Shearer MH, Hildebrand W 1997. Nonhuman primate models to evaluate vaccine safety and immunogenicity. *Vaccine* 15:903-908.

Kennedy RC, Shearer MH, Hildebrand W 1997b. Nonhuman primate models to evaluate vaccine safety and immunogenicity. *Vaccine* 15: 903-908.

Kennedy RC, Shearer MH, Hildebrand WH, Simmonds RS 1997a. Nonhuman primates and their use in immunologically based investigations. *The Immunologist* 5:150-156.

Kenney RT, Sacks DL, Sypek , Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K 1999. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 163:4481-4488.

Korbel DS, Finney OC, Riley EM 2004. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int. Jour.Parasitol* 34:1517-1528.

Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, Sher A 2002. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J Exp Med* 196:505-15.

Kunkel SL, Strieter RM, Lukacs N, Chensue SW 1993. Initiation and maintenance of the granulomatous response. *Chest* 103:135S-137S.

Kupper TS, Fuhlbrigge RC 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 4:211-222.

Kupper TS, Groves RW 1995. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 105:62S-66S.

Lai Guan Ng, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P, Weninger W 2008. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 4:1000222.

Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographic distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic press 1-120.

Lammas DA, De Heer E, Edgar JD, Novelli V, Ben-Smith A, Baretto R, Drysdale P, Binch J, MacLennan C, Kumararatne DS, Panchalingam S, Ottenhoff TH, Casanova JL, Emile JF 2002. Heterogeneity in the granulomatous response to mycobacterial infection in patients with defined genetic mutations in the interleukin 12-dependent interferon-gamma production pathway. *Int J Exp Pathol* 83:1-20.

Lanzavecchia A, Sallusto F 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92-97.

Laskay T, Rollinghoff M, Solbach W 1993. Natural Killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol* 23:2237-2241.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213:183-91.

Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113:717-30.

Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266:11234-11236.

Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L, Akuffo H 2008. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol* 153:221-30.

Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA 1994. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg* 50:743-747.

Lindoso JA, Lindoso AA 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 51:247-253.

Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP 1996. Control of the complement system. *Adv Immunol* 61:201.

Lloyd-Smith JO, Poss M, Grenfell BT 2008. HIV-1/parasite co-infection and the emergence of new parasite strains. *Parasitology* 135:795-806.

Lonardoni MV, Russo M, Jancar S 2000. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 68:6355-61.

Lujan R, Chapman WL Jr, Hannson WL, Dennis VA 1990. *Leishmania braziliensis* in the squirrel monkey: Development of primary and satellite lesions and lack of cross-immunity with *Leishmania donovani*. *J Parasitol* 76:594-597.

Luster A 2002. The role of chemokines linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 14:129-135.

Luster AD. 1998 Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med* 338:436-445.

Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12694-12699.

Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H 1998. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infection and Immunity* 66:2698-2704.

Maglione PJ, Chan J 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* 39:676-86.

Makitalo B, Andersson M, Arestrom I, Karlen K, Villinger F, Ansari A, Paulie S, Thorstensson R, Ahlborg N 2002. ELISpot and ELISA analysis of spontaneous, mitogen-induced and antigen-specific cytokine production in cynomolgus and rhesus macaques. *J Immunol Methods* 270:85-97.

Mariano M 1995. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37:161-76.

Mariano M, Spector WG 1974. The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). *J Pathol* 113:1-19.

Marsden PD, Jones TC 1985. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis, p. 183-198. In Chang KP and Bray RS (ed.), *Leishmaniasis*. Elsevier, London.

Martinez-Arends A, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Mosca W, Valecillos L, Convit J 1991. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. *Acta Trop* 49:271-280.

Matlashewski G 2001. Leishmania infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* 190:37-42.

Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M 2001. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol* 23:177-184.

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* 198:137-46. Review.

McDowell MA, Sacks DL 1999. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Curr Opin Microbiol* 2:438-443.

McGuirk P, McCann C, Mills KH 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195:221-31.

Medzhitov R 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-35. Review.

Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CS, Sacks D, Belkaid Y 2004. Role for CD4+CD25+ regulatory T cell in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 200(2):201-210.

Mills KH, McGuirk P 2004. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol* 16(2):107-17.

Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR, Gallinoto ME, Castes M, Rondon AJ, Rea TH, Convit J 1985. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 60: 241-248.

Mogensen TH 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22(2):240-73,

Moll H, Flohe S, Blank C 1995. Dendritic cells seclude *Leishmania* parasites that persist in cured mice--a role in the maintenance of T-cell memory? *Adv Exp Med Biol* 378:507-509.

Molon B, Gri G, Bettella M, Gómez-Moutón C, Lanzavecchia A, Martínez-A C, Mañes S, Viola A 2005. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6(5):465-71.

Moore KW, R.de Waal Malefyt, Coffman RL and O'Garra A 2002. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol* 19:683-765.

Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167:5226-5230.

Morsy TA, Essa MH, Mangoud AM, Aboul Anin AM 1989. Evaluation of T cells, B cells and Ig. in tissues of human cutaneous leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol* 19:57-66.

Mosmann TR, Coffman RL 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.

Mosser DM, Rosenthal LA 1993. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* 4:315-22. Review.

Müller I 1992. Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 22:3063-3069.

Murray HW 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 82:249-267.

Muse Davis, J. Ramakrishnan, L. 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136, 37-49.

Nagase H, Jones KM, Anderson CF, Noben-Trauth N 2007. Despite increased CD4⁺Foxp3⁺ cells within the infection site, BALB/c IL-4 receptor-deficient mice reveal CD4⁺Foxp3-negative T cells as a source of IL-10 in *Leishmania major* susceptibility. *J Immunol* 179:2435-2444.

Nathan C 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100:2417-2423.

Nathan C 2006. Neutrophils and immunity: challenge and opportunities. *Nat. Rev. Immunol* 6: 173-182.

Nikolich-Zugich J. Non-human primate models of T-cell reconstitution 2007. *Semin Immunol* 19:310-7. Review.

Nilsen R, Mshana RN 1987. In situ characterization of the cutaneous immune response in Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol* 26:503-512.

Noble A, Giorgini A, Leggat JA 2006. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 107:4475-83.

Nylen S, Maasho K, Soderstrom K, Ilg T, Akuffo H 2003. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol* 131:457-467.

Nylén S, Sacks D 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28:378-84. Review.

Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N 1995. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 49:239-76.

O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE 2004. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 114:1372-8. Review.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, da Costa SC, Pirmez C 1997. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil--an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol* 36:463-468.

Olivier M, Baimbridge KG, Reiner NE 1992. Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. *J Immunol* 148:1188-1196.

O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS 2000. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 68:495-502.

Pahar B, Cantu MA, Zhao W, Kuroda MJ, Veazey RS, Montefiori DC, Clements JD, Aye PP, Lackner AA, Lovgren-Bengtsson K, Sestak K 2006. Single

epitope mucosal vaccine delivered via immuno-stimulating complexes induces low level of immunity against simian-HIV. *Vaccine* 24:6839-49.

Pahar B, Li J, Rourke T, Miller CJ, McChesney MB 2003. Detection of antigen-specific T cell interferon gamma expression by ELISPOT and cytokine flow cytometry assays in rhesus macaques. *J Immunol Methods* 282:103-15.

Papadimitriou JM, Spector WG 1971. The origin, properties and fate of epithelioid cells. *J Pathol* 105:187-203.

Pasare C, Medzhitov R 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6:1382-1387.

Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 11:563-568.

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

Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL 1990a. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 145: 3100-3104.

Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G Jr, Savino W 1990b. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. Modulation of MHC class II gene products by keratinocytes before and after Glucantime therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 203-209.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Investig* 91: 1390-1395.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-8.

Porrozzini R, Pereira MS, Teva A, Volpini AC, Pinto MA, Marchevsky RS, Barbosa AA Jr, Grimaldi G Jr 2006. *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:926-37.

Porrozzi R, Teva A, Amaral VF, Costa MVS, Grimaldi G Jr 2004. Cross-immunity experiments between different species or strain of *Leishmania* in rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *Am J Trop Med Hyg* 71:297-305.

Probst RJ, Wellde BT, Lawyer PG, Stiteler JS, Rowton ED 2001. Rhesus monkey model for *Leishmania major* transmitted by *Phlebotomus papatasi* sandfly bites. *Med Vet Entomol* 15:12-21.

Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 25:745-750.

Pulendran B 2004. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res* 29:187-196.

Rasmussen SB, Reinert LS, Paludan SR 2009. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *APMIS* 117:323-37.

Ray M, Gam AA, Boykins RA, Kenney RT 2000. Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 181:1121-1128.

Reiner SL, Locksley RM. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13: 151-177.

Reis e Sousa C 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16:21-25.

Remick DG, Villarete L 1996. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *J Leukoc Biol* 59:471-475.

Ridley DS 1987. *The leishmaniases*. Academic Press London 666-701.

Ritter U, Körner H 2002. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 24:295-301.

Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker E, Velazco O, Becker I, Gillitzer R 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 173:699-709.

Rittig MG, Bogdan C 2000. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16:292-297.

Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168:4620-7.

Rodríguez-Pinto D 2006. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 238:67-75. Review.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430:463-7.

Romagnani S 1994. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol* 6:838-846.

Ross R 1903. Further notes on Leishman's bodies. *British Medical Journal* 11:1401.

Rossi D, Zlotnik A 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-242.

Rubin EJ 2009. The granuloma in tuberculosis - friend or foe? *N. Engl. J. Med* 360:23

Russo DM, Armitage RJ, Barral-Neto M, Barral A, Grabstein KH, Reed SG 1993. Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis. *J Immunol* 151:3712-3718.

Rutz M, Metzger J, Gellert T, Luppa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34:2541-2550.

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

Sakaguchi S 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-62. Review

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187:875-83.

Satoguina J, Mempel M, Larbi J, Badusche M, Lölliger C, Adjei O, Gachelin G, Fleischer B, Hoerauf A 2002. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with

immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). *Microbes Infect* 4:1291-300.

Savill J 1997. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 61:375-380.

Scharton-Kersten T, Afonso LCC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P 1995. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 154:5312-5330.

Scott P, Trinchieri G 1995. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* 7:34-40.

Sestak K, Scheiners C, Wu XW, Hollemweguer E 2007. Identification of anti-human CD antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet Immunol Immunopathol* 119:21-6.

Song PI, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC 2002. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 119:424-32.

Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161:1083-1086.

Spector WG, Lykke AW 1966. The cellular evolution of inflammatory granulomata. *J Pathol Bacteriol* 92:163-7.

Spellberg B 2000. The cutaneous citadel. A holistic view of skin and immunity. *Life Sci* 67:477-502.

Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 28:187-248.

Steinhoff M, Brozoska T, Luger TA 2001. Keratinocytes in epidermal immune response. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1:469-476.

Stenger S, Rollinghoff M 2001. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* 60 (Suppl) 3: iii43-46.

Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255-258.

Sutton JS, Weiss L 1966. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. An electron microscope study. *J Cell Biol* 28:303-32.

Taflin C, Miyara M, Nochy D, Valeyre D, Naccache J-M, Altare F, Salek-Peyron P, Badoual C, Bruneval P, Haroche J, Mathian A, Amoura Z, Hill G, Gorochov G 2009. Foxp3⁺ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. *Am J Pathol* 174:497-508.

Tang Q, Bluestone JA 2008. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9:239-44.

Tapper H 1996. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. *J Leukoc Biol* 59:613-622.

Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ 1993. Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260:355-358.

Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Neto M, Barral A 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22:32-38.

Teva A, Porrozzi R, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira-Neto MP, Grimaldi G Jr 2003. *Leishmania (Viannia) braziliensis*-induced chronic granulomatous cutaneous lesions affecting the nasal mucosa in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *Parasitology* 127:437-447.

Teva A, Porrozzi R, Oliveira-Neto MP, Grimaldi GJ 2005. Responses of *Leishmania (Viannia) braziliensis* cutaneous infection to N-methylglucamine antimoniate in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model. *J Parasitol* 91:976-8.

Titus RG, Ribeiro JM 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239:1306-1308.

Trinchieri G 1993. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* 14:335-338.

Trinchieri G 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13:251-276.

Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E 2003. CD8⁺ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 25:569-579.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 186: 1829-1834.

Udey MC, von Stebut E, Mendez S, Sacks DL, Belkaid Y 2001. Skin dendritic cells in murine cutaneous leishmaniasis. *Immunobiology* 204:590-594.

Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jorg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SHE 2004. Human tuberculous granulomas induces peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 204:217-228.

Uthaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good RA, Haraguchi S 2002. Innate immunity and its role against infection. *Ann. Allergy Asthma Immunol* 88:253-264.

Uyemura K, Pirmez C, Sieling PA, Kiene K, Paes-Oliveira M, Modlin RL 1993. CD4⁺ type 1 and CD8⁺ type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct T cell receptor repertoires. *J Immunol* 151: 7095-7104.

Van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Müller A, Hölscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W, Laskay T 2006. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13837-42.

Van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T 2007. Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* 40:349-52.

Vannier-Santos MA, Saraiva EM, Martiny A, Neves A, de Souza W 1992. Fibronectin shedding by Leishmania may influence the parasite-macrophage interaction. *Eur J Cell Biol* 59:389-397.

Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ, Soong L 2009. CXCL10 production by human monocytes in response to Leishmania braziliensis infection. *Infect Immun* [Epub ahead of print]

Vasquez RE, Soong L 2006. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infect Immun* 74:6769-77.

Vieira MG, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa AA Jr, Barral-Netto M, Barral A 2002. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:979-983.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kaldein JR, Girkontaite I 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350-1.

Von Stebut E 2007. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 17:115-122.

Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, Tesh RB 1989. Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis* (= *Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *Am J Trop Med Hyg* 40:19-39.

Ward PA, Warren JS, Johnson KJ 1988. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Radic Biol Med* 5:403-408.

Watkins DI, Zemmour J, Parham P 1993. Non-human primate MHC class I sequences, 1992. *Immunogenetics* 37:317-330.

Williams GT, Williams WJ 1983. Granulomatous inflammation--a review. *J Clin Pathol* 36:723-33.

Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S 2008. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol* 86:650-8. Review

Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA 2006. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med* 203:2451-60.

Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* 18:272-278.

Zuluaga M, Robledo S 2004. Role of Langerhans cells in the immunity of leishmaniasis. *Biomedica* 24:302-317.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)