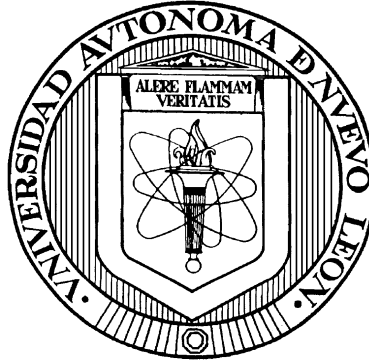


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL EN RATONES  
C57BL/6 INMUNOSUPRIMIDOS CON LUZ UVB INFECTADOS CON**

*Leishmania mexicana*

**POR:**

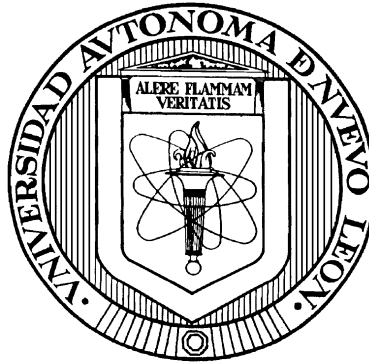
**M.C.P. ANGEL FRANCISCO GONZÁLEZ MIRELES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

**NOVIEMBRE, 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL EN RATONES  
C57BL/6 INMUNOSUPRIMIDOS CON LUZ UVB INFECTADOS CON**

*Leishmania mexicana*

**POR:**

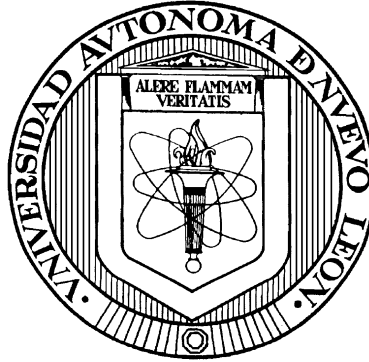
**M.C.P. ANGEL FRANCISCO GONZÁLEZ MIRELES**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

**NOVIEMBRE, 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL EN RATONES  
C57BL/6 INMUNOSUPRIMIDOS CON LUZ UVB INFECTADOS CON  
*Leishmania mexicana***

**POR:**

**ANGEL FRANCISCO GONZÁLEZ MIRELES**

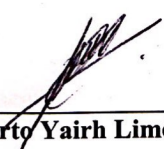
**Como requisito parcial para obtener  
el Grado de Maestría en Ciencias  
con Orientación en Inmunología Médica**

**NOVIEMBRE, 2018**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL EN RATONES  
C57BL/6 INMUNOSUPRIMIDOS CON LUZ UVB INFECTADOS CON**

*Leishmania mexicana*

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. en C. Alberto Yairh Limón Flores**

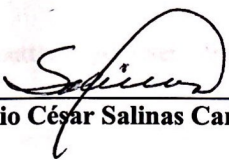
Director de Tesis



---

**Dr. en C. Angel Ramos Ligonio**

Codirector de Tesis



---

**Dr. en C. Mario César Salinas Carmona**

Miembro de la Comisión



---

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez**

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL EN RATONES  
C57BL/6 INMUNOSUPRIMIDOS CON LUZ UVB INFECTADOS CON**

*Leishmania mexicana*

Presentado por:

M.C.P. ANGEL FRANCISCO GONZÁLEZ MIRELES

Este trabajo se realizó en el Departamento y Servicio de Inmunología de la

Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León,

bajo la dirección del Dr. en C. Alberto Yairh Limón Flores

---

Dr. en C. Alberto Yairh Limón Flores

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a todo aquel que encuentre información, conocimiento o un rato ameno en su paso a través de las siguientes páginas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero al proyecto y a un servidor. A los profesores del Servicio y Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

“Muchos científicos jóvenes esperan que la ciencia que han llegado a amar pueda ser agente de una transformación social que conduzca a la mejora de la humanidad; por consiguiente, lamentan que tan pocos políticos hayan recibido una preparación científica, y que tan pocos tengan un entendimiento profundo de las promesas y realizaciones de la ciencia. Estas lamentaciones revelan una profunda incomprensión de la naturaleza de los problemas más apremiantes a los que se enfrenta el mundo: los problemas de la sobrepoblación y de lograr una existencia armoniosa en una sociedad multirracial. Éstos no son problemas científicos, ni admiten soluciones científicas. Esto no significa que los hombres de ciencia deban limitarse a ser horrorizados espectadores de los acontecimientos o de las disposiciones políticas que amenazan el bienestar de las naciones y, a la postre, de la humanidad; los científicos, como tales, encontrarán que tienen que hacer aportaciones necesarias y distintivas a la solución de estos problemas; pero son soluciones que están muy lejos de inaugurar el reino de los mil años.”

-Medawar, P. B. (1979). *Consejos a un Joven Científico*.



## ÍNDICE

CAPÍTULO.....	Página
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas e Imágenes.....	ix
Listado de Abreviaturas y Símbolos.....	x
Prefacio.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 <i>Leishmania</i> y leishmaniosis.....	2
1.1.1. Leishmaniosis.....	2
1.1.2. Origen, evolución y clasificación de <i>Leishmania</i> y leishmaniosis.....	2
1.1.3. Epidemiología global y nacional.....	4
1.1.4. Factores de riesgo.....	7
1.1.5. Formas principales de la enfermedad.....	8
1.1.6. Diagnóstico y tratamiento.....	9
1.1.7. <i>Leishmania spp.</i> .....	10
1.1.8. Morfología.....	10
1.1.9. Ciclo Biológico.....	11
1.1.10. Mecanismos patogénicos.....	12
1.2 La Piel.....	14
1.2.1. Generalidades.....	14
1.2.2. Histología.....	14
1.2.3. Métodos de investigación biomédica para el estudio y análisis de la piel.....	20

1.2.3.1. Técnica histológica.....	20
1.2.3.2. Inmunohistoquímica.....	20
1.3 Radiación Electromagnética.....	21
1.3.1 Generalidades.....	21
1.3.2 Longitud de onda, frecuencia y energía.....	21
1.3.3 El espectro electromagnético.....	22
1.3.4 Absorción y emisión de energía por átomos y moléculas.....	23
1.3.5 Radiación ultravioleta.....	23
1.3.5.1 Índice de luz ultravioleta.....	24
2. Antecedentes.....	25
2.1 Respuesta inmune en la leishmaniosis cutánea.....	25
2.1.1 Fase temprana de la infección y respuesta inmune innata.....	25
2.1.2 Fase tardía de la infección y respuesta inmune adaptativa.....	26
2.1.3 Papel de las Células T.....	27
2.1.4 Papel de las Células Dendríticas.....	29
2.1.5 Papel de Macrófagos.....	30
2.1.6 Papel de IL-10.....	30
2.1.7 Papel de IFN- $\gamma$ .....	31
2.1.8 Papel de los Mastocitos.....	32
2.2 Radiación UV y la piel.....	33
2.2.1 Mecanismos Inmunosupresores por UVB.....	33
3. Justificación.....	36
4. Hipótesis.....	37

5. Objetivos.....	38
5.1 Objetivo General.....	38
5.2 Objetivos Específicos.....	38
6. Estrategia General.....	39
6.1 Objetivo 1.....	39
6.2 Objetivo 2.....	40
6.3 Objetivo 3.....	41
6.4 Objetivo 4.....	41
7. Material y Métodos.....	42
7.1 Material.....	42
7.1.1 Equipos.....	42
7.1.2 Material e instrumentos.....	43
7.1.3 Reactivos y kits.....	44
7.1.4 Material biológico.....	45
7.1.5 Soluciones.....	45
7.2 Métodos.....	46
7.2.1 Preparación de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado para el cultivo de <i>Leishmania mexicana</i> .....	46
7.2.2 Descongelación de promastigotes de <i>L. mexicana</i> (ATCC® 50157™) Cepa: MHOM/BZ/82/BEL21 almacenados a -80°C criopreservados con DMSO.....	48
7.2.3 Conteo y ajuste de concentración de cultivo de <i>Leishmania mexicana</i> .....	50
7.2.4 Extracción de parásitos a partir de lesión de ratón infectado con <i>L. mexicana</i> ...	52
7.2.5 Congelación de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> a -80°C utilizando criopreservador DMSO para su conservación.....	54

7.2.6	Inoculación de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> en la región dorsal del tronco de ratón.....	57
7.2.7	Seguimiento de la evolución de lesión y pesaje de ratón infectado con <i>Leishmania mexicana</i> .....	61
7.2.8	Obtención de antígeno particulado de <i>Leishmania mexicana</i> .....	62
7.2.9	Curva de crecimiento del parásito <i>Leishmania mexicana</i> .....	63
7.2.10	Reacción de hipersensibilidad tardía (DTH).....	65
7.2.11	Supresión de la reacción de hipersensibilidad tardía por exposición a UVB.....	68
7.2.12	Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis.....	70
7.2.13	Determinación de carga parasitaria por dilución limitante.....	73
7.2.14	Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina.....	75
7.2.15	Análisis histopatológico.....	77
7.2.16	Análisis semicuantitativo para determinar cantidad de parásitos en la lesión.....	78
7.2.17	Análisis de distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos en la lesión.....	79
7.2.18	Inmunohistoquímica para IL-10+, IFN- $\gamma$ +, MOMA2+, CD4+ y CD8+ en la lesión cutánea.....	80
7.2.19	Análisis de células IL-10+, IFN- $\gamma$ +, MOMA2+, CD4+ y CD8+ en la lesión cutánea por Inmunohistoquímica.....	84
7.2.20	Análisis de porcentaje de IL-10 e IFN- $\gamma$ en la lesión cutánea por Inmunohistoquímica.....	84
7.2.21	Inmunosupresión sistémica inducida por ciclofosfamida.....	85

8. Resultados	
8.1 Curva de crecimiento del parásito <i>Leishmania mexicana</i> .....	86
8.2 Identificación de la fase de mayor infectividad del parásito en la curva de crecimiento.....	87
8.3 Determinación de la dosis óptima de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> necesaria para generar infección cutánea.....	89
8.4 Establecimiento de las condiciones necesarias para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía (DTH) contra antígenos de <i>Leishmania mexicana</i> .....	90
8.5 Supresión de la reacción de hipersensibilidad tardía tras exposición a luz UVB.....	92
8.6 Evaluación de la infección por <i>Leishmania mexicana</i> en ratones expuestos a diferentes dosis de radiación UVB; primer acercamiento.....	93
8.7 Evaluación macroscópica de la lesión cutánea en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> y determinación de la carga parasitaria por dilución limitante.....	96
8.8 Evaluación histopatológica de la lesión cutánea en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .....	98
8.9 Evaluación de la presencia, distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos en lesiones cutánea de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .....	103
8.10 Evaluación de la respuesta inmune local en las lesiones cutáneas de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .....	106
9. Discusión.....	117
9.1 Cultivo del parásito, fases de diferenciación y curva de crecimiento.....	117
9.2 Modelo de infección.....	119

9.3	Establecimiento de las condiciones necesarias para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía (DTH) y supresión tras exposición a luz UVB.....	121
9.4	Evaluación de la infección por <i>Leishmania mexicana</i> en ratones expuestos a diferentes dosis de radiación UVB; primer acercamiento.....	128
9.5	Evaluación de la evolución de la infección en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> y determinación de la carga parasitaria por dilución limitante.....	132
9.6	Evaluación histopatológica de la lesión cutánea en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .....	136
9.7	Evaluación de la presencia, distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos y su papel en la patogénesis en lesiones cutáneas de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .....	140
9.8	Evaluación del papel de IL-10, IFN- $\gamma$ , linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y macrófagos en la respuesta inmune local de las lesiones cutáneas de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .....	146
10.	Conclusión.....	156
11.	Perspectivas.....	157
12.	Referencias Bibliográficas.....	158
13.	Anexos.....	172

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.....	Página
Figura 1. Curva de crecimiento del parásito <i>Leishmania mexicana</i> .....	86
Figura 2. Ensayo de infección con $1 \times 10^7$ promastigotes en el día 5 de cultivo.....	87
Figura 3. Ensayo de infección con $1 \times 10^7$ promastigotes en el día 7 de cultivo.....	87
Figura 4. Ensayo de infección con $1 \times 10^7$ promastigotes en el día 9 de cultivo.....	88
Figura 5. Ensayo de infección con $1 \times 10^7$ promastigotes en el día 11 de cultivo.....	88
Figura 6. Infección con $1 \times 10^7$ promastigotes en los días 5, 7, 9 y 11 de cultivo.....	88
Figura 7. Ratones infectados con parásitos en el día 9 de cultivo.....	89
Figura 8. Ratones infectados con diferentes dosis de promastigotes.....	89
Figura 9. Ratones infectados con $1 \times 10^6$ promastigotes en el día 9 de cultivo.....	90
Figura 10. Reacción de hipersensibilidad tardía (DTH) positiva.....	91
Figura 11. Supresión de la reacción de hipersensibilidad tardía por UVB.....	92
Figura 12. Ratones inmunosuprimidos con UVB e infectados; 25 días de seguimiento.....	93
Figura 13. Análisis semicuantitativo de parásitos en la lesión.....	94
Figura 14. Análisis inmunohistoquímico para IL10 en piel de ratones de los 3 grupos.....	95
Figura 15. Análisis inmunohistoquímico MOMA2 en la piel de ratones de los 3 grupos.....	95
Figura 16. Tamaño de lesión al día 15 y 30 de infección de los 4 grupos.....	96
Figura 17. Tamaño de lesión al día 42 de infección.....	97
Figura 18. Carga parasitaria determinada por dilución limitante; día 42 de infección.....	98
Figura 19. Análisis histopatológico de lesión de ratón WT + <i>L. mex</i> ; día 15 de infección.....	99
Figura 20. Análisis histopatológico de lesión de ratón UVB + <i>L. mex</i> ; día 15 de infección.....	99

Figura 21. Reconstrucción de lesión cutánea de ratón WT + <i>L. mex</i> ; día 30 de infección.....	101
Figura 22. Reconstrucción de lesión cutánea de ratón UVB + <i>L. mex</i> ; día 30 de infección....	101
Figura 23. Análisis histopatológico de lesión cutánea de ratones WT + <i>L. mex</i> y UVB + <i>L. mex</i> ; Día 30.....	102
Figura 24. Análisis histológico de la piel de ratones CP + <i>L. mex</i> ; Día 30.....	103
Figura 25. Estado morfológico de los mastocitos en tejido cutáneo.....	104
Figura 26. Análisis de distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos; Día 15.....	104
Figura 27. Análisis de distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos; Día 30.....	105
Figura 28. Porcentaje de degranulación y análisis cuantitativo de mastocitos; Día 30.....	105
Figura 29. Inmunohistoquímica, número de células IL-10+; Día 15 de infección.....	106
Figura 30. Inmunohistoquímica, % de IL-10; Día 15 de infección.....	107
Figura 31. Inmunohistoquímica, número de células IL-10+; Día 30 de infección.....	107
Figura 32. Inmunohistoquímica, % de IL-10; Día 30 de infección.....	108
Figura 33. Inmunohistoquímica, número de células IFN- $\gamma$ +; Día 15 de infección.....	109
Figura 34. Inmunohistoquímica, % de IFN- $\gamma$ ; Día 15 de infección.....	109
Figura 35. Inmunohistoquímica, número de células IFN- $\gamma$ +; Día 30 de infección.....	110
Figura 36. Inmunohistoquímica, % de IFN- $\gamma$ ; Día 30 de infección.....	111
Figura 37-38. Inmunohistoquímica utilizando anti-CD4; Día 15, 30 de infección.....	112
Figura 39. Inmunohistoquímica utilizando anti-CD8; Día 15 de infección.....	113
Figura 40. Inmunohistoquímica utilizando anti-CD8; Día 30 de infección.....	114
Figura 41. Inmunohistoquímica utilizando anti-MOMA2; Día 15 de infección.....	115
Figura 42. Inmunohistoquímica utilizando anti-MOMA2; Día 30 de infección.....	116



## ÍNDICE DE TABLAS E IMÁGENES

Figura.....	Página
Tabla 1.....	4
Imagen 1.....	5
Imagen 2.....	6
Imagen 3.....	9
Imagen 4.....	11
Imagen 5.....	12
Imagen 6.....	14
Imagen 7.....	16
Imagen 8.....	18
Imagen 9.....	19
Imagen 10.....	21
Imagen 11.....	22
Imagen 12.....	28
Imagen 13.....	35

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a.C.	Antes de Cristo	ICAM-1	Molécula de adhesión celular 1
Acs	Anticuerpos	IFN- $\gamma$	Interferón gamma
ADN	Ácido desoxirribonucleico	IHC/IHQ	Inmunohistoquímica
Ag	Antígeno	IL	Interleucina
Arg	Arginina	IL-10	Interleucina 10
Asp	Ácido aspártico	iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
CD	Cúmulo de diferenciación	J	Joule
CD4+	Linfocito T cooperador CD4+	kDa	Kilodalton
CD8+	Linfocito T citotóxico CD8+	kJ	Kilojoule
CHS	Hipersensibilidad por contacto	kJ/cm <sup>2</sup>	Kilojoule por centímetro cuadrado
CLA+	Antígeno cutáneo asociado a linfocitos	kJ/m <sup>2</sup>	Kilojoule por metro cuadrado
Cm	Centímetro	L	Litro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado	<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
CP	Ciclofosfamida	<i>L. mex</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
CP + <i>L. mex</i>	Ratón inmunosuprimido con CP e infectado con <i>Leishmania mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
CS	Cloruro de sodio	LB	Linfocito B
DC	Célula dendrítica	LCD	Leishmaniosis cutánea difusa
De	Dermis	LCL	Leishmaniosis cutánea localizada
DLN	Ganglio linfático regional	LMC	Leishmaniosis mucocutánea
DMSO	Dimetilsulfóxido	LPG	Lipofosfoglucono
DNCB	2,4-dinitroclorobenceno	LPS	Lipopolisacárido
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno	LT	Linfocito T
DTH	Reacción de hipersensibilidad tardía	LV	Leishmaniosis visceral
EM	Radiación electromagnética	m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
Ep	Epidermis	MED	Dosis mínima eritematosa
Fc	Fracción cristalizable	MBL	Lectina de unión a manosa
Fc $\epsilon$ R	Receptor para fragmento Fc epsilon	M $\Phi$	Macrófago
Fc $\gamma$ R	Receptor para fragmento Fc gamma	MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad 1
gp63	Glucoproteína de 63 kDa	MIP-1 $\alpha/\beta$	Proteína inflamatoria de macrófago
H&E	Hematoxilina y eosina	mJ	Milijoule
Hi	Hipodermis	mJ/cm <sup>2</sup>	Milijoule por centímetro cuadrado
HP	Análisis histopatológico	mJ/m <sup>2</sup>	Milijoule por metro cuadrado
HSV1	Virus del herpes simple tipo 1	mL	Mililitro

mm	Milímetro	TGF-β	Factor de crecimiento transformador beta
mm <sup>2</sup>	Milímetro cuadrado	Th1	Linfocito T cooperador 1
MOMA2+	Antígeno de monocitos y macrófagos 2	Th17	Linfocito T cooperador 17
Mu	Capa muscular	Th2	Linfocito T cooperador 2
MmuPV1	Virus del papiloma de ratón tipo 1	Tir	Tirosina
NKT	Células T asesinas naturales	HSV1	Virus del herpes simple tipo 1
NM	Nuevo mundo	TLR	Receptor tipo Toll
nm	Nanómetro	TNF-β	Factor de necrosis tumoral beta
NO	Óxido nítrico	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
NOD	Dominio de unión a nucleótidos	Treg	Linfocito T regulador
NTD	Enfermedad tropical desatendida	UCA	Ácido urocánico
OCT	Temperatura óptima para corte	UV	Radiación ultravioleta
OMS	Organización Mundial de la Salud	UVA	Radiación electromagnética con longitud de onda entre 315-300 nm
PAF	Factor activador de plaquetas	UVB	Radiación electromagnética con longitud de onda entre 280-315 nm
PBS	Tampón fosfato salino	UVB + <i>L. mex</i>	Ratón inmunosuprimido con UVB e infectado con <i>L. mexicana</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	UVB + PBS	Ratón inmunosuprimido con UVB e inoculado con PBS
pDC	Células dendríticas plasmocitoides	UVC	Radiación electromagnética con longitud de onda entre 100-280 nm
PGE2	Prostaglandina E2	UVR	Radiación ultravioleta
PMN	Células polimorfonucleares	<i>V.</i>	<i>Viannia</i>
PRRs	Receptores reconocedores de patrones	VM	Viejo mundo
RCT	Receptor de células T	WT	Ratón sin ningún tratamiento previo
SALT	Tejido linfoide asociado a la piel	WT + <i>L. mex</i>	Ratón sin tratamiento previo infectado con <i>Leishmania mexicana</i>
Ser	Serina	γδ	Células T gamma delta
<i>spp.</i>	Especies	μg	Microgramos
Strp-HRP	Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante	μL	Microlitros
TB	Azul de toluidina	μm	Micrómetros
TDR	Programa especial de investigación en enfermedades tropicales		
TGF-β	Factor de crecimiento transformador beta		

## RESUMEN

La leishmaniosis cutánea es una enfermedad causada por parásitos unicelulares del género *Leishmania* y es transmitida a los seres humanos a través de la picadura de mosquitos infectados. Cada año se reportan más de 1 millón de casos nuevos a nivel mundial y existe una población en riesgo de transmisión de 300 millones de personas. En México se reportan más de 500 casos nuevos al año y se estima una población de 9 millones de habitantes en riesgo de desarrollar esta enfermedad. Se han asociado diversos factores de riesgo con el desarrollo de leishmaniosis cutánea como: la pobreza, la desnutrición, la inmunosupresión y las inmunodeficiencias. Desde hace más de 30 años se describió a la radiación ultravioleta como un fenómeno físico inductor de inmunosupresión local y sistémica. Actualmente no hay evidencia científica que relacione la exposición a la radiación ultravioleta emitida por el sol con la susceptibilidad de desarrollar leishmaniosis cutánea. El objetivo principal de este trabajo consistió en determinar si la inmunosupresión local inducida por luz UVB exacerba la infección por el parásito *Leishmania mexicana*, mediante el análisis de la evolución de la lesión, determinación de la carga parasitaria, análisis histopatológico y análisis de poblaciones celulares y citocinas que participan en el establecimiento o resolución de la infección. Para esto se irradiaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 con una dosis inmunosupresora ( $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) de UVB en la región dorsal del tronco, utilizando dos lámparas solares Philips UVL (FS-40T12 UVB) y la función inmunológica *in vivo* se midió mediante la inducción de una reacción de hipersensibilidad tardía. Posterior a la inmunosupresión inducida por UVB, los ratones fueron infectados por vía intradérmica en la región dorsal del tronco con  $1 \times 10^6$  de promastigotes de *Leishmania mexicana* y se les dio seguimiento. A los 15, 30 y 42 días de infección se sacrificaron los ratones y se realizó análisis histopatológico de la lesión, determinación de la carga parasitaria y análisis de macrófagos, mastocitos, linfocitos T CD4+ y CD8+, IL-10 e IFN- $\gamma$  en el sitio de la lesión. El modelo de infección establecido utilizando ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB infectados con parásitos de la especie *Leishmania mexicana* en la fase de promastigote metacíclico a una dosis de  $1 \times 10^6$  por vía intradérmica en la región dorsal del tronco, es un modelo de infección que actualmente no está reportado en la literatura universal. Utilizando el modelo establecido, observamos que los ratones inmunosuprimidos e infectados presentaron un mayor tamaño de la lesión correlacionado con una mayor carga parasitaria en comparación con los no inmunosuprimidos e infectados. Las lesiones se caracterizaron por presentar un infiltrado celular mixto en la dermis, hipodermis, capa muscular y submuscular con la presencia de células PMN, linfocitos, células fagocíticas, células parasitadas y la presencia de amastigotes en el intersticio. Las lesiones no presentaron una estructura de contención del agente infeccioso. Se observó un microambiente inmunológico desfavorable para la resolución de la infección caracterizado por la elevada presencia de mastocitos, macrófagos e IL-10 y ausencia de INF- $\gamma$ . Los resultados sugieren que la exposición a UVB antes y durante la infección participa en la susceptibilidad a desarrollar leishmaniosis cutánea.

## Prefacio

*La historia nos permite conocer el pasado, para entender el presente y poder reflexionar acerca del futuro.*

Desde los albores de la historia, el ser humano ha tratado de sobrevivir en este planeta y conseguir alimento de las diferentes fuentes existentes en su entorno. A medida que el ser humano se fue desplazando en diferentes direcciones, tuvo que adaptarse a las condiciones ambientales de una zona particular y alimentarse de sus fuentes naturales. Conforme el hombre se extendía en nuevas regiones, entraba en contacto no sólo con la flora y la fauna de esa zona, sino también con los microorganismos presentes en vegetales, animales, tierra o agua; de igual modo, algunos animales infectados se convertían en fuente de contaminación para el hombre cuando éste interactuaba con ellos. Los insectos que portaban algún patógeno lo transmitían, sea que el hombre se alimentara o se protegiera de ellos y en ocasiones esto lo llevaba a desarrollar enfermedades <sup>1</sup>.

Las primeras observaciones de enfermedades parasitarias proceden con toda seguridad del mismo inicio de la historia, cuando el hombre advirtió que la materia fecal contenía gusanos en forma de lombrices de tierra (*Ascaris lumbricoides*), o que eliminaba en sus heces organismos en forma de cinta de varios metros de longitud (tenias). Sin embargo, no fue sino hasta que el microscopio hizo posible reconocer los parásitos no observables a simple vista, cuando el hombre pudo identificar las causas de los signos y síntomas de las afecciones que lo aquejaban<sup>2</sup>.

## 1.1 *Leishmania* y leishmaniosis

### 1.1.1 Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad causada por parásitos unicelulares del género *Leishmania* que dependiendo del estado inmunológico en el que se encuentre el organismo infectado y/o la especie de *Leishmania* infectante, se pueden desarrollar tres formas principales de esta enfermedad clasificadas como: leishmaniosis cutánea localizada (LCL), leishmaniosis mucocutánea (LMC) y leishmaniosis visceral (LV) <sup>3,4</sup>. Además del hombre, puede infectar a animales como el perro y los roedores. Es transmitida por la picadura de mosquitos infectados del género *Phlebotomus* que se encuentra en zonas tropicales y subtropicales del viejo mundo (Europa, Asia y África) y de mosquitos del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo (América)<sup>5,6</sup>.

### 1.1.2 Origen, evolución y clasificación de *Leishmania* y leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad antigua que históricamente ha sido retratada en figuras, papiros, estatuas y cerámica, y se ha discutido a partir del análisis de restos humanos momificados y hallazgos arqueológicos <sup>7</sup>. La reconstrucción de la historia de esta enfermedad se ha visto facilitada por la recolección de ADN y su amplificación y análisis por medio de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). En un estudio paleoparasitológico realizado en 42 momias egipcias de una tumba encontrada en la antigua región de Tebas, capital del Imperio Medio (año 2050-1650 a.C.), se encontró ADN mitocondrial de *Leishmania* en cuatro especímenes. Secuenciación directa del fragmento de ADN amplificado reveló que las cuatro momias estaban infectadas con *Leishmania donovani*, lo cual sugiere que LV estaba presente en el antiguo Egipto <sup>8</sup>. La leishmaniosis también se menciona en el Papiro de Ebers, una colección de documentos médicos egipcios antiguos que se remonta al año 1500 a.C. Esta

escritura, reporta una enfermedad cutánea conocida en inglés como “Nile Pimple” que hace referencia a LCL <sup>9</sup>. Se han encontrado representaciones de lesiones cutáneas y deformidades faciales en figuras de cerámica pre-Inca en Perú y Ecuador que datan del siglo I <sup>10</sup>. Además, utilizando análisis inmunológico, macrófagos infectados con *Leishmania* fueron detectados en una momia Peruana de una niña de 6 años que data del año 800 a.C <sup>11</sup>.

En noviembre de 1900, el patólogo escocés William Boog Leishman, que sirvió con el ejército británico en la India, descubrió cuerpos ovoides en frotis tomados post-mortem del bazo de un soldado que murió de emaciación y esplenomegalia mientras se encontraba estacionado en Dum Dum, una ciudad cerca de Calcuta <sup>12</sup>. Posteriormente, encontró cuerpos similares en una rata infectada experimentalmente. Publicó sus hallazgos en 1903 y sugirió que los cuerpos ovoides eran formas degeneradas de tripanosomas y, por lo tanto, propuso que la enfermedad que denominó "fiebre Dum-dum" era una forma de tripanosomiasis <sup>12</sup>. Semanas más tarde, el médico irlandés Charles Donovan, profesor de fisiología en la Escuela de Medicina de Madrás, publicó un documento que informaba que había encontrado cuerpos similares en muestras de bazo tomadas durante la vida y en autopsia de sujetos indios nativos con fiebre persistente y esplenomegalia <sup>13</sup>. Más adelante, el médico británico Ronald Ross, a quien el gobierno indio ordenó en 1898 investigar la enfermedad de kala-azar, publicó un artículo en noviembre de 1903 en el que comentaba acerca del descubrimiento de los cuerpos ovoides encontrados por Leishman y Donovan en el bazo de pacientes con pirexia crónica y esplenomegalia <sup>14</sup>. Concluyó que los cuerpos ovoides no eran tripanosomas degenerados sino un nuevo organismo protozoario. En un documento de seguimiento, Ross aseguró que estos microorganismos pertenecían a un nuevo género y propuso llamarlos *Leishmania donovani* en honor a Leishman y Donovan<sup>15</sup>.

Desde la descripción realizada por Leishman y Donovan hace más de 100 años hasta el día de hoy, se han descrito 18 especies diferentes de *Leishmania* que son patógenas para los humanos (Tabla 1) <sup>16, 17, 18</sup>.

Tabla 1. Especies de Leishmania causantes de leishmaniosis en humanos (adaptado y modificado de acuerdo a referencias [16-18])				
Subgénero	Especie	Viejo/Nuevo Mundo	Enfermedad clínica	Distribución
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	VM	LCL, LCD	África del Este (Etiopía, Kenia)
	<i>L. amazonensis</i>	NM	LCL, LCD, LMC	América del Sur (Brasil, Venezuela, Bolivia)
	<i>L. donovani</i>	VM	LV	África Central, Sur de Asia, Medio Oriente, India, China
	<i>L. infantum</i>	VM, NM	LV, CL	Países del Mediterráneo (África del Norte y Europa), Sudeste de Europa, Medio Oriente, Asia Central, América (México, Venezuela, Brasil, Bolivia)
	<i>L. major</i>	VM	LCL	Norte de África, África Central, Medio Oriente, Asia Central
	<i>L. mexicana</i>	NM	LCL, LCD	Estados Unidos, Ecuador, Venezuela, Perú, México
	<i>L. tropica</i>	VM	LCL, LV	Norte de África, África Central, Medio Oriente, Asia Central, India
	<i>L. venezuelensis</i>	NM	LCL	Región norte de América del Sur, Venezuela
	<i>L. waltoni</i>	NM	LCD	República Dominicana
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	NM	LCL, LMC	Oeste del Amazonas, América del Sur (Guatemala, Venezuela, Brasil, Bolivia, Perú)
	<i>L. guayanensis</i>	NM	LCL, LMC	Región norte de América del Sur (Guayana Francesa, Surinam, Brasil, Bolivia)
	<i>L. lainsoni</i>	NM	LCL	Brasil, Bolivia, Perú
	<i>L. lindenbergi</i>	NM	LCL	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	NM	LCL	Brasil Guayana Francesa
	<i>L. panamensis</i>	NM	LCL, LMC	América Central y América del Sur (Panamá, Colombia, Venezuela, Brasil)
	<i>L. peruviana</i>	NM	LCL, LMC	Perú, Bolivia
<i>L. shawi</i>	NM	LCL	Brasil	
<i>Mundinia</i>	<i>L. martiniquensis</i>	NM, VM	LCL, LV	Martinica, Tailandia

Abreviaturas: LCD leishmaniosis cutánea difusa, LCL leishmaniosis cutánea localizada, LMC leishmaniosis mucocutánea, LV leishmaniosis visceral, NM Nuevo Mundo, VM Viejo Mundo

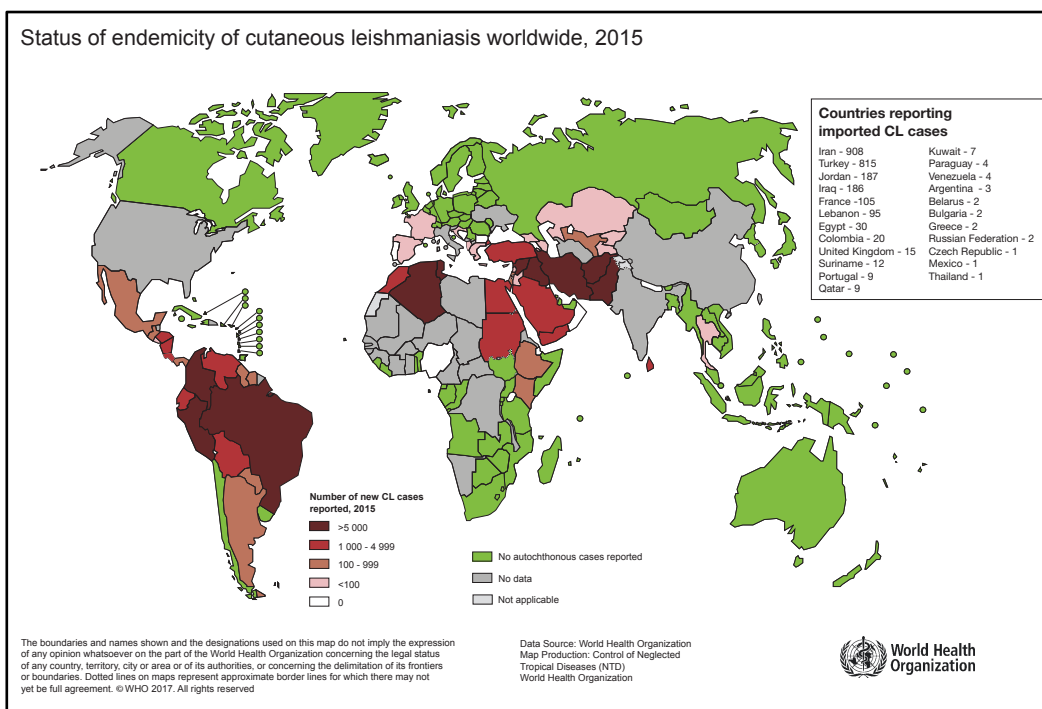
**Tabla 1.** Especies de *Leishmania* causantes de leishmaniosis en humanos (adaptado y modificado de acuerdo a referencias [16-18]). Abreviaturas: LCD leishmaniosis cutánea difusa. LCL leishmaniosis cutánea localizada. LMC leishmaniosis mucocutánea. LV leishmaniosis visceral. NM Nuevo Mundo, VM Viejo Mundo.

### 1.1.3 Epidemiología global y nacional

La leishmaniosis representa un problema de salud pública global. El Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (TDR/OMS) actualmente la consideran como una de las enfermedades infecciosas más importantes a nivel mundial y la colocan en “Categoría 1” debido a la ausencia de control que se tiene sobre la misma <sup>19</sup>. Se considera una enfermedad tropical desatendida (NTD, por sus siglas en inglés), debido a que es una enfermedad infecciosa que prevalece en entornos empobrecidos, sin saneamiento adecuado, que se encuentran en estrecho contacto con vectores infecciosos en las regiones tropicales y subtropicales del planeta <sup>20</sup>.



La OMS estima que cada año se producen entre 700,000 y un millón de nuevos casos y entre 20,000 y 30,000 defunciones en todo el mundo <sup>3</sup>. Esta enfermedad se considera endémica en 98 países a lo largo de los 5 continentes, afectando a una población de 350 millones de habitantes en riesgo de infección <sup>21</sup>. La forma visceral de esta enfermedad (LV) es endémica en el subcontinente indio y África oriental. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 50,000 y 90,000 casos nuevos. En 2015, más del 90% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en siete países: Brasil, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán y Sudán del Sur. Más del 90% de los casos de leishmaniosis mucocutánea (LMC) se producen en el Brasil, Bolivia, Etiopía y Perú. Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniosis cutánea localizada (LCL) se producen en América, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Más de dos tercios de los casos nuevos aparecen en seis países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Irán y Siria. Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 600,000 y 1 millón de casos nuevos (**Imagen 1**) <sup>22</sup>.



**Imagen 1.** Estado de endemicidad de leishmaniosis cutánea en todo el mundo en el año 2015.

En México del año 2005 al año 2015 la OMS reportó un promedio de 512 casos por año de LCL<sup>23</sup>. Esta enfermedad se ha identificado en 22 entidades federativas, aunque se considera la mayor endemicidad en 13 estados de la república: Región del Golfo: Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Región del Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa. Región Centro: Morelos y Puebla. También se reportan casos en Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo y San Luis Potosí - el llamado foco norte (**Imagen 2**)<sup>24</sup>.



**Imagen 2.** Estados de la República Mexicana considerados endémicos de leishmaniosis cutánea (adaptado y modificado de acuerdo a referencia 24). Foco Norte: Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí e Hidalgo. Región del Golfo: Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Región del Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa. Región Centro: Morelos y Puebla.

La población en riesgo de LCL es de aproximadamente 8 millones de habitantes en 11 estados, principalmente ubicados en el sureste de México. Hasta 1986, la transmisión de LCL se limitó a la península de Yucatán (En el suroeste de la península con 17% de pruebas cutáneas de *Leishmania* positivas, pero en aldeas en el bosque de hasta 90%), Tabasco (con 37% del total de casos), Veracruz, Coahuila, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Morelos (muy baja endemicidad, 2 casos reportados en Cuernavaca en 1958) y Puebla. Después de 1987, se confirmó un nuevo

enfoque en Nayarit, donde la especie encontrada fue *Leishmania braziliensis*, y posteriormente en Jalisco y Sinaloa, que probablemente ya existían sin haberse registrado. Entre 1990 y 2007 se registraron un total de 16,992 casos, el 99% de ellos LCL. En 2006, se produjo un brote de LCL en el estado de Veracruz, que afectó a 76 personas, principalmente en plantaciones de cacao <sup>25</sup>.

#### **1.1.4 Factores de Riesgo**

**Condiciones socioeconómicas:** La pobreza aumenta el riesgo de leishmaniosis. Las malas condiciones de vivienda y la deficiencia de saneamiento de los hogares (por ejemplo, la ausencia de sistemas de gestión de residuos, alcantarillado abierto) puede promover el desarrollo de lugares de cría y reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre. Las pautas de comportamiento humano (por ejemplo, dormir a la intemperie o en el suelo) también es probable que aumenten el riesgo. El uso de mosquiteros tratados con insecticida reduce el riesgo <sup>26</sup>.

**Malnutrición:** Las dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A y cinc aumentan el riesgo de que la infección progrese hacia LV <sup>26</sup>.

**Movilidad de la población:** Las epidemias de las dos formas principales de leishmaniosis a menudo se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión. La exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación siguen siendo factores importantes. Por ejemplo, asentarse en zonas previamente boscosas significa acercarse al hábitat del flebótomo, lo que puede llevar a un aumento rápido del número de casos <sup>26</sup>.

**Cambios ambientales:** La urbanización, la integración del ciclo de transmisión en el hábitat humano y la incursión de las explotaciones agrícolas y los asentamientos en las zonas boscosas<sup>26</sup>.

**Cambio climático:** La leishmaniosis es sensible a las condiciones climáticas, y los cambios en las precipitaciones, la temperatura y la humedad influyen en gran medida en la enfermedad. El calentamiento de la Tierra y la degradación del suelo afectan en muchos aspectos a la epidemiología de la leishmaniosis: los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población; pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un acusado efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica; las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a desplazamientos masivos y la migración de personas hacia zonas de transmisión de la leishmaniosis, y la desnutrición puede debilitar la inmunidad de las poblaciones afectadas <sup>26</sup>.

### **1.1.5 Formas principales de la enfermedad**

**Leishmaniosis visceral (LV):** También conocida como kala azar, en más del 95% de los casos es mortal si no se trata. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. Es endémica en el subcontinente indio y África oriental. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 50,000 y 90,000 nuevos casos de leishmaniosis visceral. En 2015, más del 90% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en siete países: Brasil, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán y Sudán del Sur <sup>27</sup>.

**Leishmaniosis mucocutánea (LMC):** conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta. Más del 90% de los casos de leishmaniosis mucocutánea se producen en el Brasil, Bolivia, Etiopía y Perú <sup>27</sup>.

**Leishmaniosis cutánea localizada (LCL):** es la forma más frecuente de leishmaniosis, y produce lesiones cutáneas, sobre todo ulcerosas, en las zonas expuestas del cuerpo. Dejan cicatrices de por vida y son causa de discapacidad grave. Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniosis cutánea se producen en América, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Más de dos terceras partes de los casos nuevos aparecen en seis países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Irán y Siria. Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 600,000 y 1 millón de casos nuevos (**Imagen 3**) <sup>27</sup>.



**Imagen 3.** Manifestaciones clínicas de las tres formas principales de leishmaniosis. (A) Leishmaniosis cutánea localizada (LCL), (B) Leishmaniosis mucocutánea (LMC), (C) Leishmaniosis visceral (LV).

### 1.1.6 Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico de la leishmaniosis visceral se realiza mediante la combinación de un examen clínico con pruebas parasitológicas o serológicas. Las pruebas serológicas tienen un valor limitado en las leishmaniosis cutánea y mucocutánea. En el caso de la leishmaniosis cutánea, el diagnóstico se confirma cuando los análisis parasitológicos corroboran las manifestaciones clínicas <sup>28</sup>.

El tratamiento de la leishmaniosis depende de varios factores, como la forma de la enfermedad, comorbilidades, la especie del parásito y la ubicación geográfica. La leishmaniosis es una

enfermedad que se puede tratar y curar, pero para ello es necesario un sistema inmunitario competente, dado que los medicamentos, por sí solos, no son capaces de eliminar el parásito del organismo. De ahí el riesgo de recidiva en caso de inmunosupresión. Todos los pacientes a quienes se haya diagnosticado leishmaniosis visceral requieren la administración inmediata de un tratamiento completo. En el número 949 de la Serie de Informes Técnicos de la OMS, dedicado a la lucha contra las leishmaniosis, se ofrece información detallada sobre el tratamiento de las diferentes formas de la enfermedad en función de la zona geográfica <sup>28</sup>.

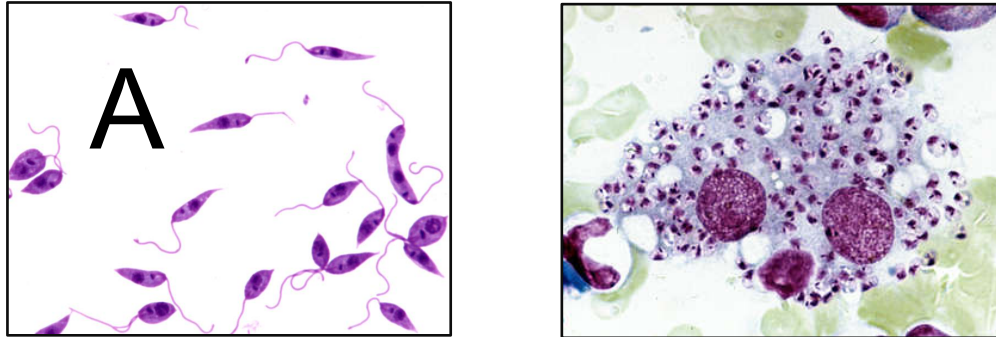
#### **1.1.7 *Leishmania spp.***

*Leishmania* es un protozooario flagelado intracelular obligatorio. El género *Leishmania* se divide en los subgéneros *Leishmania (L.)* y *Viannia (V.)* de acuerdo con el sitio de desarrollo en el intestino del díptero transmisor. *Leishmania* se localiza en el área suprapilórica (próxima a la probóscide), en tanto que *Viannia* se encuentra en el intestino medio y posterior <sup>29</sup>.

#### **1.1.8 Morfología**

*Leishmania* posee características morfológicas y moleculares diferentes, según sea el ambiente en el que se encuentre. En el intestino de la mosca vector, el parásito se encuentra en forma de promastigote; alargado, flagelado y móvil. Mide entre 6 y 20  $\mu\text{m}$ , y contiene un flagelo anteronuclear que se origina en el cuerpo basal. En el huésped vertebrado, el parásito se transforma en amastigote; no flagelado, esférico de localización intracelular. En esta forma tiene un diámetro de 2 a 3.5  $\mu\text{m}$  (**Imagen 4**) <sup>30,31</sup>. Las moléculas más abundantes de la superficie del parásito son la glucoproteína de 63 kDa (gp63) con actividad de metaloproteasa, y el lipofosfoligucano (LPG), un glucofosfolípido fijado a la membrana. Ambas moléculas sobresalen de la membrana del parásito y participan en procesos de adaptación del parásito a su complejo ciclo de vida en el insecto vector y su huésped mamífero <sup>32</sup>. Las distintas especies de

*Leishmania* se distinguen por presentar diferencias en el LPG, de manera específica en las cadenas laterales que se ramifican desde la columna central de fosfosacáridos <sup>33</sup>.

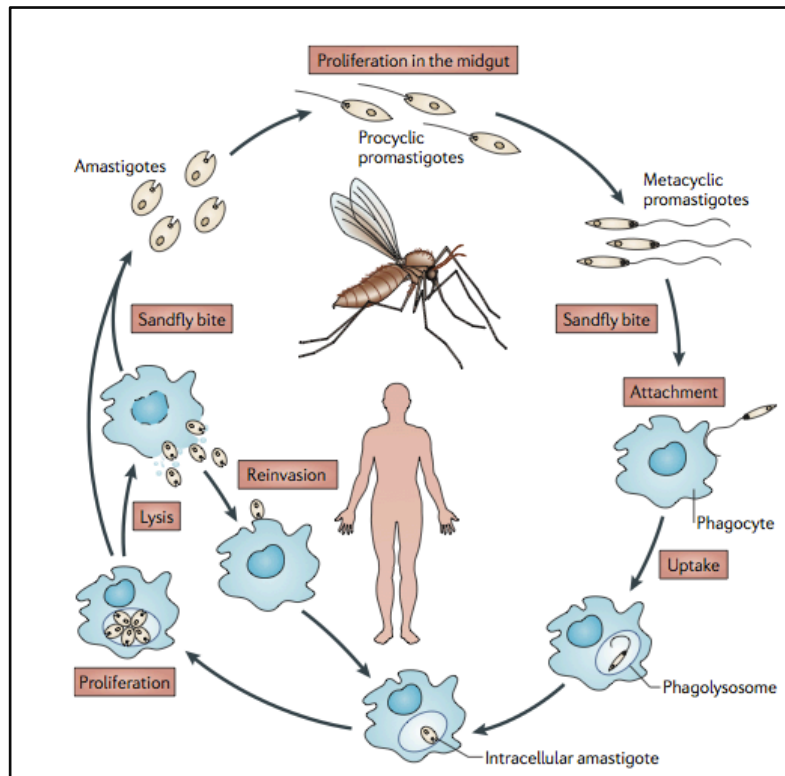


**Imagen 4.** *Leishmania* spp. (A) Promastigotes; tinción: H&E. (B) Múltiples amastigotes dentro de células fagocíticas; tinción: Giemsa.

### 1.1.9 Ciclo Biológico

La enfermedad se transmite por la picadura de la hembra hematófaga de moscas de la arena, pequeños dípteros del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo <sup>34</sup>. La hembra necesita sangre para el desarrollo de sus huevecillos y adquiere el parásito al ingerir sangre con células infectadas de hospederos vertebrados <sup>35</sup>. En el intestino de la mosca vector, el parásito inicia un proceso de maduración y diferenciación, en el cual los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, que se adhieren al epitelio del intestino medio del mosquito mediante su LPG <sup>36</sup>. El promastigote procíclico se convierte en promastigote metacíclico infectivo y durante esta metacicloogénesis el parásito se desprende del epitelio intestinal y migra a la válvula estomodeal y cavidad bucal del díptero <sup>37</sup>. Al picar de nueva cuenta, el mosquito inocula al promastigote infectivo al nuevo hospedero vertebrado, en el que los macrófagos de la piel, células de Langerhans o monocitos circulantes lo fagocitan. Una vez dentro de los fagolisosomas de las células fagocíticas, los promastigotes se diferencian de nuevo a amastigotes, los cuales proliferan intensamente por fisión binaria y llevan al rompimiento de

la célula. Los amastigotes liberados infectan células vecinas y el ciclo se cierra cuando un nuevo mosquito pica al huésped vertebrado infectado <sup>38</sup>(Imagen 5).



**Imagen 5.** Ciclo Biológico del parásito *Leishmania*. Los promastigotes procíclicos de *Leishmania*, se diferencian en promastigotes metacíclicos infectivos dentro del intestino de la mosca vector. En esta forma, los parásitos migran y se alojan en la válvula estomodeal de la mosca donde se acumulan y preparan para su transmisión. Durante la siguiente alimentación sanguínea de la mosca, al introducir su probócid en la piel del hospedero vertebrado, ésta va a regurgitar diversos componentes salivales y a los promastigotes metacíclicos 0.1 mm dentro de la piel. Los parásitos son fagocitados por diversas células fagocíticas que se encuentran en el entorno local. Una vez dentro de las células fagocíticas, los promastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes. Los amastigotes se replican dentro de las células del huésped, que pierden continuidad de la membrana celular cuando hay demasiados amastigotes presentes provocando su liberación al intersticio y la infección de los fagocitos locales. El ciclo de transmisión se completa cuando los fagocitos infectados son absorbidos por una mosca sana al succionar sangre del hospedero infectado y los amastigotes se convierten en promastigotes en el intestino medio de la mosca.

### 1.1.10 Mecanismos Patogénicos

La enfermedad comienza cuando *Leishmania* es inoculada a 0.1 mm dentro de la piel por la picadura del mosquito transmisor. Las células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, células dendríticas, monocitos), a través de diversos receptores que reconocen principalmente a gp63 y LPG, fagocitan al parásito. Ambas moléculas participan en la activación del sistema de

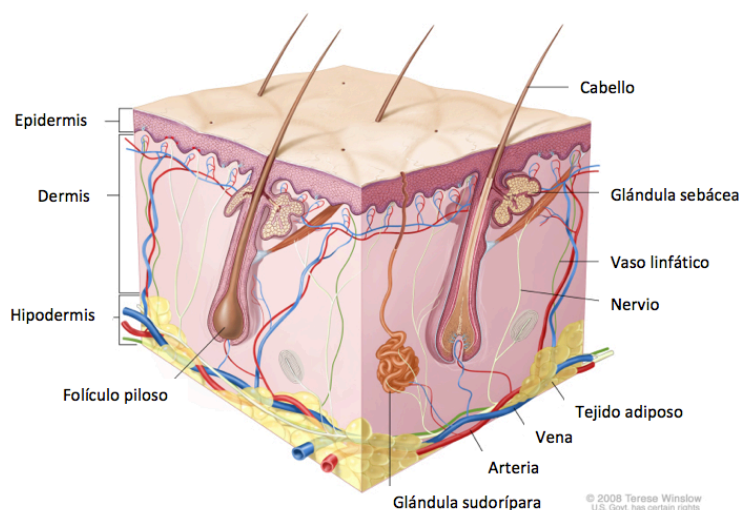


complemento. La manosa presente en el LPG se puede unir a la lectina de unión a mananos (MBL) y a la proteína C reactiva, ambas proteínas de fase aguda del huésped. La unión de LPG a MBL activa el complemento por la vía de las lectinas. La unión de LPG a la proteína C reactiva también activa el complemento mediante la unión de ésta a los componentes de tipo colágena de C<sub>1q</sub>, el primer componente de la vía típica del complemento. La activación de ambas vías del complemento asegura un incremento de las opsoninas C<sub>3b</sub> y C<sub>3bi</sub> en la superficie del parásito, y ello hace posible su fagocitosis por los receptores CR<sub>1</sub> y CR<sub>3</sub>, respectivamente. Además, los parásitos cubiertos con MBL y proteína C reactiva pueden ser fagocitados por el macrófago mediante su receptor para C<sub>1q</sub>. El receptor CR<sub>3</sub> también puede reconocer directamente al LPG y posibilitar la fagocitosis. La metaloproteasa gp63 favorece también la opsonización y fagocitosis del parásito mediante su capacidad de degradar C<sub>3b</sub> a C<sub>3bi</sub>, lo que asegura la participación de una amplia gama de receptores fagocíticos, incluidos CR<sub>3</sub> y CR<sub>4</sub>. Asimismo, la molécula gp63 contiene una secuencia Ser-Arg-Tir-Asp que semeja a la fibronectina, y por lo tanto el receptor de fibronectina del macrófago la reconoce. Otros dos receptores del macrófago que intervienen en la fagocitosis de *Leishmania* son el receptor de manosa-fucosa (que reconoce a la manosa presente en LPG) y el receptor Fc de inmunoglobulinas. La unión a múltiples receptores le permite al parásito una fagocitosis rápida y lo protege de los mecanismos líticos del complejo de ataque a la membrana del complemento. Dentro de su célula huésped, el parásito también utiliza LPG y gp63 para inhibir los mecanismos leishmanicidas del macrófago <sup>39</sup>.

## 1.2 La Piel

### 1.2.1 Generalidades

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano. En un adulto promedio, cubre un área de 1.5 a 2.0 m<sup>2</sup>. Está conformada por tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis <sup>40</sup> (**Imagen 6**). Además de proporcionar un recubrimiento para la totalidad de los tejidos blandos, la piel desempeña funciones adicionales que incluyen: a) protección contra lesiones, invasión bacteriana y desecación; b) regulación de la temperatura corporal; c) recepción de sensaciones continuas del ambiente (p. ej., tacto, temperatura y dolor); d) excreción de glándulas sudoríparas, y e) adsorción de la radiación ultravioleta del sol para la síntesis de vitamina D <sup>41</sup>.



**Imagen 6.** Anatomía de la piel que muestra la epidermis, dermis e hipodermis y sus anexos.

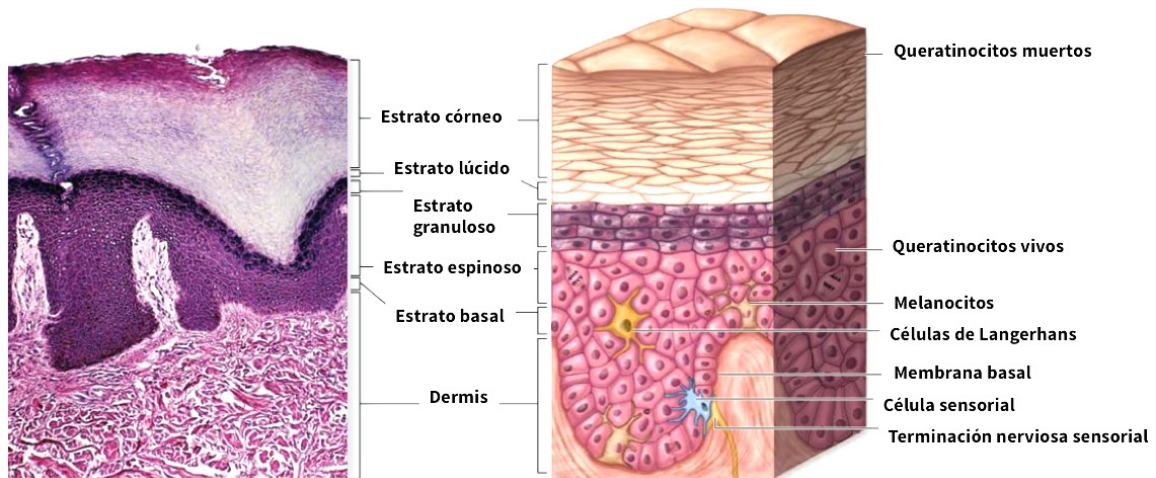
### 1.2.2 Histología

La piel está conformada por tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis se compone de un epitelio escamoso estratificado queratinizado en donde se encuentran cuatro poblaciones de células: queratinocitos, células de Langerhans (células presentadoras de antígeno), melanocitos (productoras del pigmento melanina que confiere una coloración oscura a la piel) y células de Merkel (mecanorreceptores).

Los queratinocitos que forman la población más grande de células, están dispuestos en cinco capas identificables; De la capa más interna a la externa son: 1) estrato basal: es la capa germinal que se divide por mitosis, forma interdigitaciones con la dermis y está separada de ella por una membrana basal, 2) estrato espinoso: se compone de varias capas de células polimorfas con actividad mitótica cuyas numerosas prolongaciones proporcionan a esta capa un aspecto espinoso, 3) estrato granuloso: se compone de tres a cinco capas de células que contienen gránulos de queratohialina, 4) estrato lúcido: solo se encuentra en la piel gruesa, sus células carecen de núcleos y organelos y 5) estrato córneo: se integra con varias capas de células muertas aplanadas, que contienen queratina y se conocen como escamas <sup>42</sup> **(Imagen 7)**.

Justo abajo e interdigitada con la epidermis se encuentra la dermis, compuesta de tejido conjuntivo denso, irregular y colagenoso. La dermis se divide en dos capas: la capa superficial o papilar tramada de manera laxa y la capa profunda o reticular mucho más densa. La capa papilar está interdigitada en forma directa con la epidermis separada de ella por la membrana basal. Está constituida de un tejido conjuntivo laxo, compuesto de fibras de colágena y fibras elásticas. Contiene fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas, mastocitos y otras células comunes al tejido conjuntivo. La capa reticular se constituye de tejido conjuntivo denso irregular colagenoso, se compone de fibras de colágena entremezcladas con redes de fibras elásticas. En esta capa se encuentran las glándulas sudoríparas, folículos pilosos y glándulas sebáceas. Las células son más escasas en esta capa que en la papilar. Incluyen fibroblastos, células cebadas, linfocitos, macrófagos y, con frecuencia, células adiposas en la superficie más profunda de la capa reticular <sup>43</sup>.

La hipodermis está conformada de tejido conjuntivo laxo que contiene cantidades variables de grasa, nervios, vasos sanguíneos y células musculares <sup>44</sup>.



**Imagen 7.** Histología de la piel. La epidermis se compone de un epitelio escamoso estratificado queratinizado en donde se encuentran cuatro poblaciones de células: queratinocitos, células de Langerhans melanocitos y células de Merkel. Los queratinocitos están dispuestos en cinco capas: estrato basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo. La dermis está compuesta de tejido conjuntivo denso, irregular y colagenoso y se divide en dos capas: capa papilar y la capa reticular. Contiene fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas, mastocitos y linfocitos.

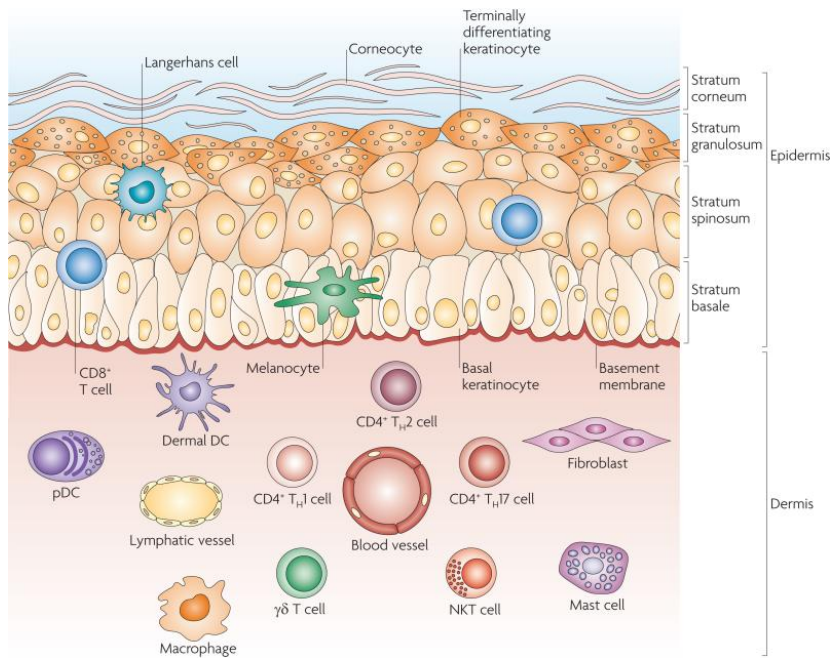
La piel es una barrera entre el organismo vivo y su entorno; como tal, se defiende contra los estímulos externos, incluidos el estrés físico y químico, la exposición a la luz ultravioleta, las bacterias, los hongos, los virus y los parásitos. Parte de esta actividad de defensa ocurre a través del sistema inmunológico <sup>45</sup>.

En 1970, *Fichtelius et al.* sugirió que la piel podría ser considerada un "órgano linfóide de primer nivel" comparable al timo, debido a su participación en la formación de órganos linfoides al inducir inmunidad sistémica al exponerse a antígenos exógenos <sup>46</sup>. Años más adelante, un concepto visionario proporcionó una interpretación moderna y un paradigma general para los investigadores interesados en la inmunología cutánea: El Tejido Linfóide Asociado a la Piel (SALT; por sus siglas en inglés), descrito por primera vez por *Streilein* en 1983 <sup>47</sup>. Más tarde el "sistema inmunitario de la piel" <sup>48</sup>. El concepto inicial de SALT introdujo la idea que distintas células inmunes se desplazan continuamente entre la piel, los ganglios linfáticos regionales que drenan la piel y la circulación sistémica, lo que proporciona una inmunovigilancia óptima.

Recientemente se demostró que hay alrededor de 20 mil millones de células T de memoria residentes en la piel de un ser humano adulto promedio. Esto quiere decir que hay el doble de células T en la piel que en la sangre y que el número de células T de memoria en la piel (CLA+), es 20 veces mayor que las que se encuentran en circulación sanguínea <sup>49</sup>. Las células de Langerhans se localizan en la epidermis como células presentadoras de antígeno a una densidad de 1,000 células por mm<sup>2</sup>, lo que sugiere que la piel es un órgano inmunológico de importancia<sup>45</sup>.

La epidermis tiene una histología simple y principalmente se encuentran dos células del sistema inmunológico entre sus capas: células de Langerhans y linfocitos T CD8+. La dermis subyacente es anatómicamente más compleja y posee una mayor diversidad celular. Contiene diversas células inmunes especializadas, incluidas las células dendríticas, los linfocitos T CD4+, los linfocitos T  $\gamma\delta$ , células T asesinas naturales (NKT), macrófagos, mastocitos y fibroblastos. La dermis se drena por conductos linfáticos y vasculares, a través de los cuales las células migratorias pueden circular <sup>50</sup> **(Imagen 8)**.

La función protectora de la piel se vuelve evidente cuando esta barrera se interrumpe después de una lesión. Una vez que la barrera se interrumpe, la respuesta inmune innata, rápida pero no específica, se recluta en defensa, un proceso que depende de la detección de "señales de peligro" propias y ajenas como alarma inicial. Posteriormente, puede requerirse la respuesta inmune adaptativa más lenta pero específica para la eliminación definitiva de un patógeno <sup>51</sup>.

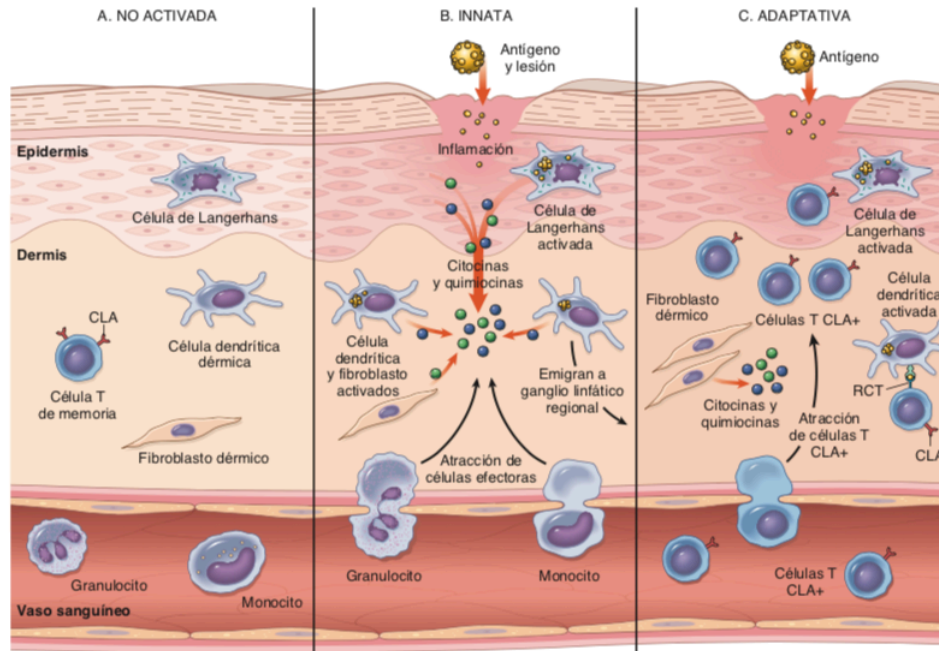


**Imagen 8. Anatomía de la piel y efectores celulares.** Las células especializadas en la epidermis incluyen melanocitos que producen pigmento (melanina), células de Langerhans, y linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> localizados en el estrato basal y el estrato espinoso. En la dermis se encuentran células especializadas, como los subconjuntos de células dendríticas (DC), que incluyen DC dérmicas y DC plasmocitoides (pDC) y subconjuntos de células T, incluidas CD4 + Th1 (T<sub>H</sub>1), células T<sub>H</sub>2 y T<sub>H</sub>17, células T γδ y células T asesinas naturales (NKT). Además, están presentes macrófagos, mastocitos y fibroblastos. Vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (no mostrados) también están presentes en toda la dermis.

Los mecanismos de defensa inmunitaria de la piel se pueden dividir en dos categorías: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa (**Imagen 9**)<sup>52</sup>.

La inmunidad innata constitutiva consiste en: la flora cutánea normal, queratinocitos cornificados, polipéptidos y lípidos antimicrobianos expresados constitutivamente, un nivel de pH bajo y temperatura corporal normal. Bajo ciertas circunstancias, la lesión cutánea ocurre sin exceder la capacidad inherente de la inmunidad constitutiva, y la inflamación seguida de la reparación del tejido es suficiente para manejar el daño. Sin embargo, si la interrupción de la barrera cutánea constitutiva permite una penetración significativa de microorganismos o patógenos comensales, las moléculas de inmunidad innata con amplia especificidad y actividad relativamente dirigida contra los microbios intrusos evitan la diseminación de la infección y, cuando es necesario, guían la inmunidad adquirida. Estas moléculas dirigidas a patógenos

incluyen: polipéptidos antimicrobianos (defensinas y catelicidinas), proteínas activadoras de complemento, opsoninas, proteínas del complemento y receptores reconocedores de patrones (PRRs)<sup>53</sup>.



**Imagen 9.** A. En ausencia de inflamación, la piel contiene varias células inmunitarias, algunas estacionarias y otras transitorias, que vigilan el entorno y están preparadas para responder. B. La respuesta innata a la lesión epitelial o a la presentación de antígeno activa las células inmunitarias residentes, que a su vez atraen células efectoras inespecíficas, como neutrófilos y eosinófilos. C. La respuesta adaptativa se activa cuando el antígeno presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad es reconocido de modo específico por las células T y como consecuencia son atraídas células T residentes en la piel específicas de antígeno (CLA+). RCT, receptor de célula T.

Diferentes patógenos y antígenos conducen a diferentes patrones de expresión génica del huésped e influyen en el grado y la composición del infiltrado de células inmunitarias.

En general, la respuesta inflamatoria aguda conduce a la activación de las células residentes y al aumento de la accesibilidad de los componentes sanguíneos y los leucocitos al sitio de la incursión patógena. Funciona de forma sinérgica con varias subclases de PRRs para mejorar la eliminación directa y el aclaramiento de patógenos como parte de la inmunidad innata inducible en la piel<sup>53</sup>. Los componentes de la inmunidad adaptativa de la piel son una serie de mecanismos antígeno-específicos realizados por varios componentes celulares de la epidermis y la dermis,

cuyas características clave son la especificidad y la memoria. Los linfocitos CLA+ de la piel son CD4+ o CD8+ ; los CD4+ predominan en la dermis y se localizan principalmente alrededor de los vasos, mientras que los CD8+, en la epidermis <sup>54</sup>.

### **1.2.3 Métodos de investigación biomédica para el estudio y análisis de la piel**

Aunque la mayoría de las enfermedades de la piel se pueden diagnosticar con una simple inspección visual, la investigación de laboratorio es necesaria en ciertas circunstancias clínicas y en el estudio de fenómenos desconocidos. Entre los métodos de análisis de la piel se encuentran: el uso de la lámpara de Wood, citodiagnóstico de Tzanck, toma de biopsia y análisis bajo el microscopio, inmunohistoquímica, citometría de flujo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aislamiento celular, cultivo celular, entre otras <sup>55</sup>.

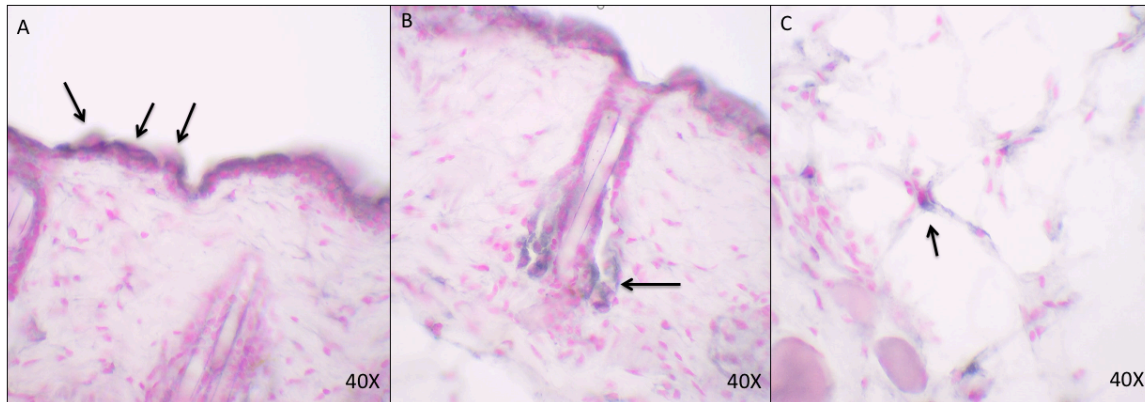
#### **1.2.3.1 Técnica histológica**

Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico cuyos procesos vitales se han detenido y es necesario conservar la estructura que tenían en vida (en este caso a una biopsia o necropsia de piel), con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios fotónicos y electrónicos <sup>56</sup>.

#### **1.2.3.2 Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) es una prueba de laboratorio que utiliza anticuerpos para detectar ciertos antígenos (marcadores) en una muestra de tejido. Los anticuerpos suelen estar unidos a una enzima o un colorante fluorescente. Cuando los anticuerpos se unen al antígeno en la muestra de tejido, la enzima o colorante se activa, y el antígeno se puede observar bajo un microscopio. Con esta técnica se pueden identificar poblaciones celulares específicas y moléculas intracelulares, transmembranales o intersticiales específicas <sup>57</sup> (**Imagen 10**).





**Imagen 10. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-MOMA2 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano.** Se observa la presencia de células inmunomarcadas MOMA2+ en las tres capas de la piel (flechas negras). **A.** Células MOMA2+ en la epidermis. **B.** Dermis. **C.** Hipodermis. (González-Mireles AF, Limón-Flores AY, 2018).

### 1.3 Radiación Electromagnética

#### 1.3.1 Generalidades

La luz ultravioleta, las ondas de radio, la luz visible y la radiación infrarroja son formas de radiación electromagnética. La radiación electromagnética es una forma de energía emitida por el Sol que viaja a través del espacio en forma de campos eléctricos y magnéticos oscilantes y en esa forma llega a la Tierra <sup>58</sup>. Estas ondas eléctricas y magnéticas viajan perpendiculares entre sí y tienen ciertas características, que incluyen amplitud, longitud de onda y frecuencia, de esto depende el nivel de energía de la onda <sup>59</sup>.

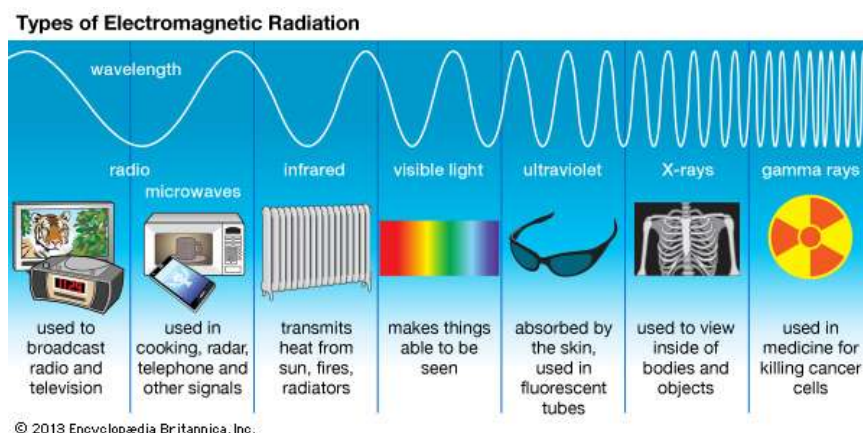
#### 1.3.2 Longitud de onda, frecuencia y energía

La radiación electromagnética (EM) se describe en términos de su longitud de onda, frecuencia o energía. Toda la energía electromagnética viaja a la velocidad de la luz. Las ondas largas tienen una frecuencia baja y las ondas cortas tienen una frecuencia alta. La longitud de onda y la frecuencia también indican la energía de la onda. La radiación electromagnética con

longitudes de onda más cortas es más energética. Existe una relación directa; La radiación electromagnética con una frecuencia más alta es más energética <sup>60</sup>.

### 1.3.3 El espectro electromagnético

El espectro electromagnético está dividido en varias secciones; Los nombres se asignan a los diferentes rangos. Los rayos gamma y los rayos X son los tipos de EM con la longitud de onda más corta, las frecuencias más altas y, en consecuencia, la energía más alta. En el otro extremo del espectro están las ondas de baja energía. En el orden del aumento de la energía, estos incluyen ondas de radio, ondas de televisión, microondas y ondas de radar. La energía que conocemos como luz visible es la mitad del espectro. La luz más baja de la energía es infrarroja, seguida por visible y ultravioleta. El ojo humano es capaz de discriminar entre ondas EM de diferente energía en el rango visible entre aproximadamente 400 y 700 nm en longitud de onda. El espectro de luz visible aparece como los diferentes colores: rojo, naranja, amarillo, verde, azul y violeta. Dentro de la gama visible, la luz roja tiene la energía más baja y violeta la más alta <sup>60</sup> (**Imagen 11**)<sup>61</sup>.



**Imagen 11. Espectro electromagnético.** Las ondas de radio, los rayos infrarrojos, la luz visible, los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma son tipos de radiación electromagnética. Las ondas de radio tienen la longitud de onda más larga y los rayos gamma tienen la longitud de onda más corta.

### **1.3.4 Absorción y emisión de energía por átomos y moléculas**

Los electrones se encuentran en varios niveles de energía discreta dentro de un átomo. Los electrones son partículas muy pequeñas y los niveles de energía electrónica están muy separados. Los electrones que ocupan los niveles de energía más cercanos al núcleo tienen la energía más baja; A medida que uno se mueve hacia los niveles de energía externos, los electrones tienen cantidades de energía progresivamente mayores. Ciertos tipos de radiación EM son absorbidos por los átomos o moléculas expuestas y los mueven a un estado de mayor energía o excitación, en ocasiones desestabilizando la estructura molecular. Los átomos o moléculas en un estado excitado emiten un exceso de energía para regresar al estado fundamental. El exceso de energía puede perderse por la producción de calor o la emisión de radiación <sup>60</sup>.

### **1.3.5 Radiación ultravioleta**

La radiación ultravioleta (UV) es radiación electromagnética con longitud de onda entre 100 y 400 nm y se divide en tres bandas: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (100-280 nm). A medida que la luz solar (principal fuente de radiación ultravioleta) pasa a través de la atmósfera, toda la radiación UVC y aproximadamente el 90% de la radiación UVB es absorbida por el ozono, el vapor de agua, el oxígeno y el dióxido de carbono. La radiación UVA es menos afectada por la atmósfera. Por lo tanto, la radiación UV que llega a la superficie de la Tierra está compuesta en gran parte de UVA con un pequeño componente UVB <sup>62</sup>.

En cantidades pequeñas, la radiación ultravioleta es benéfica para la salud y desempeña una función esencial en la producción de vitamina D. Sin embargo, la exposición excesiva a ella se relaciona con el desarrollo de cáncer de piel, quemaduras de sol, envejecimiento acelerado de la piel, cataratas y otras enfermedades oculares y una disminución en la eficacia del sistema inmunitario <sup>63</sup>.

La radiación UV tiene suficiente energía para romper los enlaces químicos. Debido a sus energías superiores, los fotones UV pueden causar ionización, un proceso en el cual los electrones se separan de los átomos. La vacante resultante afecta las propiedades químicas de los átomos y hace que formen o rompan enlaces químicos que de otra manera no harían. Esto puede ser útil para el procesamiento químico, o puede dañar materiales y tejidos vivos. Este daño puede ser benéfico, por ejemplo, en la desinfección de superficies, pero también puede ser dañino, particularmente para la piel y los ojos <sup>64</sup>.

#### **1.3.5.1 Índice de luz ultravioleta**

La cantidad de luz ultravioleta que alcanza el suelo en cualquier lugar depende de un número de factores, incluyendo la hora del día, la temporada del año, la elevación, y la formación nubosa. Para ayudar a las personas a entender mejor la intensidad de la luz ultravioleta en su área en un día determinado, el *National Weather Services* y la *Environmental Protection Agency* han creado el índice de luz ultravioleta. Este índice le proporciona a las personas una idea de cuán intensa es la radiación ultravioleta en el área donde viven en una escala de 1 al 11+. Un mayor número significa un riesgo más alto de exposición a los rayos UV, y una mayor probabilidad de quemadura solar y daño a la piel <sup>65</sup>.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Respuesta inmune en la leishmaniosis cutánea

La respuesta inmunológica comienza cuando *Leishmania* es inoculada en forma de promastigote metacíclico a 0.1 mm de profundidad en la piel, tras la picadura del mosquito transmisor infectado. La ruptura celular producida por la picadura del flebótomo activa en el hospedero un proceso inflamatorio con el objetivo de reparar el tejido lesionado y la presencia del parásito activa un proceso de defensa. La piel representa la vía de entrada y por lo tanto los mecanismos de defensa inmunitaria cutáneos son la primer barrera de defensa contra *Leishmania* <sup>66</sup>.

#### 2.1.1 Fase temprana de la infección y respuesta inmune innata.

Durante los primeros 30 minutos tras ser inoculado el parásito, *Leishmania* es fagocitada por células dendríticas residentes de la dermis y neutrófilos en el microambiente cutáneo. Sin embargo, la mayoría de las células que serán infectadas durante los siguientes días son monocitos y macrófagos infiltrantes <sup>67,68</sup>. Los neutrófilos infectados experimentan cambios fisiológicos, uno de ellos es la sobreproducción de la quimiocina reclutadora de monocitos, MIP-1 $\beta$ . Posterior a esto, los neutrófilos entran en apoptosis y son fagocitados por macrófagos, lo que lleva a la producción de citocinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  y una reducida producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ . Esto lleva al establecimiento de un microambiente anti-inflamatorio lo cual permite la supervivencia del parásito dentro del macrófago <sup>69</sup>. Las células dendríticas de la dermis también participan en la fagocitosis de los neutrófilos infectados apoptóticos, lo cual resulta en una disminución en la capacidad de presentación de antígenos de *Leishmania*, disminución en la expresión de marcadores

superficiales de activación y disminución en la habilidad de activar células T CD4+ <sup>67</sup>. Así, *Leishmania* utiliza a los neutrófilos como “Caballos de Troya” para infectar macrófagos y células dendríticas y establecer la fase inicial de la infección cutánea <sup>67,70</sup>. Es probable que los neutrófilos sean reclutados por una vía IL-17 dependiente, esto demostrado experimentalmente en ratones deficientes de IL-17 (IL-17-/-) al observar una disminución en el reclutamiento de neutrófilos <sup>71</sup>. Las primeras 4-5 semanas de infección se caracterizan por ser una fase de multiplicación parasitaria rápida sin desarrollo manifiesto de patología cutánea <sup>72</sup>.

La segunda etapa de infección, posterior a la fase silente, comienza a las 5 semanas post-infección <sup>72</sup>. En experimentos realizados en ratones infectados con *Leishmania* se ha demostrado el inicio de la segunda fase a la par del desarrollo de una lesión visible. Durante esta fase hay un influjo de neutrófilos, células dendríticas y macrófagos al sitio de la lesión <sup>72</sup>. Ultimadamente, los macrófagos son las células preferidas por el parásito para sobrevivir y replicarse. El aclaramiento del parásito está determinado por la capacidad de los macrófagos de producir óxido nítrico (NO) a través de su activación por la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS). Además de NO, la producción de otros intermediarios oxidativos por los macrófagos activados, complementa su actividad leishmanicida. Los macrófagos activan la producción de óxido nítrico a través de su estimulación con citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Por otro lado, citocinas como IL-4, IL-10, IL-13, y TGF- $\beta$  disminuyen la producción de NO, por consiguiente atenuan la capacidad leishmanicida de los macrófagos <sup>73</sup>.

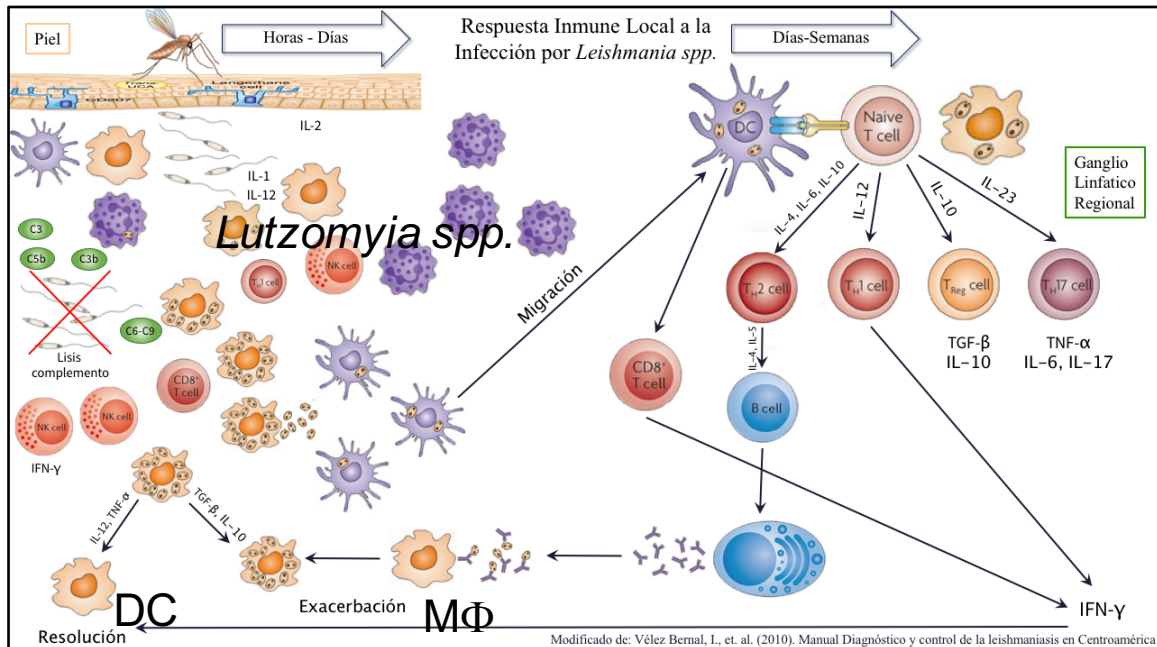
### **2.1.2 Fase tardía de la infección y respuesta inmune adaptativa.**

A la par del desarrollo de la lesión se observa la presencia aumentada de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> en el sitio de la lesión cutánea <sup>74</sup>. Las células dendríticas son células presentadoras de

antígeno vitales que participan en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa. El hecho de que el reclutamiento de las células dendríticas en la lesión coincida con un incremento en la producción de IFN- $\gamma$ , indica que éstas células contribuyen al desarrollo de la respuesta inmune protectora en el sitio de la infección y en los ganglios linfáticos regionales <sup>72</sup>. Las células dendríticas de manera preferencial fagocitan al parásito en su forma de amastigote en vez de promastigote, posteriormente lo procesan y presentan a las células T en el contexto de las moléculas clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad <sup>75,76</sup>. Más adelante, la fagocitosis de amastigotes de *Leishmania* lleva a la liberación de IL-12 lo que dirige la diferenciación de células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> Th0 al subtipo de célula T CD4<sup>+</sup> Th1 productoras de IFN- $\gamma$  <sup>76</sup>. Células T CD8<sup>+</sup> *Leishmania*-específicas también son activadas y contribuyen a la producción de IFN- $\gamma$  en ganglios linfáticos regionales y microambiente de la lesión. La eliminación del parásito en los macrófagos es promovida por el IFN- $\gamma$  producido por linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados <sup>76</sup> (**Imagen 12**) <sup>77</sup>.

### **2.1.3 Papel de las Células T**

Un gran cuerpo de evidencia indica la existencia de células funcionalmente polarizadas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> basado en su perfil de secreción de citocinas. Las células T cooperadoras tipo 1 (Th1) producen IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$ , estas citocinas tienen la función de activar macrófagos y son responsables de la inmunidad celular y de las respuestas protectoras dependientes de los fagocitos. Por otro lado, las células T cooperadoras de tipo 2 (Th2) producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, son responsables de la producción de anticuerpos, la activación de eosinófilos y la inhibición de varias funciones de macrófagos <sup>78</sup>. En ratones infectados experimentalmente con *Leishmania major*, se ha demostrado extensamente que la proliferación de linfocitos Th1 conduce a la resolución de la infección, pero la proliferación de linfocitos Th2 favorece al



**Imagen 12. Respuesta inmune local contra *Leishmania spp.*** La lesión producida por la *Lutzomyia spp* al picar al mamífero induce una respuesta inflamatoria con el fin de reparar el tejido lesionado, favoreciendo la activación de la cascada del Complemento y la migración de células inmunológicas como polimorfonucleares, neutrófilos (PMN), y macrófagos (MΦ). Los promastigotes inyectados por el vector en el sitio de la picadura son eliminados por el Complemento (C5-C9), mientras que otros son opsonizados por el C3, favoreciendo su entrada en los MΦ tisulares. Otros parásitos pueden infectar PMN para que posteriormente sean fagocitados por los MΦ. Al interior del MΦ los promastigotes se transforman en amastigotes y se multiplican profusamente, favoreciendo la lisis de los MΦ infectados. Los amastigotes libres son internalizados por otros MΦ o por células dendríticas (DC) adyacentes. Dependiendo de la carga parasitaria y del estado inmunológico del hospedero, los MΦ pueden ser capaces de eliminar los amastigotes y resolver la infección o por el contrario ser incapaces de activar sus mecanismos microbicidas, favoreciendo el desarrollo de la lesión en el tejido infectado. Las DC que han internalizado amastigotes en el tejido y los MΦ infectados migran a los ganglios linfáticos donde presentan los antígenos (Ag) a los linfocitos T ya sean cooperadores (Th0) o citotóxicos (CD8+). Dependiendo del tipo de Ag, de la célula presentadora de antígeno, y del influjo de citoquinas que están presentes en el momento de la activación de los LT, se induce la diferenciación de los linfocitos Th0 en cualquiera de las diferentes subpoblaciones de Th, tanto Th1 como Th2, Th17 o T reguladoras (Treg). Los Th1 y Tc activados producen IFN- $\gamma$  que activa la respuesta microbicida del MΦ lo que favorece la eliminación de los parásitos y por ende la resolución de la lesión (curación). A su vez, los Th2 activados producen citoquinas que activan los Linfocitos B (LB) para que se transformen en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Acs). La presencia de Acs se asocia con la exacerbación de la lesión ya que favorece el ingreso de los promastigotes y los amastigotes a otros MΦ. Por su parte, los Th17, aunque aún no es claro su papel, al parecer favorecen el reclutamiento de PMN al sitio de la lesión, permitiendo que perdure el estímulo inflamatorio.

MΦ

establecimiento y exacerbación de la enfermedad <sup>79</sup>. Se ha demostrado que después de la infección por *Leishmania* los linfocitos T CD8+ responden a los péptidos presentados en el contexto de MHC-I y proliferan, lo que lleva a la formación de una población de linfocitos T



CD8+ *Leishmania*-específicos. La función efectora de éstas células depende de la especie de *Leishmania* infectante, el modelo de ratón empleado y el sitio de la lesión del hospedero <sup>80</sup>. Los primeros estudios experimentales que abordaron la importancia de las células T CD8+ en la leishmaniosis sugirieron que las células T CD8+ no tenían ningún papel en la protección. En estos estudios infectaron ratones deficientes de células CD8+ con *Leishmania major* o *Leishmania mexicana* y observaron que los ratones resolvían la lesión a la par de ratones WT infectados <sup>81,82</sup>. Más adelante se establecieron nuevos modelos de infección que simulaban una infección natural y revelaron que las células T CD8+ desempeñan un papel en la protección a través de la producción de IFN- $\gamma$  <sup>83</sup>. La evidencia actual indica que la producción de IFN- $\gamma$  por células CD4+ Th1 y por células T CD8+ contribuye a la protección a largo plazo contra leishmaniosis cutánea <sup>84</sup>.

#### **2.1.4 Papel de las Células Dendríticas**

En el desarrollo de la respuesta inmune contra *Leishmania*, influyen factores intrínsecos al parásito y al hospedero; de particular importancia es el tipo participante de célula presentadora de antígeno. Se ha observado que durante la fase temprana de la infección con *Leishmania* hay muy pocas células T en el sitio de la infección. Esto sugiere que es poco probable que los macrófagos infectados encuentren células T específicas necesarias para la eliminación del parásito, por lo tanto, son las células de Langerhans las que proporcionan la señal que activa las células T específicas para *Leishmania* en los ganglios linfáticos regionales que drenan de la lesión e inducen su migración al sitio de lesión <sup>85</sup>. La infección de células dendríticas por *L. mexicana* parece afectar los mecanismos celulares e inmunológicos necesarios para el desarrollo de una respuesta inmune eficaz y protectora, favoreciendo así la supervivencia y propagación del parásito dentro de su huésped <sup>86</sup>. En modelos de infección por *L. mexicana* se ha observado

un insuficiente reclutamiento, activación y migración de monocitos y células dendríticas a los ganglios linfáticos regionales, lo cual resulta en una insuficiencia de respuesta tipo Th1 <sup>87</sup>.

### **2.1.5 Papel de los Macrófagos**

Durante los primeros 30 minutos tras ser inoculado el parásito, *Leishmania* es fagocitada por células dendríticas residentes de la dermis y neutrófilos infiltrantes en el microambiente cutáneo. Sin embargo, la mayoría de las células que serán infectadas durante los siguientes días son monocitos y macrófagos infiltrantes <sup>67,68</sup>. Los neutrófilos infectados experimentan cambios fisiológicos, entran en apoptosis, y son fagocitados por macrófagos lo que lleva a la producción de citocinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  y una reducida producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ . Esto lleva al establecimiento de un microambiente anti-inflamatorio lo cual permite la supervivencia del parásito dentro del macrófago <sup>69</sup>. Así, *Leishmania* utiliza a los neutrófilos como “Caballos de Troya” para infectar macrófagos y células dendríticas y establecer la fase inicial de la infección cutánea <sup>67,70</sup>. Los macrófagos son las células preferidas por el parásito para sobrevivir y replicarse. El aclaramiento del parásito está determinado por la capacidad de los macrófagos de producir óxido nítrico (NO) a través de su activación por la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS). Además de NO, la producción de otros intermediarios oxidativos por los macrófagos activados, complementa su actividad leishmanicida. Los macrófagos activan la producción de óxido nítrico a través de su estimulación con citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Por otro lado, citocinas como IL-4, IL-10, IL-13, y TGF- $\beta$  disminuyen la producción de NO, por consiguiente atenúan la capacidad leishmanicida de los macrófagos <sup>73</sup>.

### **2.1.6 Papel de IL-10**

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que puede ser producida por diferentes células del

sistema inmune. Durante la infección por *L. mexicana*, inhibe la actividad de las células Th1, células NK y macrófagos, componentes necesarios para la eliminación óptima de agentes patógenos pero que también contribuyen al daño tisular. En consecuencia, la IL-10 puede impedir el aclaramiento del patógeno y mejorar la inmunopatología. La infección en ratones C57BL/6 con *Leishmania mexicana* se asocia con una respuesta inmune inefectiva y al desarrollo de enfermedad crónica. En estudios experimentales utilizando ratones C57BL/6 modificados genéticamente deficientes en la producción de IL-10 (IL-10 <sup>-/-</sup>) infectados con *Leishmania mexicana* se demostró la importancia que tiene IL-10 en el establecimiento de la infección. En los ratones IL-10<sup>-/-</sup> se observó una disminución en el tamaño de la lesión en función del tiempo, a la par de una eliminación efectiva del parásito reflejada por la disminución de la carga parasitaria en comparación con ratones WT. Además presentaron un aumento en el nivel de IFN- $\gamma$  y la producción de óxido nítrico, en comparación con ratones WT <sup>88</sup>. Otro estudio subsecuente utilizando un modelo de infección similar, ratones C57BL/6 y *L. mexicana*, demostró que la IL-10 específicamente producida por células T y no por macrófagos o granulocitos, es requerida para el desarrollo de enfermedad crónica. A la IL-10 se le atribuye un papel directo en el establecimiento y cronicidad de la leishmaniosis cutánea por *Leishmania mexicana* <sup>89</sup>.

### **2.1.7 Papel de IFN- $\gamma$**

Estudios seminales en los que utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 y BALB/c infectados con el parásito *L. major*, correlacionaron el control de la carga parasitaria y la resolución con la producción de IFN- $\gamma$  por parte de células T CD4<sup>+</sup> y el desarrollo de una infección descontrolada con la ausencia de IFN- $\gamma$  en ratones C57BL/6 y BALB/c, respectivamente <sup>90,91</sup>. En un estudio reciente realizado en ratones C57BL/6 modificados genéticamente deficientes en la producción

de IL-10 (IL-10  $-/-$ ) e infectados con *L. mexicana*, se demostró que éstos resuelven la lesión y exhiben un aumento en el nivel de IFN- $\gamma$  y la producción de óxido nítrico, en comparación con ratones no modificados genéticamente <sup>88</sup>. En estudios previos se había demostrado que ratones C57BL/6 modificados genéticamente deficientes en la producción de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$   $-/-$ ) o en el receptor para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  R  $-/-$ ) infectados con *L. major*, se volvían altamente susceptibles a la infección y se observaba una expansión de la respuesta tipo Th2 <sup>92</sup>. Antagónico a IL-10, estos estudios demuestran que IFN- $\gamma$  juega un papel clave en la eliminación del parásito y la resolución de la infección, y a la inversa, su ausencia induce susceptibilidad a la infección y permite expansión de una respuesta tipo Th2 <sup>92, 93</sup>.

### **2.1.8 Papel de los Mastocitos**

Los mastocitos se han estudiado principalmente en el contexto de las enfermedades alérgicas, sin embargo, la importancia de esta célula en la defensa del hospedero contra varios patógenos ya se ha establecido. El mastocito tiene un "armamento" único de receptores y mediadores para responder a señales asociadas a patógenos. Se caracteriza por tres propiedades: una, producción rápida y selectiva de mediadores para provocar respuestas innatas protectoras y respuestas fisiológicas; dos, la capacidad de mejorar el reclutamiento de células efectoras; y tres, la capacidad para modificar las respuestas a una infección posterior a través de la activación dependiente de anticuerpos e inmunidad adquirida <sup>94</sup>. Poco se sabe acerca del papel del mastocito en la defensa contra *Leishmania*. En un estudio reciente realizado en ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana*, se realizó un análisis de la cantidad de mastocitos y porcentaje de degranulación en el sitio de la lesión. Se demostró que los mastocitos reconocen el LPG de la superficie del parásito a través de TLR2, son reclutados al sitio de la lesión, se degranulan y participan en la regulación del desenlace de la enfermedad a través de la producción de TNF- $\alpha$ ,

IL-10 y MIP-1 $\alpha$  citocinas que regulan la inflamación y mantienen un número elevado de células inmunitarias en las lesiones <sup>95, 96</sup>. En otro estudio realizado en ratones C57BL/6 genéticamente modificados deficientes de mastocitos WBB6F<sub>1</sub>-*W/W<sup>v</sup>* infectados con *L. major*, observaron que los mastocitos aumentan significativamente la intensidad y el tamaño máximo de las lesiones y en algunos casos prolongaron sustancialmente la persistencia de las infecciones <sup>97</sup>. Adjudicándole a los mastocitos un papel de promotores de una afluencia sostenida de células al sitio de la lesión en la infección cutánea por *Leishmania*.

## **2.2 Radiación UV y la piel.**

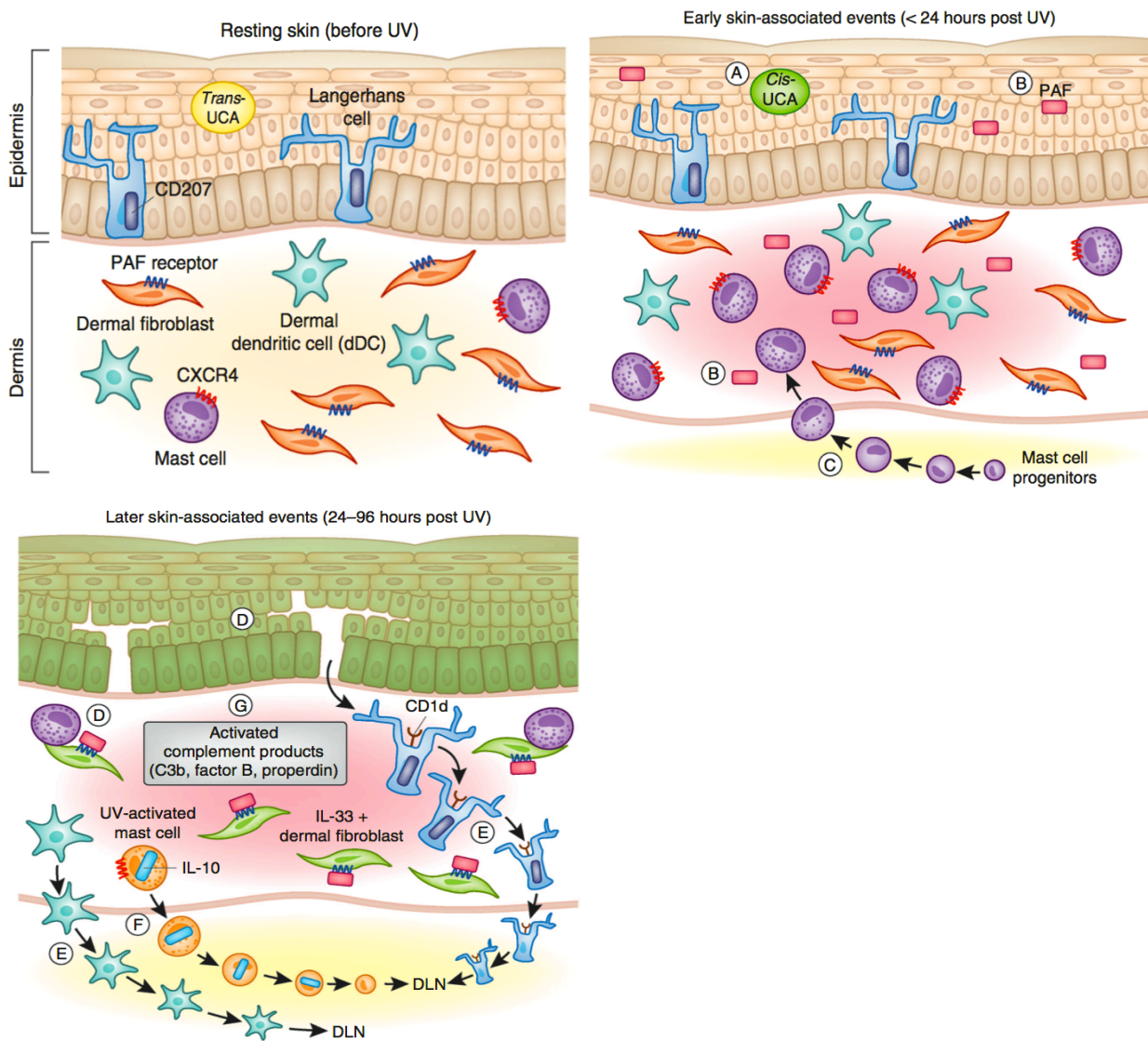
### **2.2.1 Mecanismos Inmunosupresores por UVB**

La naturaleza energética de la radiación electromagnética como fenómeno físico le permite incidir sobre los átomos de los enlaces químicos moleculares de las células y puede participar en la formación o ruptura de ellos <sup>64</sup>. Cuando la luz UV llega a la piel, una parte se remite por reflexión y dispersión, y otra parte se absorbe transfiriendo la energía electromagnética de la UVB a las moléculas dentro del tejido. Las moléculas que absorben la luz se llaman cromóforos. La energía electromagnética de UVB se transforma en energía química por absorción. Este paso es el evento fotobiológico más crítico. Lleva a la molécula receptiva a un estado excitado, lo que permite cambios conformacionales o incluso una nueva formación de los enlaces covalentes. Por consecuencia, esto puede cambiar su funcionalidad. Las moléculas que han sufrido cambios estructurales inducidos por la absorción de luz se denominan fotoproductos. La radiación UVB es absorbida en su mayor parte por los cromóforos en las capas superiores de la piel <sup>98</sup>. Debido a que la epidermis construye la capa más externa de la piel, la mayoría de los

efectos inducidos por UVB tienen lugar aquí. El daño al ADN, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cambios en la membrana celular y la isomerización del ácido trans-urocánico a su conformación cis- dentro del estrato córneo se identifican como los primeros efectos directamente inducidos por la radiación UVB, algunos de ellos inmunosupresores <sup>99</sup>. Después de ser absorbida por cromóforos, la energía tiene repercusiones en eventos celulares primarios. Los queratinocitos expuestos a UVB modulan la molécula de adhesión ICAM-1 y sintetizan un conjunto de citocinas, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y PGE2. Estas citocinas son responsables de la aparición de inflamación, dando señales quimiotácticas a los neutrófilos y macrófagos en la piel <sup>100, 101</sup>. La IL-1 inducida por UVB a partir de queratinocitos humanos aumenta la síntesis de PGE2, que se sabe es capaz de suprimir la respuesta de hipersensibilidad por contacto (CHS). TNF- $\alpha$  e IL-10, dos citocinas inmunosupresoras potentes también son producidas por queratinocitos. IL-10 también es liberado por macrófagos CD11b + en piel humana. IL-10 es una citocina de linfocitos Th2 y anula la producción de citocinas de linfocitos Th1, en particular IFN- $\gamma$ . La producción de IL-10 inducida por UVB por queratinocitos en modelos murinos o macrófagos en piel de humanos cambia la predominancia de la respuesta inmunitaria de un tipo Th1 a uno Th2. Esto puede explicar por qué las reacciones inmunitarias celulares mediadas por Th1 se ven afectadas por la radiación UV <sup>99</sup>. La exposición a rayos UV provoca una cascada de citocinas, que comienza con PAF, posteriormente PGE2, IL-4 e IL-10. De este modo las respuestas Th1 se desactivan, ultimadamente resultando en una inmunosupresión sistémica inducida por UVB <sup>102</sup>.

En experimentos de transferencia adoptiva, se demostró que la UVB induce células T reguladoras; en estos trabajos, se prepararon suspensiones celulares del bazo y ganglios linfáticos de ratones expuestos a UVB y previamente tratados con haptenos, posteriormente se

inyectó la suspensión celular en ratones sin un tratamiento previo. Cuando los ratones receptores se sensibilizaron y retaron con el mismo hapteno que se usó para los ratones donantes, mostraron respuestas de CHS significativamente deterioradas <sup>103</sup>. Otros eventos locales y regionales que se desencadenan tras la exposición a dosis inmunosupresoras de UVB se resumen en la (**Imagen 13**) <sup>104</sup>.



### 3. Justificación

La leishmaniosis sigue siendo un problema importante de salud pública global y está clasificada como “Categoría I” por el Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (TDR/OMS), principalmente debido a la ausencia de control sobre esta enfermedad.

No se conoce el efecto de la inmunosupresión local con luz UVB en la infección por *Leishmania mexicana*.

Existen pocos estudios enfocados en la determinación del mecanismo inmune involucrado en la resolución de la leishmaniosis cutánea causada por la especie de *L. mexicana*, así como los posibles factores ambientales, como la radiación solar que podrían contribuir en el establecimiento de la misma mediante mecanismos inmunosupresores.

Actualmente no existe un modelo de infección experimental en ratones de la cepa C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana* en la región dorsal del tronco, ni la descripción del microambiente inmunológico de la lesión bajo estas circunstancias.



#### **4. Hipótesis**

La inmunosupresión inducida por UVB favorece al establecimiento y cronicidad de leishmaniosis cutánea.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Determinar si la inmunosupresión local por UVB exagera la infección por *Leishmania mexicana*.

### 5.2 Objetivos Específicos

- 1- Determinar la dosis óptima de promastigotes de *Leishmania mexicana* necesaria para generar infección cutánea en ratones C57BL/6.
- 2- Determinar la dosis de radiación ultravioleta UVB capaz de inmunosuprimir la respuesta inmune local en contra de antígenos de *Leishmania mexicana*.
- 3- Cuantificar la carga parasitaria en las lesiones cutáneas de ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados.
- 4- Evaluar la respuesta inmune en las lesiones de ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados.

## 6. Estrategia General

### 6.1 Objetivo 1 - Determinar la dosis óptima de promastigotes de *Leishmania mexicana* necesaria para generar infección cutánea en ratones C57BL/6.

#### Determinación del día del cultivo en el que el parásito es más infectante:



**Estrategia experimental para determinar el día del cultivo en el que el parásito es más infectante.** Se formaron 4 grupos de 3 ratones cada grupo y se infectó con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *Leishmania mexicana* a cada ratón en diferentes días de cultivo. Las infecciones se realizaron por vía intradérmica en la región dorsal del tronco. Se midieron las lesiones cada 5 días durante 30 días.

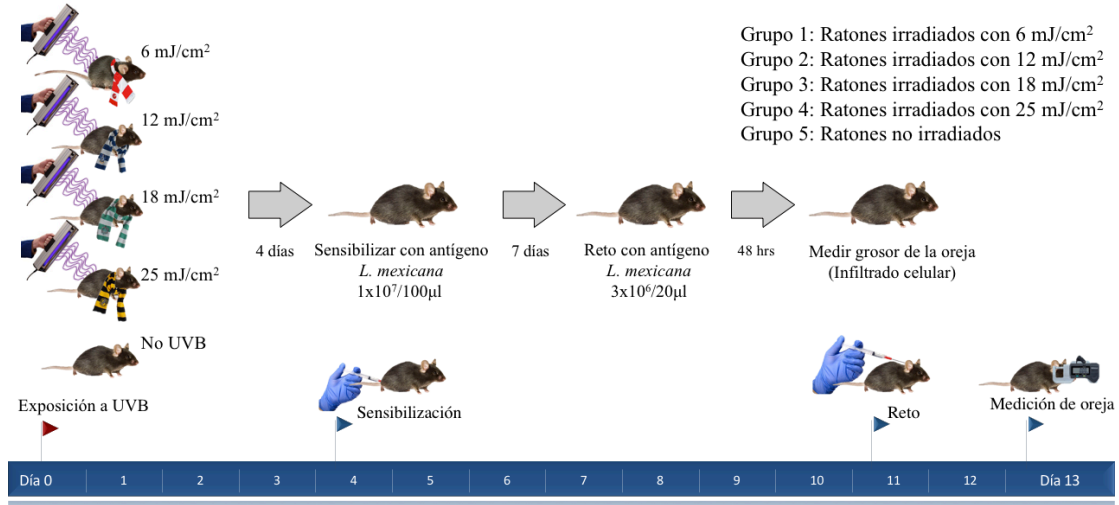
#### Determinación de la dosis de parásitos mínima infectante



**Estrategia experimental para determinar la dosis de parásitos mínima infectante.** Se formaron 4 grupos de 3 ratones cada grupo y se infectaron con distintas dosis de promastigotes de *Leishmania mexicana* en el día 9 de cultivo. Las infecciones se realizaron por vía intradérmica en la región dorsal del tronco. Se midieron las lesiones cada 5 días durante 30 días.

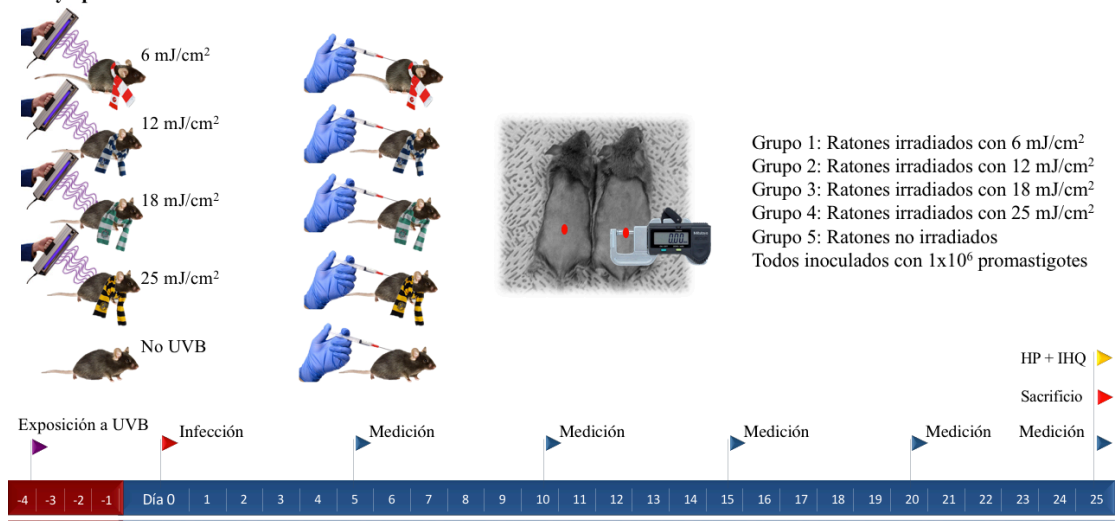
## 6.2 Objetivo 2 - Determinar la dosis de radiación ultravioleta UVB capaz de inmunosuprimir la respuesta inmune local en contra de antígenos de *Leishmania mexicana*.

### Ensayo para evaluar la dosis de UVB inmunosupresora



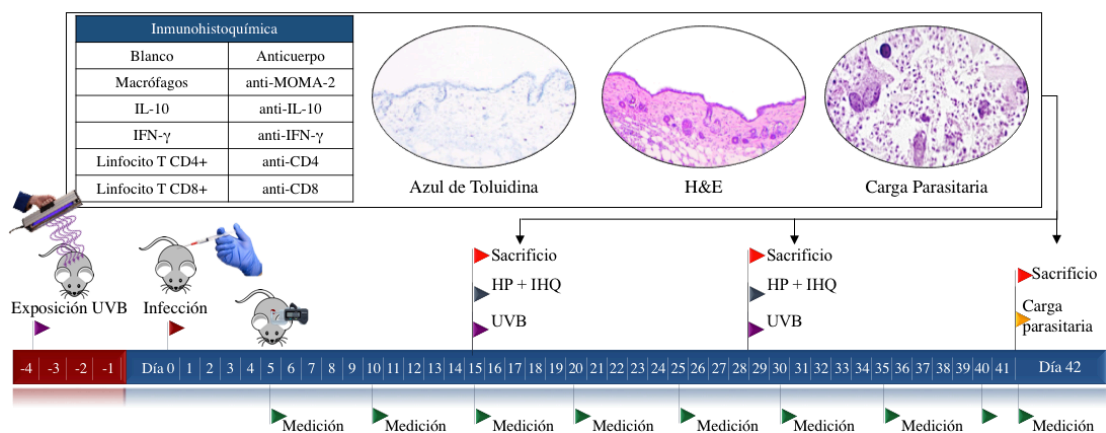
**Estrategia experimental para determinar la dosis de UVB inmunosupresora.** Se formaron 5 grupos de 4 ratones cada grupo y se expusieron a distintas dosis de radiación UVB. Posteriormente se realizó un ensayo de reacción de hipersensibilidad tardía. La sensibilización se realizó 4 días después de la exposición a UVB utilizando 1x10<sup>7</sup> de antígenos de *L. mexicana*, se inocularon 5x10<sup>6</sup> en cada flanco de los ratones por vía subcutánea. El reto se realizó 7 días más adelante, inoculando 3x10<sup>6</sup> antígenos por vía intradérmica en la oreja derecha de los ratones. 48 horas más adelante se realizó la medición de la oreja (condiciones previamente estandarizadas).

### Ensayo para evaluar la evolución de la infección en ratones radiados con distintas dosis de UVB



**Estrategia experimental para evaluar la evolución de la infección en ratones radiados con distintas dosis de UVB.** Se formaron 5 grupos de 4 ratones cada grupo y se expusieron a distintas dosis de radiación UVB. Posteriormente se infectaron con 1x10<sup>6</sup> promastigotes por vía intradérmica en la región dorsal del tronco y se dio seguimiento durante 25 días. En el día 25 se sacrificaron los ratones y se analizó el tejido de la lesión. HP: Análisis histopatológico. IHQ: Inmunohistoquímica.

**6.3 Objetivo 3 y 4** - Cuantificar la carga parasitaria en las lesiones cutáneas de ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados. Evaluar la respuesta inmune en las lesiones de ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados.



**Estrategia experimental para cuantificar la carga parasitaria en las lesiones de ratones inmunosuprimidos con UVB e infectados y para evaluar la respuesta inmune local en sus lesiones.** Se formaron 8 grupos de 3 ratones cada grupo y se infectaron con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *Leishmania mexicana* en el día 9 de cultivo. Las infecciones se realizaron por vía intradérmica en la región dorsal del tronco. Se midieron las lesiones cada 5 días durante 42 días. En los días 15, 30 y 42 se sacrificaron 3 ratones de cada grupo y se analizó el tejido de la lesión. HP: Análisis histopatológico. IHQ: Inmunohistoquímica. UVB: Exposición a dosis inmunosupresora de UVB.

## 7. Material y Métodos

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Equipos:

Equipo	Marca	No. de catálogo
Campana de Flujo Laminar	ESCO	AC2-4E9
Refrigerador	Daewoo	RF-T425NB
Bomba Extractora a Vacío	N/A	N/A
Pipeteador automático Fastpette PRO	Labnet	P2002
Incubadora	J.M. Ortiz	DI-03-007
Baño de agua	PolyScience	AC2-4E9
Centrífuga Refrigerada	Thermo Scientific	SL40R
Microscopio	Motic	Ba310
Máquina Profesional de Motor para Corte	Oster Classic 97'	N/A
Tanque de nitrógeno	Thermo	CY509106
Pipeta automática de 100-1000 $\mu\text{L}$	Eppendorf	O10043E
Pipeta automática de 20-200 $\mu\text{L}$	Eppendorf	J38204E
Pipeta automática de 10-100 $\mu\text{L}$	Eppendorf	I42916E
Pipeta automática de 2-20 $\mu\text{L}$	Eppendorf	N14226E
Pipeta automática de 1-10 $\mu\text{L}$	Eppendorf	O16565E
Báscula Portátil CSSeries-CS	OHAUS	2000-001
Agitador mecánico basculante	N/A	N/A
Lámparas solares UVB	Philips UVL	FS-40T12
Radiómetro Digital	Company Seven	UVP-UVX
Tabla de disección de ratón	N/A	N/A
Plancha digital con magneto	Corning	PC-620D
Agitador magnético	ThermoFisher	N/A
Criostato microtomo	Roundfin	2230
Campana de extracción	ESCO	CLAS II BSC
Potenciómetro	Conductronic	N/A
Balanza analítica	AND	GR-120
Invertoscopio – FLoid Cell Imaging Station	Life Technologies	N/A
Vortex	Thermolyne	T37600 Mixer
Cámara húmeda	N/A	N/A

### 7.1.2 Material e Instrumentos:

Material	Marca	No. de catálogo
Guantes de nitrilo para exploración no estériles (Sin Polvo) Chico/Grande/Mediano	Ambiderm Lanceta HG	069028 069030
Cubrebocas Unimask	Lanceta HG	060039
Gafas protectoras de seguridad superponible esterilizable	Univet	RBG012
Sanitas/Toalla para manos <i>TORK</i>	TORK	H21
Parafilm Laboratory Film	Senna	7-109
Sistema de Filtrado de Vacío de 150mL	Cellgro Corning	431153
Puntilla para micropipeta Eppendorf 10 µL	Eppendorf	N/A
Puntilla para micropipeta Eppendorf 100 µL	Eppendorf	N/A
Puntilla para micropipeta Eppendorf 1000 µL	Eppendorf	N/A
Pipeta Plástica Serológica Estéril 25mL	Corning Costar	CLS4250 SIGMA
Pipeta Plástica Serológica Estéril 10mL	Corning Costar	CLS4100 SIGMA
Pipeta Plástica Serológica Estéril 5mL	Corning Costar	CLS4050 SIGMA
Ultra Afelpados Paños de Microfibra	Kirkland	713160
Gradilla para tubos cónicos	Heathrow-S	HS-24306
Tubo cónico para centrifuga 15 mL	Corning	430052
Tubo cónico para centrifuga 50 mL	Corning	CLS430829 Sigma
Frasco de Cultivo Celular T 25cm <sup>2</sup>	Cellgro Corning	430168
Gradilla para 80 microtubos	Eppendorf	908009
Contador de células manual	Indistinto	Indistinto
Cámara de Neubauer	Marienfeld	06.400.30
Microtubo Eppendorf 200 µL	Eppendorf	200400.EPPENDORF
Algodón Absorbente Plisado	Protec	CTR 213090
Jeringa para insulina U-100 con aguja. 25Gx13mm estéril.	Terumo	SS''10M2713L100
Jeringa para insulina U-100 con aguja. 27Gx13mm estéril.	Terumo	SS''10M2713L100
Jeringa para insulina U-100 con aguja. 30G x 9mm estéril.	Terumo	SS''10M2713L100
Estuche de disección completo	N/A	N/A
Hoja de bisturí	Hergom	N/A
Crema Corporal Depilatoria	Veet	N/A
Unidad de Filtración con Jeringa 0.22 µL	Millex	SLGV033RS
Jeringa estéril de plástico 10mL 22G x 32mm	BD Plastipak	302560
Crioviales 2 mL	Corning	430499
Micrómetro digital	Mitutoyo	N/A

Calibrador Dial	Vernier	50011
Placa de Cultivo Celular de 24 Pocillos estéril	Costar	3526
Placa de Cultivo Celular de 96 Pocillos estéril	Costar	3598
Caja de Petri estéril	N/A	N/A
Papel aluminio	Reynolds	N/A
Gasas estériles	N/A	N/A
Filtro para cafetera	Hill Country	N/A
Cuba de vidrio para tinción	N/A	N/A
Vasos de precipitado 500 mL	Corning	N/A
Canastilla para 50 laminillas	WHEATON	N/A
Canastilla para 24 laminillas	N/A	N/A
Canastilla para 12 laminillas	N/A	N/A
Laminillas	Velab	VE-P10
Cubreobjetos	Corning	N/A
Tren de Tinción manual	Tissue-Tek	N/A

### 7.1.3 Reactivos y kits:

Reactivo	Marca	No. de catálogo
<b>Medio de Cultivo RPMI-1640 suplementado (SFB al 10% y Ab 3%) y acidificado (80µL).</b>		
Medio RPMI-1640	Gibco	11875093
Suero Fetal Bovino	ATCC 30-2020	63310972
Antibiótico Penicilina-Estreptomina	Gibco	15140-122
Ácido clorhídrico fumante 37%	Merck	1.00317.2500
<b>Otros</b>		
Formaldehido 1%	SIGMA	F8775
Solución CS (NaCl) Solución Inyectable 0.9%	PiSA	L-4390
Anestésico para ratones Ketamina/Xilacina Dosis: 0.1 ml/20mg vía I.P.	AnaSed Injection Cheminova	NDC 59399-111-50
Isodine	N/A	Lote: 11112183
Etanol al 70%	CTR	CTR 144531
Etanol al 95%	CTR	CTR 144531
Etanol al 100%	CTR	CTR 144531
Xilol	CTR	CTR 05120
DMSO	SIGMA	D-5879
Tissue-Tek O.C.T.	SAKURA	162550-01
Liberase TL Research Grade	Roche	05401020001
Agua destilada	CTR	N/A
Gelatina	DIFCO	N/A
Sulfato de cromo potásico $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	SIGMA	243361
Hematoxilina	N/A	N/A



Eosina	N/A	N/A
Azul de Toluidina	Sigma Aldrich	N/A
Nuclear Fast Red	Vector	H-3403
ImmPACT SG SK-4705	Vector	W-93951-99
Rat anti Mouse Interleukin-10 antibody	BIO-RAD	MCA1302G
Rat anti Mouse IFN $\gamma$ Mab	Thermo Scientific	MM701
Rat anti Mouse MOMA2 antibody	BIO-RAD	MCA519G
Rat anti Mouse CD4 antibody	BIO-RAD	MCA1767
Rat anti Mouse CD8 antibody	BIO-RAD	MCA1768
Biotin-SP-conjugate Goat Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson I Research	112-065-003
Acetona fría (-20 °C)	CTR	416
PBS pH 7.2-7.4	SIGMA	P-5368
Albumina sérica bovina	SIGMA	A9647
Azida de sodio	SIGMA	S-2002
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	CTR	CTR07764
Metanol	CTR	CTR01212
Suero humano	N/A	N/A
Gelatina de pescado	SIGMA	G7041
Tween 20	SIGMA	P-1379
Peroxidase-conjugated Streptavidin	Jackson I Research	(016-030-084)
Vectamount	VectorLabs	H-5000
Ciclofosfamida	Lab. Sanfer	317CT244

#### 7.1.4 Material biológico:

Biológico	Especificaciones
Ratones	Cepa C57BL/6 hembras de 6-10 semanas de edad de Charles River Laboratories©
Parásitos	<i>Leishmania mexicana</i> (Biagi) Garnham (ATCC® 50157™) Cepa: MHOM/BZ/82/BEL21HG

#### 7.1.5 Soluciones

Ver Anexo 13.1

## 7.2 Métodos

### 7.2.1 Preparación de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado para el cultivo de *Leishmania mexicana*.

NOTA: Todos los medios y/o reactivos que se utilizaron para preparar el medio suplementado se encontraban a temperatura ambiente. El medio se preparó en condiciones de esterilidad.

- 1- Encender la campana de flujo laminar. (Deben transcurrir al menos 15 minutos desde el momento del encendido hasta el comienzo de uso).
- 2- Limpiar las superficies de la campana con Etanol al 70%.
- 3- Asegurarse de tener todo el material, incluida la bomba extractora a vacío, listo y al alcance (Figura 1).



- 4- Abrir el sistema de filtro de vacío de botella Corning® 150 mL.
- 5- Con el Faspette Pro/Pipetor y pipeta costar estéril de 25 mL, pipetear 130.5 mL de medio RPMI-1640 en el contenedor superior del sistema de filtro de vacío de botella Corning® 150 mL (Figura 2).
- 6- Desechar la pipeta.

- 7- Nuevamente, utilizando el Faspette Pro y pipeta Costar de 25 mL, pipetear 15 mL de suero fetal bovino (Figura 2).
- 8- Desechar la pipeta.
- 9- Pipetear con pipeta automática de 100-1000  $\mu\text{L}$ , 4.5 mL de antibiótico penicilina-estreptomicina (Figura 2).
- 10- Pipetear con pipeta automática de 10-100  $\mu\text{L}$ , 80  $\mu\text{L}$  ácido clorhídrico fumante 37%.



- 11- Agitar gentilmente el medio hasta que el color se torne a un tono amarillo-canela.
- 12- Conectar la manguera de la bomba extractora a vacío al sistema de filtro de vacío de botella Corning® 150 mL y esperar a que el medio de cultivo se filtre al bote inferior.
- 13- Cambiar la tapa del bote y sellar con parafilm.
- 14- Almacenar a 4°C.

**7.2.2 Descongelación de promastigotes de *L. mexicana* (Biagi) Garnham (ATCC® 50157™) Cepa: MHOM/BZ/82/BEL21 almacenados a -80°C criopreservados con DMSO.**

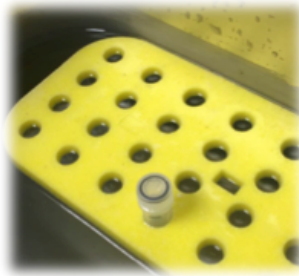
- 1- Encender la campana de flujo laminar. (Deben transcurrir al menos 15 minutos).
- 2- Limpiar las superficies de la campana con Etanol al 70%.
- 3- Asegurarse de tener todo el material listo y al alcance.
- 4- Preparar baño de agua a 35°C de temperatura utilizando el equipo “Baño de agua de PolyScience” (Realizar una limpieza de la tina del equipo antes de utilizarlo).
- 5- Asegurarse que la temperatura del baño de agua se mantenga a 35°C sin variaciones, verificar utilizando un termómetro mercurial (Figura 1).



- 6- Colocar una gradilla para tubos cónicos de 15 mL dentro de la campana de flujo laminar y colocar un tubo cónico estéril en la gradilla.
- 7- Preparar en el tubo cónico estéril de 15 mL una solución compuesta de:
  - RPMI-1640: 9.5 mL
  - Suero Fetal Bovino (5%): 0.5 mL
- 8- Dejar la solución dentro de la campana de flujo laminar.
- 9- Tomar un frasco de cultivo T 25cm<sup>2</sup> y llevarlo a la campana de flujo laminar.

10- Agregar al frasco de cultivo T 25cm<sup>2</sup>, 5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 completo (RPMI-1640, SFB 10%, Ab 3%, Acidificado con 80 µL).

11- Tomar \_\_ ámpulas de parásitos congelados y colocarlas en el baño de agua asegurándose que el tercio superior se mantenga por encima del nivel de agua (Figura 2).



12- Mantener en esta posición durante 2:45 minutos.

13- Importante no agitar el ámpula durante el baño de agua ni después del mismo.

14- Inmediatamente después de su descongelación remover el ámpula del baño de agua, rociarla con etanol al 70% y secarla, introducirla en la campana de flujo laminar, destaparla y cuidadosamente transferir el contenido del ámpula al tubo cónico de 15mL previamente preparado, decantándolo.

15- Evitar a toda costa que el ámpula haga contacto con el tubo cónico en el que se está decantando.

16- Posterior al decantado, utilizar una pipeta automática de 100-1000 µL para asegurar la transferencia de todo el contenido del ámpula (solo en caso de observar remanente).

17- Centrifugar a 1,500 rpm durante 10:00 minutos.

18- Decantar el sobrenadante.

19- Utilizando la pipeta automática de 100-1000 µL, resuspender el pellet con 1 mL de medio RPMI-1640 completo y sembrar en frasco de cultivo T 25cm<sup>2</sup> previamente preparado con medio completo.

20- Cerrar bien el frasco de cultivo y sellarlo con parafilm.

21- Incubar a 26°C.

### **7.2.3 Conteo y ajuste de concentración de cultivo de *Leishmania mexicana*.**

1- Encender la campana de flujo laminar.

2- Limpiar las superficies de la campana con Etanol al 70%.

3- Asegurarse de tener todo el material listo y al alcance.

4- Tomar una gradilla para tubos de 200-1000 µL y colocarla dentro de la campana de flujo laminar.

5- Una vez dentro de la campana, colocar 1 tubo Eppendorf de 200 µL en la gradilla.

6- Agregar 90 µL de formaldehído al 1% en el tubo Eppendorf de 200 µL.

7- Tomar una gradilla para tubos cónicos de 15 mL y colocarla dentro de la campana de flujo laminar.

8- Una vez dentro de la campana, colocar 1 tubo cónico estéril de 15 mL en la gradilla.

9- Ir a la incubadora, tomar el frasco de cultivo T 25cm<sup>2</sup> con el cultivo del parásito *Leishmania mexicana* con el que se pretende trabajar y colocarlo dentro de la campana de flujo laminar.

NOTA: Es recomendado observar el cultivo en el invertoscopio para documentar el estado del mismo previo a cualquier procedimiento que vaya a realizarse con los parásitos.

10- Transferir el contenido de la caja de cultivo al tubo cónico de 15mL decantándolo.

11- Agregar 1 mL de medio suplementado frío al frasco y agitar suavemente.

12- Recuperar con la micropipeta el liquido agregado, pasar al tubo cónico de 15mL.

13- Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.

14- Tomar el tubo cónico centrifugado y decantar el sobrenadante.

- 15- Resuspender con 3mL de medio RPMI-1640 completo, frío, de preferencia recién sacado del refrigerador y homogenizar el pellet utilizando una pipeta automática de 1000  $\mu$ L.
- 16- De ese tubo resuspendido, tomar 10  $\mu$ L y agregarlos en el tubo Eppendorf de 200  $\mu$ L que se había colocado previamente en los pasos 5 y 6, con 90  $\mu$ L de formaldehído al 1%.
- 17- Homogenizar con la pipeta automática de 1-10  $\mu$ L.
- 18- Tomar 10  $\mu$ L del homogenizado y cargar un lado de la cámara de Neubauer doble.
- 19- Volver a tomar 10  $\mu$ L y cargar el otro lado de la cámara de Neubauer doble.
- 20- Contar los 4 cuadrantes anotar la cantidad de parásitos de cada cuadrante y sacar un promedio de los 4.
- 21- Multiplicar ese promedio por  $10^4 \times 10 \times 3$  (volumen en mL en el que se resuspendió el pellet).
- 22- Dividir el total entre 1.5 y el resultado será la cantidad de mL a los que los que se debe llevar el volumen de esos parásitos para tener una concentración de  $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ .

Ejemplo:

71, 72, 75 y 72 en los cuadrantes = 72.5 es el promedio

$72.5 \times 10^4 \times 10 \times \text{mL} \times (3 \text{ mL}) = 21,750,000$

$21,750,000/1.5 = 14,500,000$

$14,500,000 = 14.50 \text{ mL}$

En este momento tiene un tubo cónico con 3 mL de un cultivo de parásitos, en esos 3 mL se encuentran 21,750,000 de parásitos. Para obtener una concentración de 1.5 millones de parásitos por mL, debe llevar esos 3 mL a 14.50 mL. Para esto se le agrega el medio de cultivo suplementado necesario para llegar a esos 14.50 mL.

Al final de este ejemplo, tiene un tubo cónico para centrífuga con un volumen total de 14.50 mL a una concentración de  $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ .

### 7.2.4 Extracción de parásitos a partir de lesión de ratón infectado con *Leishmania mexicana*.

- 1- Dentro de la campana de flujo laminar, utilizando una pipeta automática de 100-1000  $\mu\text{L}$  y siguiendo la técnica aséptica agregar 4.5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado en un Frasco de Cultivo Celular T 25cm<sup>2</sup> y cerrar el frasco.
- 2- Preparar una jeringa de 27G con 300  $\mu\text{L}$  de Solución CS (agua inyectable estéril).
- 3- Preparar una jeringa de 25G con 100  $\mu\text{L}$  de anestésico para ratones ketamina/xilacina (el volumen de anestésico puede variar dependiendo de la concentración a la que esté preparado).
- 4- Agregar el material preparado a una caja para transportar material y descender al bioterio.

Check List antes de bajar al bioterio.	
Frasco de Cultivo Celular T 25cm <sup>2</sup> con 4.5 mL de medio suplementado.	<input type="checkbox"/>
Jeringa de 27G con 300 $\mu\text{L}$ de solución salina estéril.	<input type="checkbox"/>
Jeringa de 27G con 100 $\mu\text{L}$ de anestésico.	<input type="checkbox"/>
Torundas de algodón empapadas de etanol al 70%	<input type="checkbox"/>
Isodine	<input type="checkbox"/>
Torundas de algodón limpias	<input type="checkbox"/>
Parafilm Laboratory Film	<input type="checkbox"/>
Estuche de disección (Pinzas)	<input type="checkbox"/>
Máquina Profesional de Motor para Corte Oster Classic 97	<input type="checkbox"/>

**NOTA:** Material mínimo necesario para extraer parásitos de 1 solo ratón. Ajustar cantidad de material dependiendo cantidad de ratones.

- 5- Descender al bioterio.
- 6- Encender la campana de flujo laminar (15 min antes de usar).
- 7- Limpiar las superficies de la campana con etanol al 70%.
- 8- Tomar la jaula con el ratón infectado del cual se pretende extraer los parásitos y colocarla sobre la mesa de trabajo.
- 9- Anestesiarse al ratón utilizando la jeringa de 25G previamente preparada administrando el anestésico por vía intraperitoneal.

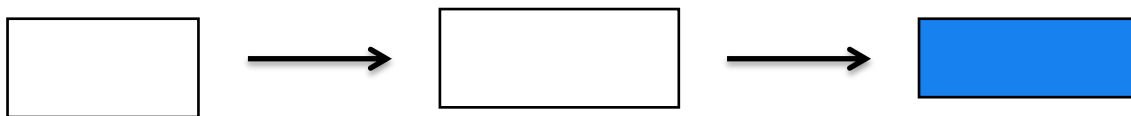


- 10- De encontrarse la lesión en un sitio donde el pelo del ratón impida o dificulte la correcta visualización de la misma, rasurar con cuidado el sitio de la lesión utilizando la máquina profesional de motor para corte.
- 11- Anestesiado y rasurado el ratón, trasladarlo a la campana de flujo laminar junto con el material restante.
- 12- Colocar al ratón de manera que la lesión de la que se vaya a extraer parásitos (lesión dorsal o lesión podal) sea fácilmente visible, manipulable y se encuentre sobre una superficie estable.
- 13- Realizar asepsia de la lesión y tejido circundante con isodine.
- 14- Con ayuda de una pinza operada con la mano no dominante, tomar el tejido donde se encuentra la lesión e introducir la aguja de la jeringa que previamente se había cargado con 300  $\mu$ L de Solución CS.
- 15- Muy lentamente inyectar entre 150 – 200  $\mu$ L de Solución CS en la lesión y retraer el embolo para aspirar el liquido inyectado nuevamente a la jeringa.
- 16- Es importante realizar esto con cuidado y paciencia. En ocasiones la jeringa parecerá estar tapada, es importante girar lentamente la jeringa sin sacar la aguja y repetir la inyección y aspiración de Solución CS.
- 17- Repetir el paso número 15 múltiples ocasiones, lentamente empujando y retrayendo el embolo y girando con cuidado la jeringa.
- 18- De realizar esto correctamente, la Solución CS originalmente encontrada en la jeringa de aspecto cristalino, se tornará turbia. Es común observar la presencia de sangre.
- 19- Descargar la muestra extraída en el frasco de cultivo T25 previamente preparado con medio de cultivo.
- 20- Sellar la tapa con Parafilm e incubar a 26°C.

### 7.2.5 Congelación de promastigotes de *Leishmania mexicana* a -80°C utilizando criopreservador DMSO para su conservación.

Antes de comenzar es importante conocer algunos conceptos clave en torno al proceso de la criopreservación de parásitos en DMSO a -80°C.

- Todos los medios y/o reactivos que se utilicen durante esta metodología deben estar fríos.
- Todo el procedimiento y preparación de medio debe realizarse en condiciones de esterilidad.
- La cantidad de “Medio DMSO” (Medio RPMI-1640 suplementado con DMSO) a preparar depende directamente de la cantidad de parásitos que se desee congelar.
- La concentración de DMSO del cultivo final listo para congelarse será de 5%, independientemente de que en su preparación inicial se prepare al 10%.
- La concentración máxima a la que se recomienda congelar los parásitos es de 20 millones de parásitos por mL.
- Se recomienda congelar utilizando crioviales de 2 mL añadiendo un máximo de 1 mL de volumen por criovial.
- Es importante preparar y rotular los crioviales y la caja en la que se guardarán los parásitos en el congelador a -80°C antes de comenzar con el paso #1.
- El día óptimo del ciclo de vida de los parásitos para ser congelados es después de:



## Inicio de cultivo

- 1- Encender la campana de flujo laminar (1 min antes de comenzar).
- 2- Limpiar las superficies de la campana con etanol al 70%.
- 3- Asegurarse de tener todo el material listo y al alcance.

2 día

- 4- Tomar el frasco con el cultivo del parásito *Leishmania mexicana* que se desee congelar y siguiendo la metodología antes descrita: “Cuento y ajuste de concentración de cultivo de *Leishmania mexicana*” centrifugar, resuspender en medio suplementado fresco y contar los parásitos del frasco.
- 5- Dependiendo de la cantidad de parásitos que se tengan en el cultivo y la concentración a la que se desee congelar por criovial, se prepara “Medio DMSO” en un tubo cónico para centrífuga.

Recordar: La concentración no debe exceder 20 millones de parásitos por mL, el volumen por criovial no debe exceder de 1 mL y el cálculo se debe realizar teniendo en mente que se agregará el mismo volumen del “Medio DMSO” con DMSO al 10% para que esa concentración descienda a 5%.

El “Medio DMSO” está compuesto de:

RPMI-1640 suplementado con SFB 10%, DMSO 10% y Antibiótico 2%.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
RPMI-1640	*11,700 µL
SFB	*1,500 µL
DMSO	*1,500 µL
Antibiótico	*300 µL

\*Volumen calculado en caso de preparar 15 mL de “Medio DMSO”.

- 6- En caso de preparar 15 mL de “Medio DMSO” llevar al mismo volumen (15 mL en este caso) el cultivo resuspendido en el paso # 4. En caso de preparar 5 mL de “Medio DMSO” llevar al mismo volumen (5 mL en este caso) el cultivo resuspendido en el paso # 4. En caso de preparar 10 mL de “Medio DMSO” llevar al mismo volumen (10 mL en este caso) el cultivo resuspendido en el paso # 4. Y así sucesivamente.

7- El volumen de Medio DMSO debe ser preparado con base en la cantidad de parásitos en el cultivo. Para no exceder una concentración final de 20 millones de parásitos por 1mL al ser congelados.

Por ejemplo:

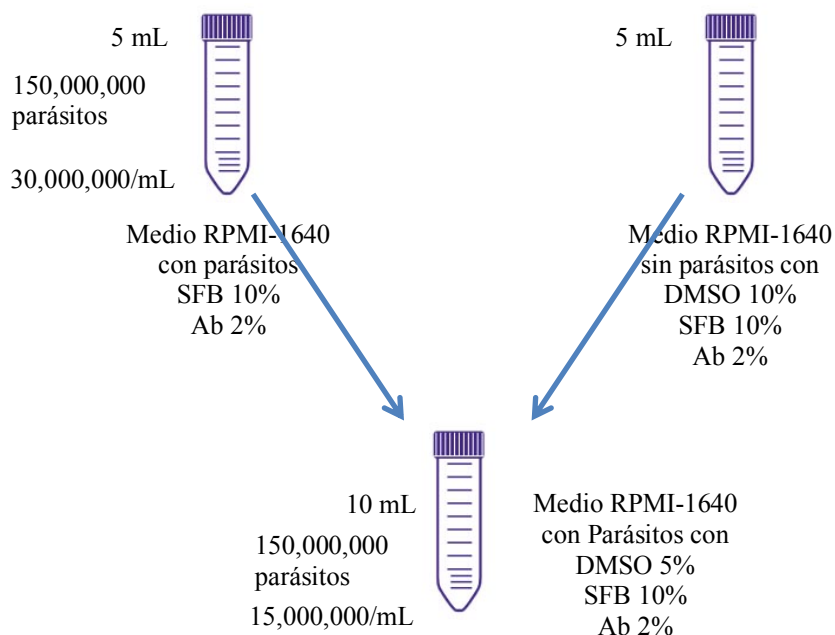
En el caso de tener un cultivo que se haya resuspendido en 5 mL y se haya contado un total de 300 parásitos en promedio.

Se realiza la Fórmula de la Cámara de Neubauer

$$300 \times 10,000, \times 10 \times 5 \text{ (resuspendido en 5 mL)} = 150,000,000$$

En este ejemplo se tienen 150,000,000 parásitos que se desean criopreservar.

Recordar que este medio será agregado a un medio del mismo volumen, pero con el criopreservador DMSO al 10%. La intención de este paso es reducir esa concentración total de DMSO de 10% a 5% en el cultivo que será congelado, pero esto se debe de hacer segundos antes de su congelación debido a que el DMSO es tóxico para los parásitos a temperatura ambiente.

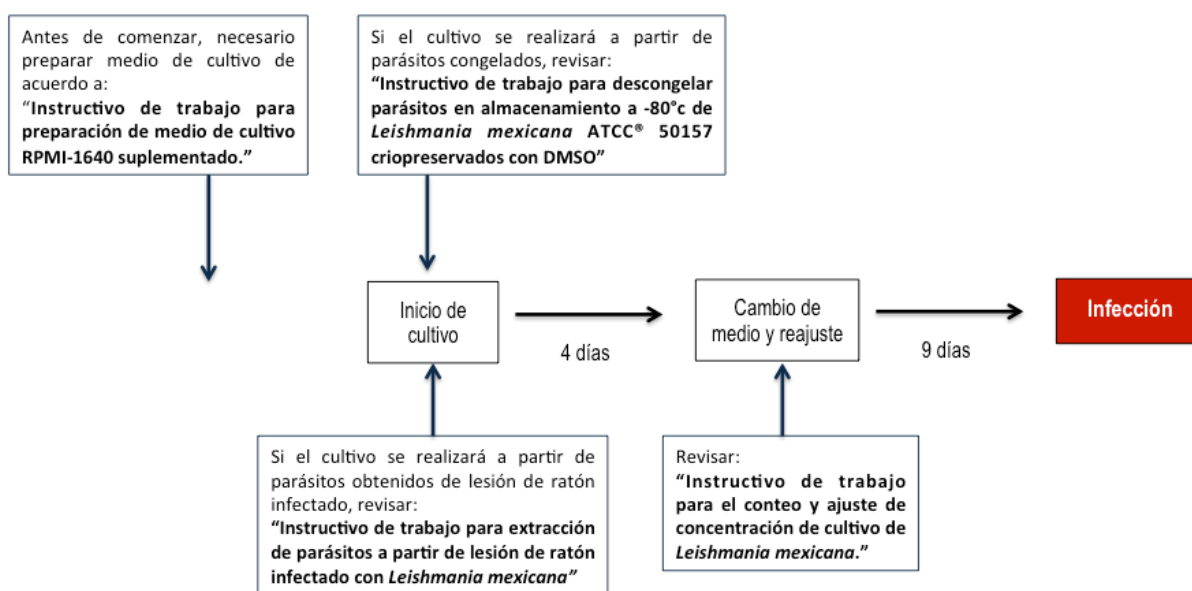


8- Se almacena la caja con los crioviales a -80°C.

## 7.2.6 Inoculación de promastigotes de *Leishmania mexicana* en la región dorsal del tronco de ratón.

Durante los meses de agosto-diciembre 2017 se establecieron las condiciones experimentales para inocular ratones con el parásito *Leishmania mexicana* del lote #100717 y observar de manera altamente reproducible el desarrollo de la lesión clásica generada tras la infección a nivel cutáneo por el parásito *Leishmania mexicana*. La metodología a continuación descrita es el producto de meses de experimentación.

Para que se desarrolle la lesión característica a nivel cutáneo, es necesario que los parásitos sigan la siguiente línea del tiempo:



Este protocolo consta de dos partes.

**PARTE 1**  
Metodología para formar un inóculo a determinada concentración a partir de cultivo de *Leishmania mexicana*

**PARTE 2**  
Metodología para preparar al ratón que será inoculado y su inoculación en región dorsal del tronco

## Parte 1 - Preparación de Inóculo

Tomar el frasco con el cultivo del parásito *Leishmania mexicana* y siguiendo la metodología antes descrita: “**Conteo y ajuste de concentración de cultivo de *Leishmania mexicana***” centrifugar, resuspender en medio suplementado fresco y contar los parásitos del frasco (Pasos 1 a 21) y continuar:

- 1- Llevar el cultivo de parásitos a una concentración de 1 millón de parásitos/20µL de volumen de Solución CS (Cloruro de Sodio) Solución Inyectable 0.9% estéril.

Si tienen 21,750,000 parásitos, ¿En cuánto volumen se debe resuspender para llegar a una concentración de 1,000,000 de parásitos por cada 20 µL?



**El dato obtenido tras realizar la ecuación anterior es la cantidad de µL en los que se debe resuspender esos 21,750,000 parásitos para llegar a una concentración de 1,000,000 de parásitos por cada 20 µL.**

- 2- Centrifugar el tubo cónico de 15 mL con los parásitos a 1,500 rpm durante 10 minutos.
- 3- Tomar el tubo cónico centrifugado y decantar el sobrenadante.
- 4- Utilizando Solución CS, resuspender el pellet con el **dato** obtenido tras realizada la ecuación (cantidad expresada en µL).

**Nota:** Recomendable filtrar (utilizando filtro Millex 0.22 µL y jeringa de 10 mL estéril) la solución salina inyectable.

En este momento tiene un tubo cónico de 15 mL con \_\_µL de solución salina inyectable estéril a partir de la cual puede tomar 20 µL y tener una concentración de 1,000,000 de parásitos en ese volumen.

## Parte 2 – Preparación de ratón e inoculación.

- 1- Agregar el material preparado a una caja para transporte de material y prepararse para descender al bioterio.

Check List antes de bajar al bioterio.	
Jeringa de 30G estéril	<input type="checkbox"/>
Jeringa de 27G con 100 µL de anestésico	<input type="checkbox"/>
Torundas de algodón empapadas en etanol al 70%	<input type="checkbox"/>
Inóculo <i>Leishmania mexicana</i>	<input type="checkbox"/>
Torundas de algodón limpias	<input type="checkbox"/>
Parafilm Laboratory Film	<input type="checkbox"/>
Estuche de disección (Pinzas)	<input type="checkbox"/>
Máquina Profesional de Motor para Corte Oster Classic 97'	<input type="checkbox"/>
Crema depilatoria Veet	<input type="checkbox"/>
Pipeta automática de 2-20 µL	<input type="checkbox"/>
Puntilla para micropipeta Eppendorf 100 µL	<input type="checkbox"/>

- 2- Descender al bioterio.
- 3- Encender la campana de flujo laminar (15 min antes de usar).
- 4- Limpiar las superficies de la campana con etanol al 70%.
- 5- Tomar la jaula con el ratón que se pretende infectar y colocarla sobre la mesa de trabajo.
- 6- Anestesiarse al ratón utilizando la jeringa de 25G previamente preparada administrando el anestésico por vía intraperitoneal.
- 7- Rasurar la espalda del ratón utilizando la máquina profesional de motor para corte.
- 8- Depilar al ratón utilizando crema depilatoria veet (Se unta crema depilatoria en el área que se desea depilar, se deja actuar durante 3 minutos, posteriormente se enjuaga al ratón con agua corriente directa al área donde se ha untado la crema para removerla y se talla, gentil pero firmemente con la orilla mojada de una toalla toda el área donde la crema fue aplicada, el pelo se debe de ir soltando al tallar.) Secar al ratón.

- 9- Trasladar al ratón a la campana de flujo laminar junto con el material de trabajo y colocarlo sobre la superficie de la campana de manera que se facilite al operador su manipulación (Figura 1).



Figura 1



Figura 2



Figura 3

**NOTA:** Si usted documentará la evolución del tamaño de la lesión utilizando un micrómetro digital Mitutoyo, ahora es el momento para medir el grosor de la piel aún no infectada (grosor de piel sana; día 0).

- 10- Una vez colocado el ratón en la campana de flujo laminar, tomar un trozo de Parafilm en forma de cuadro y colocarlo a un lado del ratón.
- 11- Tomar la pipeta automática de 2-20  $\mu\text{L}$ , tomar 20  $\mu\text{L}$  del vial con el inóculo de *Leishmania mexicana* y descargarlo sobre el cuadrado de Parafilm (Figura 2).
- 12- Aspirar el inóculo de 20  $\mu\text{L}$  utilizando una jeringa de 30G estéril (Figura 2 y 3).
- 13- Con la ayuda de las pinzas que usted mejor maneje, tomar la piel del ratón donde se vaya a inocular. Tirar gentilmente la piel hacia arriba e introducir la jeringa al ras (Figura 4). Descargar el contenido lentamente y dar un giro de 180° a la jeringa previo a su extracción. Extraer la jeringa (Figura 5).
- 14- Regresar al ratón a su caja sin realizar limpieza del sitio de inoculación.





Figura 4



Figura 5

Las infecciones se realizaron inoculando  $1 \times 10^6$  de promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* en su noveno día de cultivo (fase estacionara de crecimiento del parásito) en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de Solución CS estéril por vía intradérmica en la región dorsal del tronco.

### **7.2.7 Seguimiento de la evolución de lesión y pesaje de ratón infectado con *Leishmania mexicana*.**

- 1- Tomar la jaula con el ratón que se pretende medir y colocarla sobre la mesa de trabajo.
- 2- Anestesiarse al ratón utilizando la jeringa de 25G previamente preparada administrando el anestésico por vía intraperitoneal.
- 3- Rasurar y depilar al ratón de la manera antes descrita. La depilación se realiza cada 15 días.
- 4- Colocar al ratón gentilmente sobre la báscula y documentar su peso.
- 5- Colocar al ratón sobre un fondo blanco para fotodocumentar la lesión.

- 6- Medir la lesión utilizando el calibrador dial Vernier, midiendo los ejes: X, Y y Z.
- 7- Medir la lesión utilizando el micrómetro digital Mitutoyo. Con ayuda de unas pinzas operadas con la mano no dominante, tomar la piel 1 cm en dirección craneal al sitio que se desea medir y gentilmente tirar en dirección opuesta al ratón (Figura 1).
- 8- Con la mano dominante, tomar el micrómetro, presionar la palanca para retraer el tornillo medidor, colocar el espacio de medición del micrómetro entre la piel que se desea medir y lentamente dejar de presionar la palanca del micrómetro (Figura 2).
- 9- Documentar.

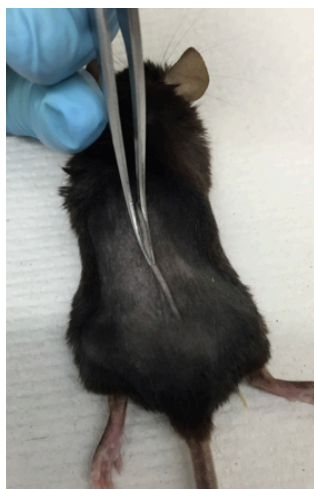


Figura 1

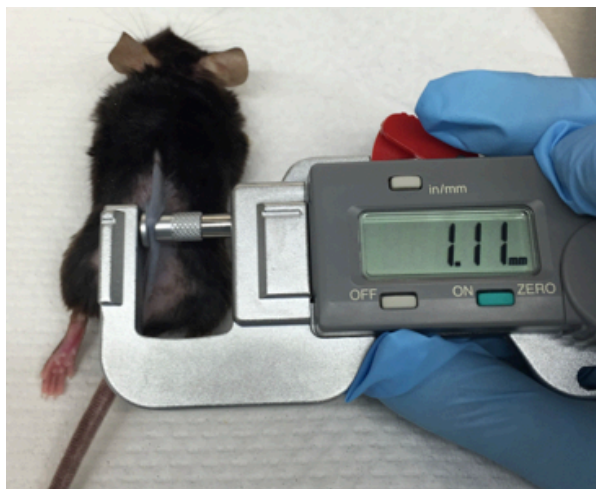


Figura 2

### 7.2.8 Obtención de antígeno particulado de *Leishmania mexicana*.

A partir de un cultivo de *Leishmania mexicana*.

- 1- Tomar el frasco con el cultivo del parásito *Leishmania mexicana* y siguiendo la metodología antes descrita: **“Cuento y ajuste de concentración de cultivo de *Leishmania mexicana*” (Paso 1 a 21)** centrifugar, resuspender en medio suplementado fresco, contar los parásitos del frasco y volver a sembrar.

- 2- Repetir el procedimiento cada 4 días hasta obtener la cantidad de parásitos deseada (En este caso, el antígeno se obtuvo a partir de un cultivo de 3,265,000,000 parásitos).
- 3- Una vez obtenida la cantidad de parásitos deseada, transferir los parásitos a un tubo cónico para centrifuga y centrifugar a 1,500 rpm durante 10 minutos.
- 4- Tomar el tubo cónico centrifugado y decantar el sobrenadante.
- 5- Resuspender el pellet con Solución CS y volver a centrifugar a 1,500 rpm durante 10 minutos (repetir tres veces).
- 6- Tomar el tubo cónico centrifugado y decantar el sobrenadante.
- 7- Resuspender el pellet con Solución CS hasta llegar a una concentración de  $250 \times 10^6$  parásitos/mL.
- 8- Transferir parásitos a crioviales y congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 9- Documentar el volumen y concentración al que se almacenaron los parásitos.

#### **7.2.9 Curva de crecimiento del parásito *Leishmania mexicana*.**

- 1- Preparar medio de cultivo fresco siguiendo la metodología antes descrita: **“Preparación de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado para el cultivo de *Leishmania mexicana*”**.
- 2- Descongelar 2 viales de parásitos criopreservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  siguiendo la metodología antes descrita: **“Descongelar promastigotes de *Leishmania mexicana* almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  criopreservados con DMSO”**.
- 3- 48 horas después de descongelados y sembrados los parásitos, realizar un conteo y ajuste de medio siguiendo la metodología antes descrita: **“Conteo y ajuste de concentración de cultivo de *Leishmania mexicana*”** (Pasos 1 al 22).
- 4- Llevar los parásitos a una concentración de  $1.5 \times 10^6$ /mL.
- 5- Tomar 3 placas de cultivo celular de 24 pocillos estériles y catalogar “#1, #2 y #3”.

- 6- Agregar 500  $\mu$ L de volumen del cultivo en cada pozo (750,000 parásitos/pozo) utilizando únicamente 8 pozos por placa (Figura 1).

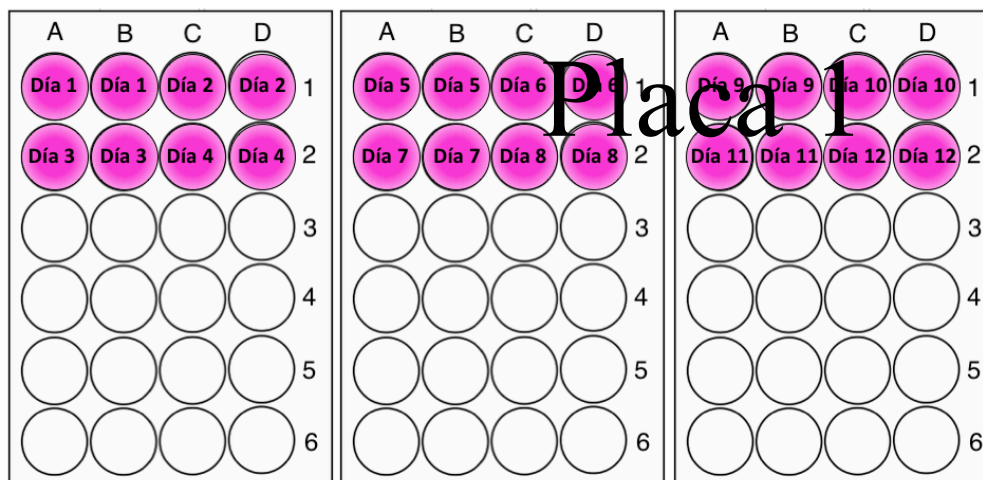


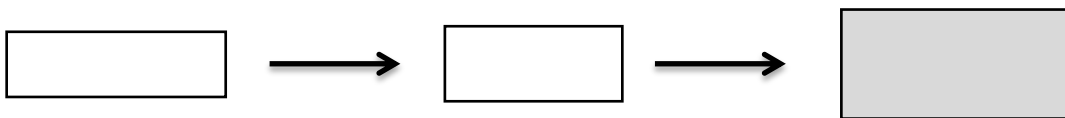
Figura 1

- 7- Una vez sembradas las 3 placas de cultivo, sellarlas con parafilm e incubar a 25°C.
- 8- 24 horas después del comienzo de incubación, encender la campana de flujo laminar y limpiar las superficies de la campana con Etanol al 70%.
- 9- Tomar una gradilla para tubos de 200-1000  $\mu$ L y colocarla dentro de la campana de flujo laminar.
- 10- Una vez dentro de la campana, colocar 2 tubos Eppendorf de 200  $\mu$ L en la gradilla.
- 11- Agregar 90  $\mu$ L de formaldehído al 1% a cada tubo Eppendorf de 200  $\mu$ L.
- 12- Tomar la “Placa #1” de la incubadora y transferirla a la campana de flujo laminar, por ningún motivo destapar la placa fuera de la campana.
- 13- Abrir la placa dentro de la campana de flujo laminar.
- 14- Agregar 1.5mL de solución salina estéril fría al primer pocillo catalogado “Día 1”.
- 15- Homogenizar durante 1 minuto.
- 16- Tomar 10  $\mu$ L del homogenizado de 2 mL y agregarlos a uno de los dos tubos Eppendorf de 200  $\mu$ L previamente preparados con 90  $\mu$ L de formaldehído al 1%.

- 17- Homogenizar.
- 18- Tomar 10  $\mu$ L del homogenizado y cargar un lado de la cámara doble de Neubauer, volver a tomar 10  $\mu$ L del homogenizado y cargar el otro lado de la cámara.
- 19- Realizar el conteo de parásitos de la manera previamente descrita en la metodología: “**Conteo y ajuste de concentración de cultivo de *Leishmania mexicana***” y documentar los resultados.
- 20- Repetir el procedimiento contando los parásitos del otro lado de la cámara doble.
- 21- Limpiar la cámara de Neubauer.
- 22- Repetir los pasos (14-20) para el segundo pozo catalogado “Día 1”.
- 23- Al finalizar, tomar el contenido de los pocillos catalogados “Día 1” y desecharlo.
- 24- Sellar la placa de cultivo celular con parafilm y volver a colocar en la incubadora a 25°C.
- 25- Repetir el procedimiento cada 24 horas durante 12 días.

#### 7.2.10 Reacción de hipersensibilidad tardía (DTH)

- 1- Preparar antígeno particulado a partir de parásito *Leishmania mexicana* siguiendo la metodología antes descrita: “**Obtención de antígeno particulado de *Leishmania mexicana***”.
- 2- Formar 3 grupos de 4 ratones hembra de 6-8 semanas de edad cada grupo. Los grupos se forman con base en el peso de los ratones y se separan mínimo 5 días antes de comenzar el experimento. Este experimento obedece la siguiente línea del tiempo:



# Sensibilización

### Sensibilización:

- 3- A partir de los crioviales almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  con antígenos de *Leishmania mexicana* a una concentración de  $250 \times 10^6$  parásitos/mL, calcular la cantidad de volumen a descongelar para obtener un inóculo de 1.5 mL a una concentración de  $1 \times 10^7$  parásitos/100  $\mu\text{L}$ , completar el volumen con Solución CS estéril.
- 4- Una vez formado el inóculo para la sensibilización, descender al bioterio.
- 5- Tomar las 3 cajas con los 12 ratones que serán sensibilizados y colocarlas sobre la mesa de trabajo. Para este procedimiento no es necesario que los ratones estén anestesiados.
- 6- Tomar un trozo de Parafilm en forma de cuadro y colocarlo a un lado del ratón.
- 7- Con la pipeta automática de 1-100  $\mu\text{L}$ , tomar 100  $\mu\text{L}$  del vial con el inóculo de antígenos de *Leishmania mexicana* y descargarlo sobre el cuadrado de Parafilm (Figura 1).
- 8- Aspirar el inóculo de 20  $\mu\text{L}$  utilizando una jeringa de 27G estéril (Figura 2).
- 9- Inocular 50  $\mu\text{L}$  en cada flanco de cada ratón por vía subcutánea ( $5 \times 10^6$  antígenos en cada flanco, para un total de  $1 \times 10^7$  por ratón) y regresarlos a sus cajas (Figura 3).
- 10- Esperar 7 días.



### Reto:

- 11- Siete días después, a partir de los crioviales almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  con antígenos de *Leishmania mexicana* a una concentración de  $250 \times 10^6$  parásitos/mL, calcular la cantidad de

volumen a descongelar para obtener tres inóculos de 100µL a tres concentraciones diferentes:

- $1 \times 10^6$  parásitos/20µL
- $3 \times 10^6$  parásitos/ 20µL
- $5 \times 10^6$  parásitos/20µL

12- Una vez formados los 3 inóculos para el reto, descender al bioterio (Para llegar a la concentración adecuada completar el volumen con Solución CS estéril de ser necesario).

13- Tomar las 3 cajas con los 12 ratones que serán retados y colocarlas sobre la mesa de trabajo.

14- Anestesiarse a los ratones del primer grupo utilizando una jeringa de 25G previamente preparada y administrar el anestésico por vía intraperitoneal.

15- Una vez anestesiado medir el grosor de ambas orejas de cada ratón utilizando el micrómetro digital Mitutoyo y documentarlo (Figura 4).

16- Tomar un trozo de Parafilm en forma de cuadro y colocarlo a un lado del ratón.

17- Con la pipeta automática de 1-100 µL, tomar 20 µL del vial con el inóculo de antígenos de *Leishmania mexicana* y descargarlo sobre el cuadrado de Parafilm (Figura 1).

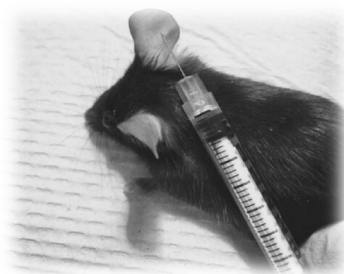
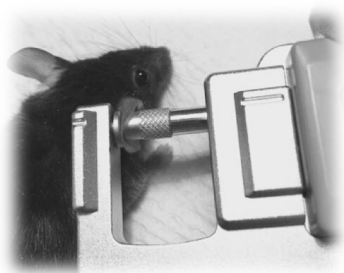
18- Aspirar el inóculo de 20 µL utilizando una jeringa de 30G estéril (Figura 2).

19- Inyectar 20 µL del inóculo de  $1 \times 10^6$  parásitos/20µL por vía intradérmica en la oreja derecha de cada ratón del primer grupo e inyectar 20 µL de Solución CS por vía intradérmica en la oreja contralateral y regresarlos a sus cajas (Figura 5). Se utiliza una jeringa por grupo para inocular los antígenos y otra jeringa diferente por grupo para inocular la Solución CS.

20- Anestesiarse a los ratones del segundo grupo de la manera previamente descrita.

21- Medir el grosor de ambas orejas de cada ratón y documentarlo.

- 22- Con ayuda de una pinza y repitiendo la técnica antes descrita, inyectar 20  $\mu\text{L}$  del inóculo a una concentración de  $3 \times 10^6$  parásitos/20  $\mu\text{L}$  por vía intradérmica en la oreja derecha de cada ratón e inyectar 20  $\mu\text{L}$  de Solución CS por vía intradérmica en la oreja contralateral y regresarlos a sus cajas.
- 23- Anestesiar a los ratones del tercer grupo de la manera previamente descrita.
- 24- Medir el grosor de ambas orejas de cada ratón y documentarlo.
- 25- Inyectar 20  $\mu\text{L}$  del inóculo a una concentración de  $5 \times 10^6$  parásitos/20  $\mu\text{L}$  por vía intradérmica en la oreja derecha de cada ratón e inyectar 20  $\mu\text{L}$  de Solución CS por vía intradérmica en la oreja contralateral y regresarlos a sus cajas.
- 26- Esperar 2 días.
- 27- 48 horas más adelante, sacrificar a los ratones de cada caja, medir el grosor de las orejas utilizando el micrómetro digital Mitutoyo y documentar los resultados (Figura 4).

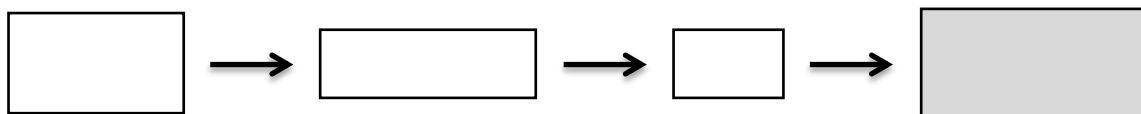


### **7.2.11 Supresión de la reacción de hipersensibilidad tardía (DTH) por exposición a luz UVB.**

- 1- Designar un área específica en el laboratorio donde se montará la lámpara solar emisora de UVB.



- 2- Delimitar la zona donde se colocarán a los ratones que serán irradiados utilizando el radiómetro digital UVP-UVX realizando mediciones de emisión de UVB para que todos los ratones reciban la misma cantidad de radiación ultravioleta.
- 3- Una vez delimitada la zona de máxima emisión de la lámpara solar, nuevamente utilizando el radiómetro digital UVP-UVX determinar la distancia a la que se colocarán los ratones.
- 4- Acomodar la lámpara y la superficie donde se colocará a los ratones de manera que éstos reciban una dosis de 25mJ/cm<sup>2</sup> al cabo de dos minutos de exposición.
- 5- Formar 3 grupos de 4 ratones hembra de 6-8 semanas de edad cada grupo. Los grupos se forman con base en el peso de los ratones y se separan mínimo 5 días antes de comenzar el experimento. Este experimento obedece la siguiente línea del tiempo:



- 6- Los grupos se clasifican y se trabajan de la siguiente manera:

	UVB+	Sensibilización	Reto	Solución CS estéril
25 mJ/cm <sup>2</sup> UVB	✓	✓	✓	
62.5 mJ/cm <sup>2</sup> UVB	✓	✓	✓	
Control +		✓	✓	
Control -	✓	✓		

4 días

- 7- Pasados los 5 días de separación, descender al bioterio, tomar las 3 cajas con los 12 ratones y colocarlas sobre la mesa de trabajo.
- 8- Anestesiarse a todos los ratones utilizando jeringas de 25G previamente preparadas administrando el anestésico por vía intraperitoneal (1 jeringa por grupo).
- 9- Rasurar toda la espalda de los ratones utilizando la máquina profesional de motor para corte.
- 10- Depilar a los ratones utilizando crema depilatoria *Veet* de la manera antes descrita.

11- Colocar a los 4 ratones del grupo “62.5 mJ/cm<sup>2</sup> UVB” debajo de la lámpara solar y cubrir sus orejas y una franja horizontal de la región dorsal del tronco utilizando papel cartón (Figura 1 y 2).



12- Encender la lámpara solar durante 5 minutos hasta llegar a una dosis de exposición de UVB de 62.5 mJ/cm<sup>2</sup>.

13- Regresar a los ratones a sus jaulas.

14- Repetir el procedimiento con el grupo “25 mJ/cm<sup>2</sup> UVB”, este grupo estará expuesto 2 minutos hasta llegar a una dosis de exposición de UVB de 25mJ/cm<sup>2</sup>.

15- El grupo “Control +” no se expone a radiación ultravioleta y se regresa a su caja. El grupo “Control –” está conformado por las orejas contralaterales de todos los ratones a las que se les inoculará Solución CS como reto como se describió en la metodología “**Reacción de hipersensibilidad tardía (DTH)**”.

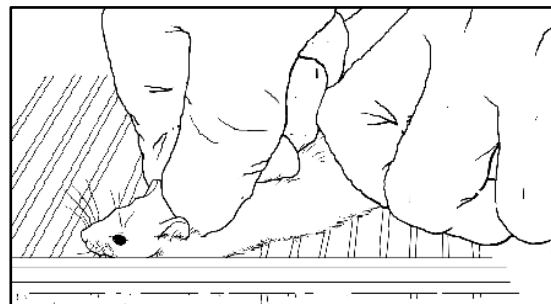
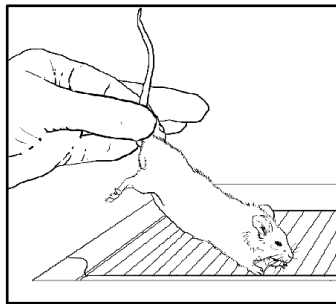
16- Cuatro días después de la exposición a UVB, se continúa con la metodología antes descrita: “**Reacción de hipersensibilidad tardía (DTH)**”.

#### **7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis.**

Según la NOM-062-ZOO-1999, la dislocación cervical manual ejecutada apropiadamente es un método que induce inconsciencia rápidamente en el animal y no contamina los tejidos con

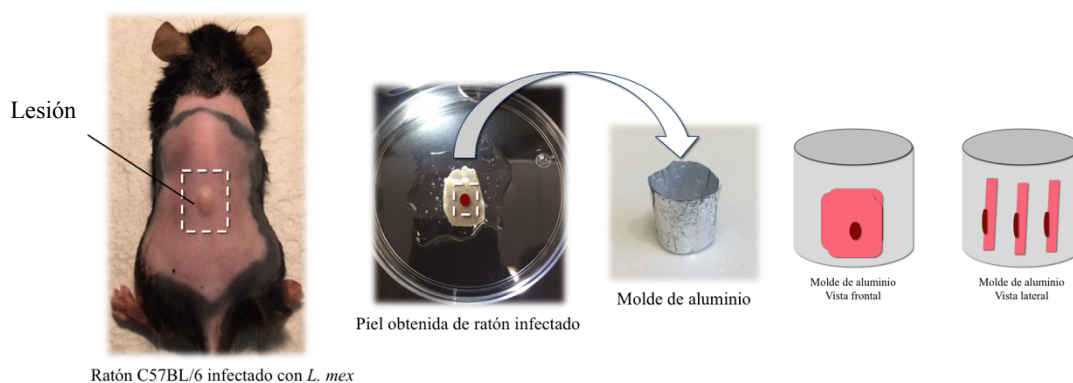
sustancias químicas. Esto lo hace un método de eutanasia apropiado y permitido en el campo de investigación siempre y cuando el animal pese menos de 200 gr.

- 1- Realizando movimientos gentiles pero firmes, tomar al ratón por la base de la cola con la mano no dominante y colocarlo sobre la rejilla de su jaula, instintivamente el animal va a sujetarse de la rejilla.
- 2- Tirar gentilmente de la base de la cola en dirección caudal, esto ocasionará que el ratón extienda el dorso y exponga la región cervical (Figura 1).
- 3- Colocar los dedos índice y pulgar de la otra mano justo debajo de la base del cráneo.
- 4- Traccionar con la mano que sujeta la base de la cola en dirección caudal y empujar con la mano que sujeta la base del cráneo en dirección craneal al mismo tiempo de manera firme y contundente para ocasionar la dislocación cervical (Figura 2).



- 5- Para la obtención de órganos linfoides consultar Anexo 13.6 “Obtención de Órganos Linfoides”.
- 6- Para la obtención de una lesión cutánea, rasurar y depilar al ratón de la manera previamente descrita.
- 7- Colocar al ratón en posición de decúbito prono sobre la tabla de disección y se clavan las cuatro extremidades extendidas con alfileres o agujas a la tabla.

- 8- Con una pinza curva operada con la mano no dominante se toma la piel a 1 cm de distancia en dirección craneal de la base de la cola siguiendo la línea media, se tracciona hacia el operador y se realiza una pequeña incisión con tijera operada por la mano dominante.
- 9- En la incisión se introducen las tijeras cerradas y se abren para separar la piel de los planos profundos, la separación de la piel de los planos profundos se debe realizar en la extensión que sea necesaria para cubrir la línea punteada de la Figura 3.
- 10- Una vez separada la piel, se corta siguiendo la línea punteada y se transfiere a una caja de Petri previamente adicionada con Tissue-Tek O.C.T. (Figura 3).
- 11- En la caja de Petri utilizando un bisturí se corta el exceso de piel sin cortar la lesión.
- 12- Se transfiere el tejido lesional a un molde de aluminio previamente llenado con Tissue-Tek y se coloca de forma vertical (Figura 3).



- 13- De estar trabajando con un grupo experimental de 3 ratones, repetir el procedimiento y colocar los tejidos cutáneos obtenidos uno detrás de otro como se observa en la Figura 3.
- 14- Esperar 20 minutos.
- 15- Almacenar el molde de aluminio con el tejido a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **7.2.13 Determinación de carga parasitaria por dilución limitante.**

- 1- Encender la campana de flujo laminar. (Deben transcurrir al menos 15 minutos).
- 2- Limpiar las superficies de la campana con Etanol al 70%.
- 3- Asegurarse de tener todo el material listo y al alcance.
- 4- Preparar medio de cultivo fresco siguiendo la metodología antes descrita: “Preparación de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado para el cultivo de *Leishmania mexicana*”.
- 5- Preparar las soluciones necesarias para llevar a cabo la metodología (Anexo 10.1.6).
- 6- Sacrificar al grupo de ratones que se pretende analizar siguiendo la metodología antes descrita: “Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis” y detenerse en el paso #7.
- 7- Trasladar al ratón sacrificado a la campana de flujo laminar y colocarlo sobre gasas estériles.
- 8- Realizar asepsia de la lesión y tejido circundante con gasas estériles e isodine.
- 9- Manteniendo la esterilidad, con una pinza curva operada con la mano no dominante se toma la piel a 1 cm de distancia en dirección craneal de la base de la cola siguiendo la línea media, se tracciona hacia el operador y se realiza una pequeña incisión con tijera operada por la mano dominante.
- 10- En la incisión se introducen las tijeras cerradas y se abren para separar la piel de los planos profundos, la separación de la piel de los planos profundos se debe realizar en la extensión que sea necesaria para cubrir el área de la lesión.
- 11- Cortar la piel con la lesión y colocarla sobre una caja de Petri estéril, cortar el exceso de piel y disgregar la lesión lo mejor posible utilizando un bisturí.
- 12- Recuperar el tejido disgregado con 1 mL de “Solución de trabajo” y transferirlo al tubo con la solución de trabajo.

13- Incubar durante 1 hora a 37°C sobre el agitador mecánico basculante.

14- Posteriormente agregar 1 mL de medio de cultivo RPMI suplementado y catalogar el tubo: “Lesión disgregada”.

15- Añadir medio RPMI suplementado a una placa de cultivo de 96 pocillos estéril como se observa en la Figura 1.

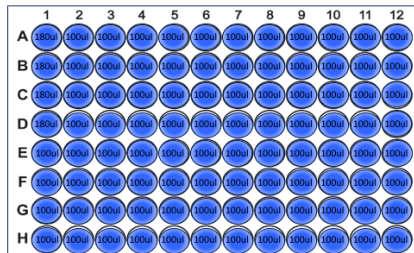


Figura 1

16- Añadir 20 µL de la solución “Lesión disgregada” a los pocillos 1A, 1B, 1C y 1D, en este momento el panorama debe lucir de la siguiente manera (Figura 2).

17- Realizar una dilución seriada del contenido de los pocillos 1A, 1B, 1C y 1D, transfiriendo 100 µL de cada pocillo a lo largo de la placa como se muestra en la Figura 3. El pocillo 1A será disuelto a lo largo de la fila A y posteriormente la fila E. El pocillo 1B será disuelto a lo largo de la fila B y posteriormente la fila F. El pocillo 1C será disuelto a lo largo de la fila C y posteriormente G. El pocillo 1D será disuelto a lo largo de la fila D y posteriormente H.

18- Al llegar a la columna con los pocillos E12, F12, G12, H12, realizar la última dilución y desechar los 100 µL sobrantes.

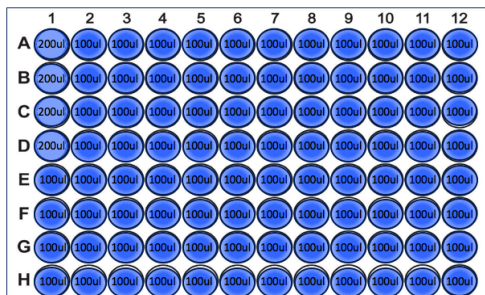


Figura 2

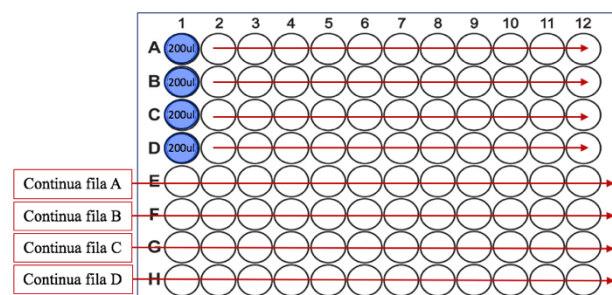


Figura 3

- 19- Añadir 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI suplementado a todos los pocillos para obtener un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en cada pocillo.
- 20- Colocar la tapa y sellar con parafilm.
- 21- Incubar 7 días a 25°C.
- 22- Transcurridos los 7 días, revisar cada pocillo de la placa en un invertoscopio para determinar la presencia o ausencia de parásitos en ese pocillo, la presencia de al menos un parásito es suficiente para considerar ese pocillo como “positivo”. Se clasifican “negativos” los pocillos ausentes de parásitos (Figura 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 4

- 23- Los datos correspondientes al número de pocillos negativos se agregan a un software que arroja la concentración total de parásitos y el valor de  $\log_{10}$  (Anexo 13.2).

#### 7.2.14 Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina.

- 1- Una vez obtenido el molde con el tejido congelado (Paso #15 de metodología antes descrita: “7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis”) encender el Criostato Microtomo.
- 2- Ajustar la temperatura de la cámara a -35°C y de la base de corte a -28°C.

- 3- Esperar aproximadamente 30-60 minutos para que el criostato microtomo descienda a la temperatura asignada.
- 4- Montar el tejido congelado en el criostato microtomo y destazar el exceso de Tissue-Tek con cortes gruesos hasta llegar al tejido de interés.
- 5- Al llegar al tejido de interés, modificar el grosor de corte a 3-5  $\mu\text{m}$ .
- 6- Recuperar los cortes con laminillas previamente tratadas (Figura 1).

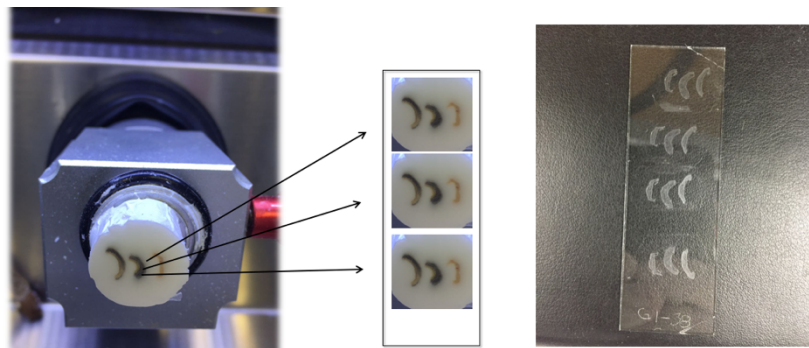


Figura 1

- 7- Sumergir la laminilla en agua bidestilada para remover el Tissue-Tek.
- 8- Para la tinción de Hematoxilina y Eosina se sigue el siguiente protocolo:
  - a. Sumergir la laminilla en Hematoxilina de Mayer durante 70 segundos.
  - b. Realizar un lavado con agua corriente durante 10 segundos.
  - c. Sumergir en Eosina durante 12 segundos.
  - d. Lavado con agua corriente 5 segundos.
  - e. Sumergir en Etanol al 70% 15 veces.
  - f. Sumergir en Etanol al 95% 15 veces.
  - g. Sumergir en Etanol al 100% durante 2 minutos.
  - h. Sumergir en Etanol al 100% durante 2 minutos.
  - i. Sumergir en Xilol durante 3 minutos.
  - j. Agregar una gota de Vecta Mount sobre el tejido y cubrirlo con un cubreobjetos.



- k. Presionar gentilmente el cubreobjetos para remover las burbujas.
- 9- Para la tinción de Azul de Toluidina se sigue el siguiente protocolo:
- a. Sumergir la laminilla en Azul de Toluidina durante 3 minutos.
  - b. Realizar 3 lavados en agua destilada de 5 segundos cada uno.
  - c. Sumergir en Etanol al 95% 10 veces.
  - d. Sumergir en Etanol al 100% 10 veces.
  - e. Sumergir en Etanol al 100% 10 veces.
  - f. Sumergir en Xilol durante 3 minutos.
  - g. Sumergir en Xilol durante 3 minutos.
  - h. Agregar una gota de Vecta Mount sobre el tejido y cubrirlo con un cubreobjetos.
  - i. Presionar gentilmente el cubreobjetos para remover las burbujas.

#### **7.2.15 Análisis histopatológico.**

- 1- Se obtiene el tejido de lesión de la manera previamente descrita en: “7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis” y se congela a -80°C.
- 2- Se monta en el criostato, se realizan cortes y se tiñen con H&E de la manera previamente descrita en: “7.2.14 Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina”
- 3- Se observa el tejido bajo el microscopio para el análisis a diferentes objetivos y se realizan micrografías de estructuras y hallazgos representativos de cada grupo.
- 4- A partir de múltiples micrografías panorámicas a 4x, se realiza una reconstrucción de la lesión completa en Power Point para representar lo observado (Figura 1).

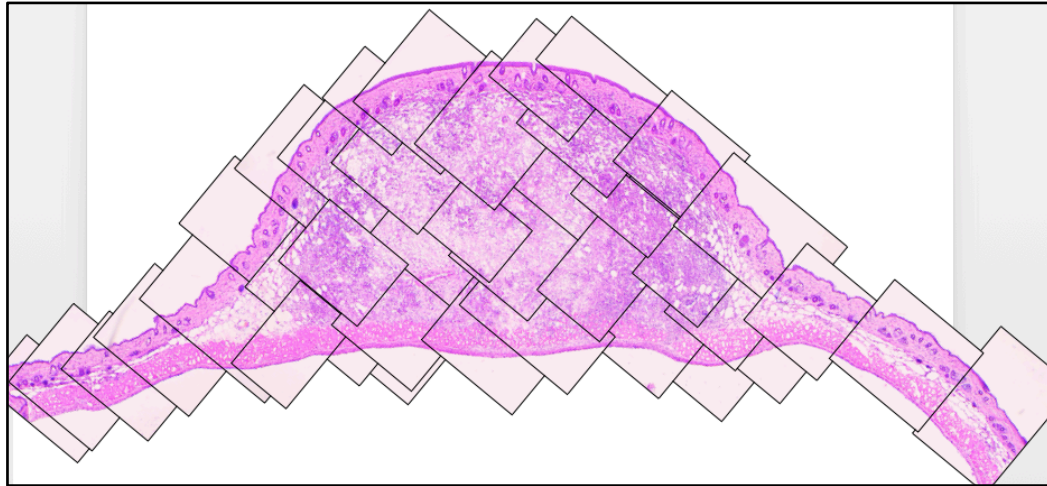


Figura 1

#### **7.2.16 Análisis semicuantitativo para determinar cantidad de parásitos en la lesión.**

- 1- Se obtiene el tejido de lesión de la manera previamente descrita en: “7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis” y se congela a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 2- Se monta en el criostato, se realizan cortes y se tiñen con H&E de la manera previamente descrita en: “7.2.14 Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina”.
- 3- Se observa el tejido bajo el microscopio a 100x y se cuentan los parásitos observados en 3 campos microscópicos, en 3 ratones de cada grupo como mínimo.

**Nota:** La manera adecuada y recomendada de determinar la carga parasitaria en una lesión es a través de la técnica previamente descrita: “7.2.13 Determinación de carga parasitaria por dilución limitante.” El análisis semicuantitativo sirve el propósito único de tener una aproximación de la cantidad de parásitos y visualización de su distribución en las lesiones.

### 7.2.17 Análisis de distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos en la lesión.

- 1- Se obtiene el tejido de lesión de la manera previamente descrita en “7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis” y se congela a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 2- Se monta en el criostato, se realizan cortes y se tiñen con Azul de Toluidina de la manera previamente descrita en “7.2.14 Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina”
- 3- Se observa el tejido bajo el microscopio a 40x para identificar la distribución inicial de los mastocitos en la lesión y tejido cutáneo circundante.
- 4- Se realiza una reconstrucción de la lesión completa a partir de múltiples micrografías panorámicas a 4x (Figura 1).

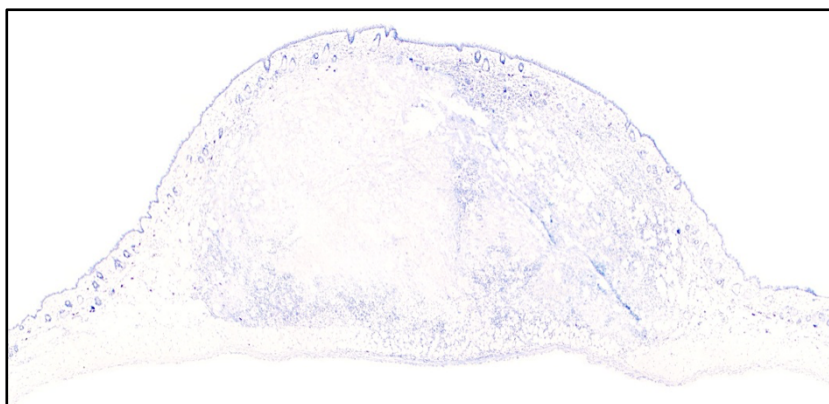


Figura 1

- 5- Una vez realizada la reconstrucción de la lesión completa, nuevamente se observa el tejido bajo el microscopio a 40x o 100x y se identifica el estado morfológico de los mastocitos, al mismo tiempo, en el ordenador se observa la reconstrucción de la lesión.
- 6- Dependiendo del estado de degranulación morfológico, se le otorga un color falso a cada mastocito (Figura 2 y 3).

- 7- Se realiza un conteo del total de mastocitos en cada lesión por grupo y el porcentaje de mastocitos en sus diferentes estados morfológicos del total de mastocitos por lesión.

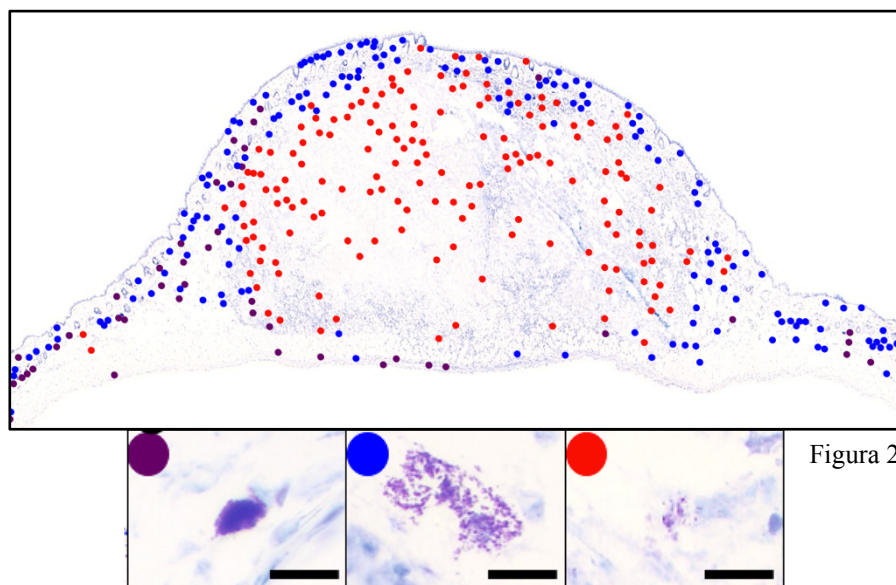


Figura 2

Figura 3

### 7.2.18 Inmunohistoquímica para IL-10+, IFN- $\gamma$ +, MOMA2+, CD4+ y CD8+ en la lesión cutánea.

Antes de realizar la inmunohistoquímica es importante tomar en cuenta lo siguiente:

- Es necesario preparar varias soluciones, ver: “Anexo 13.1 Preparación de Soluciones”.
- El análisis de diferentes poblaciones celulares utilizando diferentes anticuerpos primarios requiere la preparación y uso de diferentes buffers de bloqueo de peroxidasa, ver: “Anexos 13.1.10 y 13.1.11”.
- La concentración del anticuerpo primario depende de la población celular que se pretende analizar y el tamaño de la lesión ver: “Anexo 13.1.12 Anticuerpo primario para inmunohistoquímica (IL-10 1:200, IFN 1:250, MOMA2 1:250, CD4 1:200 y CD8 1:200)”.
- El tiempo de incubación del anticuerpo primario depende de la concentración del mismo y del tamaño de la lesión.

- La laminilla que será analizada debe tener en el extremo contrario un corte secuencial que servirá como control negativo. A este tejido se le realizará todo el procedimiento a continuación descrito, excepto agregar el anticuerpo primario.

- 1- Obtener el tejido de lesión de la manera previamente descrita en: “7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis” y congelar a -80°C.
- 2- Montar en el criostato, realizar cortes y montar en laminillas de la manera previamente descrita en: “7.2.14 Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina” los cortes se pueden almacenar a 4°C o -20°C.
- 3- Al día siguiente, tomar las laminillas que serán procesadas y dejarlas secar durante 20 minutos a temperatura ambiente en una canastilla para 12 laminillas.
- 4- Pasados los 20 minutos, retirar las laminillas de la canastilla con ayuda de una pinza y sumergirlas en un contenedor con acetona fría durante 10 minutos dentro del congelador de -20°C.
- 5- Retirar las laminillas del contenedor con acetona y colocarlas en una canastilla para 24 laminillas, dejar secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 6- Transcurridos los 20 minutos, sumergir las laminillas en 250 ml de PBS pH 7.2-7.4 durante 10 minutos. Escurrir el exceso de PBS.

A partir de este momento, el tejido no debe secarse.

- 7- Transcurridos los 10 minutos, sumergir las laminillas en 250 mL de Buffer de bloqueo de peroxidasa durante 10 minutos. El buffer varía dependiendo el anticuerpo primario que se utilice. Ver Anexo 13.1.9 (anticuerpos: CD4, CD8 en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS 0.3%) y 13.1.10 (anticuerpos: IL-10, MOMA2, IFN- $\gamma$  IL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -MeOH 0.3 %). Escurrir el exceso de Buffer sobre papel secante.

- 8- Transcurridos los 10 minutos, sumergir las laminillas en 250 mL de PBS pH 7.2-7.4 durante 5 minutos, dos veces. Escurrir el exceso de Buffer sobre papel secante.
- 9- Con mucho cuidado colocar las laminillas en una cámara húmeda acostadas con el tejido hacia arriba y añadir 200  $\mu$ L de Buffer de bloqueo (suero humano) sobre cada sección.
- 10- Cerrar la cámara húmeda e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 11- Transcurridos los 30 minutos, retirar el exceso de buffer únicamente ladeando las laminillas sobre papel secante.
- 12- Volver a colocar las laminillas en la cámara húmeda y añadir 150  $\mu$ L del anticuerpo primario a una dilución de 1:200 o 1:250 utilizando el buffer de dilución de anticuerpo primario. Ver Anexo 13.1.7 para la preparación de buffer de anticuerpo primario y Anexo 13.1.12 para conocer la dilución de cada anticuerpo primario.
- 13- Colocar un cuadro de Parafilm sobre cada tejido para evitar que se seque y cerrar la cámara húmeda.
- 14- Trasladar la cámara húmeda al refrigerador de 4°C y dejar incubando durante al menos 12 horas.
- 15- Transcurridas las 12 horas, retirar la cámara húmeda del refrigerador, destaparla y remover el Parafilm de las laminillas.
- 16- Colocar las laminillas en una canastilla para 24 laminillas y enjuagarlas sumergiéndolas en 250 mL de PBS pH 7.2-7.4 dos veces 5 minutos cada vez. Escurrir el exceso de buffer sobre papel secante.
- 17- Volver a colocar las laminillas boca arriba en una cámara húmeda y añadir 150  $\mu$ L del anticuerpo secundario Anti-Rat IgG a cada sección de tejido en una dilución 1:2000 utilizando el buffer de dilución para Anticuerpo Secundario (ver Anexo 10.1.13).

- 18- Colocar la tapa y dejar incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 19- Colocar las laminillas en una canastilla para 24 laminillas y enjuagarlas sumergiéndolas en 250 mL de PBS pH 7.2-7.4 dos veces 5 minutos cada vez. Escurrir el exceso de buffer sobre papel secante.
- 20- Volver a colocar las laminillas boca arriba en una cámara húmeda y añadir 150  $\mu$ L de Strp-HRP a cada sección de tejido en una dilución 1:1000 utilizando PBS de sobre (ver Anexo 10.1.14).
- 21- Colocar la tapa, cubrir la cámara de la luz y dejar incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 22- Colocar las laminillas en una canastilla para 24 laminillas y enjuagarlas sumergiéndolas en 250 mL de PBS pH 7.2-7.4 dos veces 5 minutos cada vez. Escurrir el exceso de buffer sobre papel secante.
- 23- Volver a colocar las laminillas boca arriba y añadir 150  $\mu$ L de Sustrato-Cromógeno (Para su preparación ver Anexo 13.1.15). En este paso es importante observar bajo el microscopio el proceso de revelado para saber cuando detener la reacción.
- 24- Decantar el exceso del Sustrato-Cromógeno y detener la reacción agregando 1 mL de PBS pH 7.2-7.4.
- 25- Enjuagar las laminillas con agua corriente durante 10 segundos.
- 26- Añadir 300  $\mu$ L de Nuclear Fast Red sobre cada tejido. Dejar actuar durante 10 segundos y volver a enjuagar con agua corriente durante 10 segundos.
- 27- Sumergir en Etanol al 70% 15 veces.
- 28- Sumergir en Etanol al 95% 15 veces.
- 29- Sumergir en Etanol al 100% durante 2 minutos.
- 30- Sumergir en Etanol al 100% durante 2 minutos.

31- Sumergir en Xilol durante 3 minutos.

32- Agregar una gota de Vecta Mount sobre el tejido y cubrirlo con un cubreobjetos.

33- Presionar gentilmente el cubreobjetos para remover las burbujas.

**7.2.19 Análisis de células IL-10+, IFN- $\gamma$ +, MOMA2+, CD4+ y CD8+ en la lesión cutánea por Inmunohistoquímica.**

1- Se obtiene el tejido de lesión de la manera previamente descrita en: “7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis” y se congela a -80°C.

2- Se monta en el criostato, se realizan cortes de la manera previamente descrita en: “7.2.14 Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina”

3- Se realiza la técnica de inmunohistoquímica de la manera previamente descrita en: “7.2.18 Inmunohistoquímica para IL-10+, IFN- $\gamma$ +, MOMA2+, CD4+ y CD8+ en la lesión cutánea.”

4- El análisis cuantitativo de células se realiza contando el número de células inmunomarcadas en 10 campos microscópicos a 40x.

5- Todos los análisis deben realizarse por triplicado.

**7.2.20 Análisis de porcentaje de IL-10 e IFN- $\gamma$  en la lesión cutánea por Inmunohistoquímica.**

1- Se obtiene el tejido de lesión de la manera previamente descrita en: “7.2.12 Sacrificio de ratones y obtención de tejido cutáneo para su análisis” y se congela a -80°C.

2- Se monta en el criostato, se realizan cortes de la manera previamente descrita en: “7.2.14 Cortes de tejido cutáneo congelado y tinción de Hematoxilina y Eosina y Azul de Toluidina”.



- 3- Se realiza la técnica de inmunohistoquímica de la manera previamente descrita en: “7.2.18 Inmunohistoquímica para IL-10+, IFN- $\gamma$ +, MOMA2+, CD4+ y CD8+ en la lesión cutánea”.
- 4- El análisis de porcentaje de citocina en tejido lesional se realiza utilizando el programa GIMP.
- 5- Para esto es necesario tomar 3 micrografías representativas de cada lesión a evaluar, cargarlas en el programa, y seleccionar los píxeles que representen un inmunomarcaje positivo en la micrografía.
- 6- Comparar la cantidad de píxeles inmunomarcados contra el resto de los píxeles no inmunomarcados en la micrografía y determinar el porcentaje que representa el inmunomarcaje.
- 7- Todos los análisis deben realizarse por triplicado.

#### **7.2.21 Inmunosupresión sistémica inducida por ciclofosfamida.**

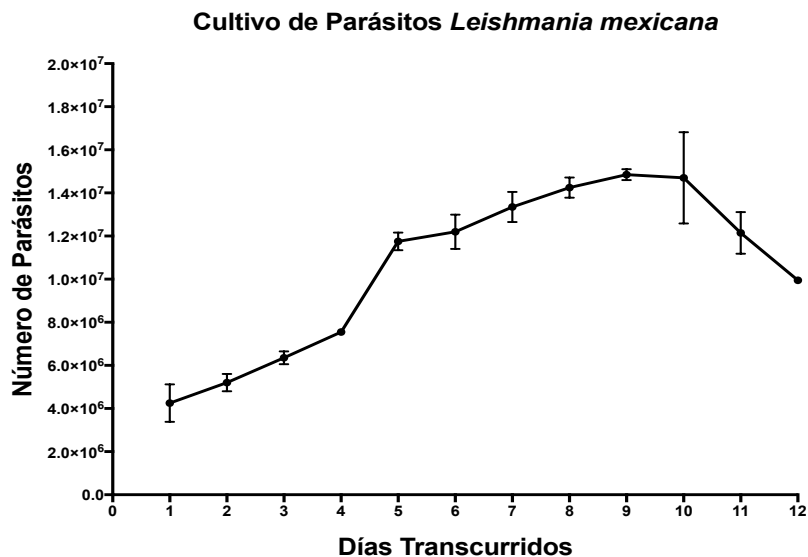
El esquema de inmunosupresión sistémica inducida por ciclofosfamida aplicado al grupo de ratones “CP + *L. mex*” consistió en administrar 1 dosis (150 mg/kg de peso) de ciclofosfamida por vía intraperitoneal cada 7 días a cada uno de los ratones pertenecientes al grupo. La primer dosis de ciclofosfamida se administró el día de la infección.

## 8. Resultados

### 8.1 Curva de crecimiento del parásito *Leishmania mexicana*.

En un escenario silvestre cuando la mosca vector transmisora de *Leishmania spp.* introduce su probóscide y regurgita al parásito, no regurgita a un grupo de parásitos con un 100% de viabilidad, si no que ésta regurgita parásitos vivos, parásitos muertos e incluso parásitos fragmentados. Se ha demostrado que la proporción de parásitos vivos:muertos se encuentra aproximadamente en un 70:30, es decir, 70% parásitos vivos, 30% parásitos muertos en el inóculo, y esta proporción juega un papel importante en el establecimiento de la infección.

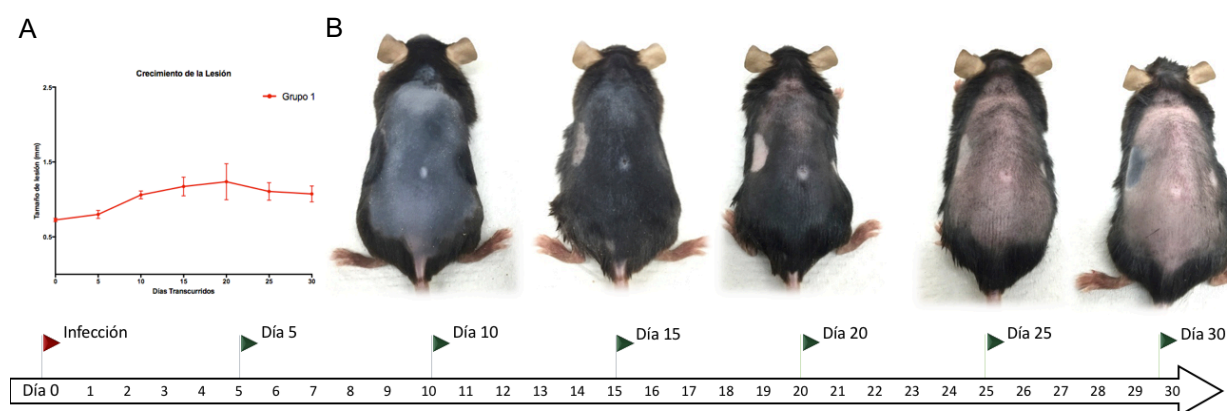
Para replicar las condiciones silvestres en el laboratorio, fue necesario realizar una curva de crecimiento del parásito para conocer su comportamiento en el cultivo y poder identificar las fases de crecimiento que reflejan el porcentaje de viabilidad. Se sabe que la fase estacionaria es donde sucede la proporción deseada 70:30 y la forma infectante del parásito (**Figura 1**).



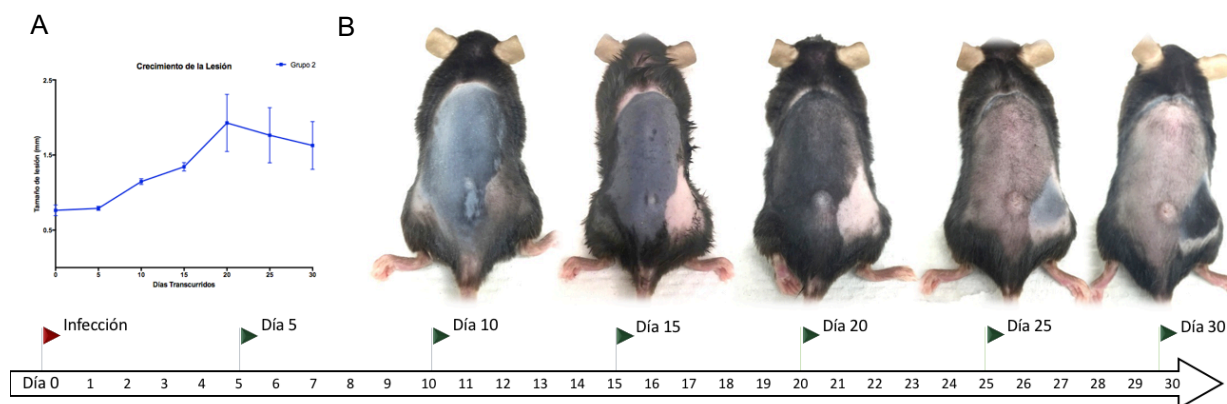
**Figura 1. Curva de crecimiento del parásito *Leishmania mexicana*.** En 3 placas de cultivo celular de 24 pocillos se sembraron promastigotes del parásito *Leishmania mexicana* a una concentración de  $1.5 \times 10^6$ /mL. Se contaron los parásitos todos los días durante 12 días por triplicado. En la curva de crecimiento se identificaron las 4 fases de crecimiento: latencia (días 1-3), exponencial (3-5), estacionaria (5-10), muerte celular (10-12).

## 8.2 Identificación de la fase de mayor infectividad del parásito en la curva de crecimiento.

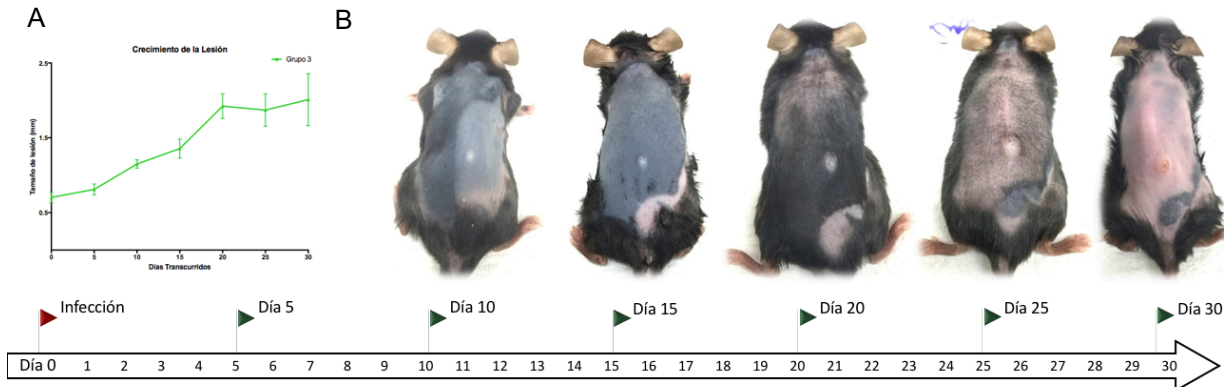
Con base en el comportamiento observado en la curva de crecimiento, se decidió tomar parásitos en los días 5, 7, 9 y 11 de cultivo (fase estacionaria y de muerte celular) e infectar 4 grupos de 3 ratones C57BL/6 cada grupo con la misma concentración de parásitos, siendo la única diferencia el día del cultivo en el que se realizó la infección. Se le dio seguimiento a las lesiones de todos los grupos durante 30 días, realizando mediciones cada 5 días (Figuras 2-6).



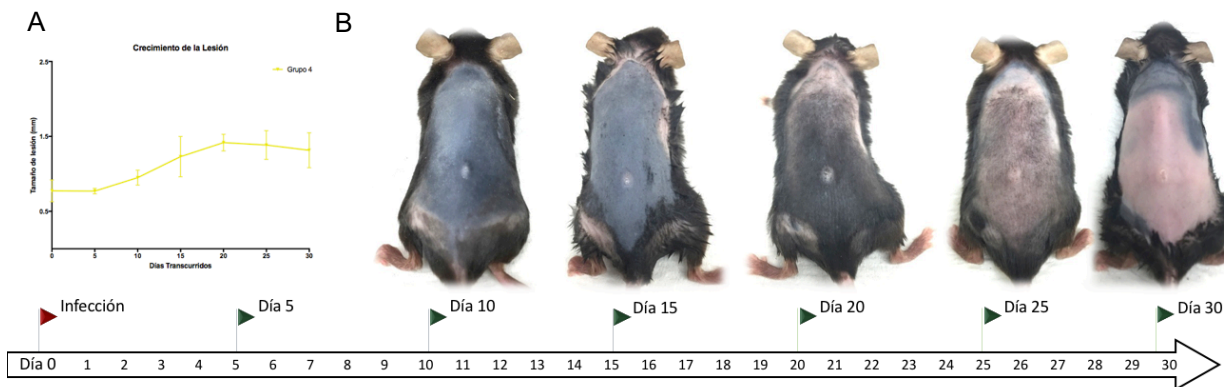
**Figura 2. Ratones infectados con  $1 \times 10^7$  de promastigotes de *L. mexicana* en el día 5 de cultivo.** Se infectaron 3 ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas de edad y se les dio seguimiento durante 30 días midiendo la lesión cada 5 días. **A)** Tamaño de la lesión (mm) en función del tiempo. **B)** Ratón representativo del grupo.



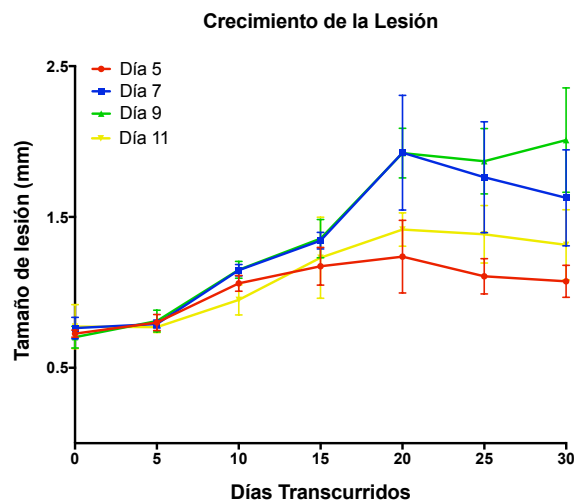
**Figura 3. Ratones infectados con  $1 \times 10^7$  de promastigotes de *L. mexicana* en el día 7 de cultivo.** Se infectaron 3 ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas de edad y se les dio seguimiento durante 30 días midiendo la lesión cada 5 días. **A)** Tamaño de la lesión (mm) en función del tiempo. **B)** Ratón representativo del grupo.



**Figura 4. Ratones infectados con  $1 \times 10^7$  de promastigotes de *L. mexicana* en el día 9 de cultivo.** Se infectaron 3 ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas de edad y se les dio seguimiento durante 30 días midiendo la lesión cada 5 días. **A)** Tamaño de la lesión (mm) en función del tiempo. **B)** Ratón representativo del grupo.

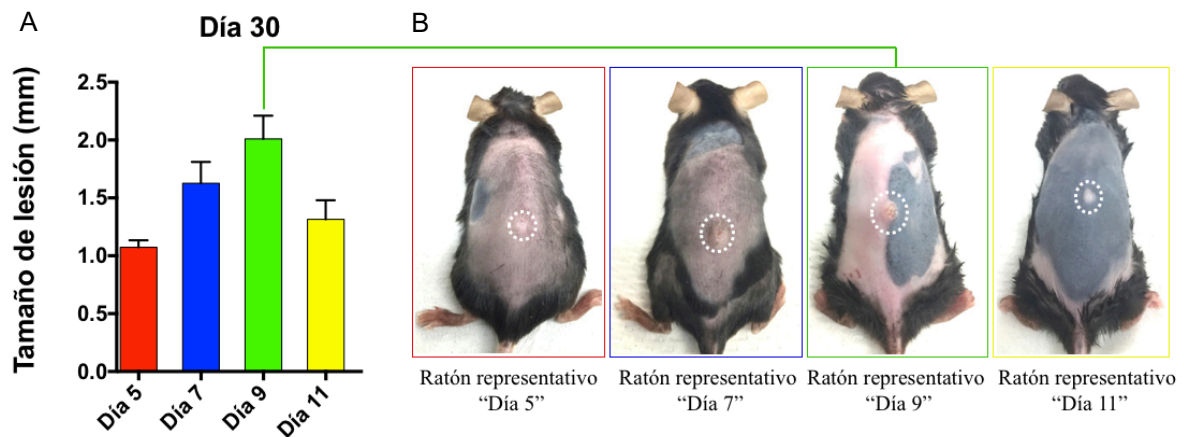


**Figura 5. Ratones infectados con  $1 \times 10^7$  de promastigotes de *L. mexicana* en el día 11 de cultivo.** Se infectaron 3 ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas de edad y se les dio seguimiento durante 30 días midiendo la lesión cada 5 días. **A)** Tamaño de la lesión (mm) en función del tiempo. **B)** Ratón representativo del grupo.



**Figura 6. Ratones infectados con  $1 \times 10^7$  de promastigotes de *L. mexicana* en los días 5, 7, 9 y 11 de cultivo.** Se infectaron 3 ratones de cada grupo y se les dio seguimiento durante 30 días midiendo la lesión cada 5 días. Los ratones infectados con parásitos en el noveno día de cultivo presentaron el mayor tamaño de lesión el día 30 de infección.

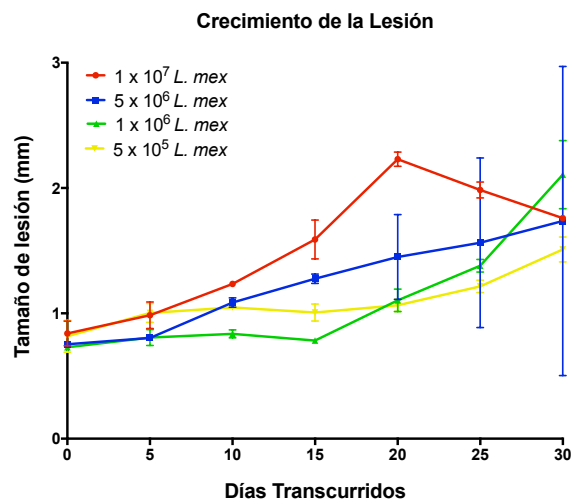
Después de 30 días de seguimiento, observamos que los ratones infectados con parásitos en el noveno día de cultivo presentaron el mayor tamaño de lesión (**Figuras 6 y 7**).



**Figura 7. Ratones infectados con parásitos en el día 9 de cultivo presentan el mayor tamaño de lesión el día 30 de infección. A) Tamaño de lesión (mm) día 30 de infección B) Ratones representativo de cada grupo el día 30 de infección. Círculo blanco: lesión.**

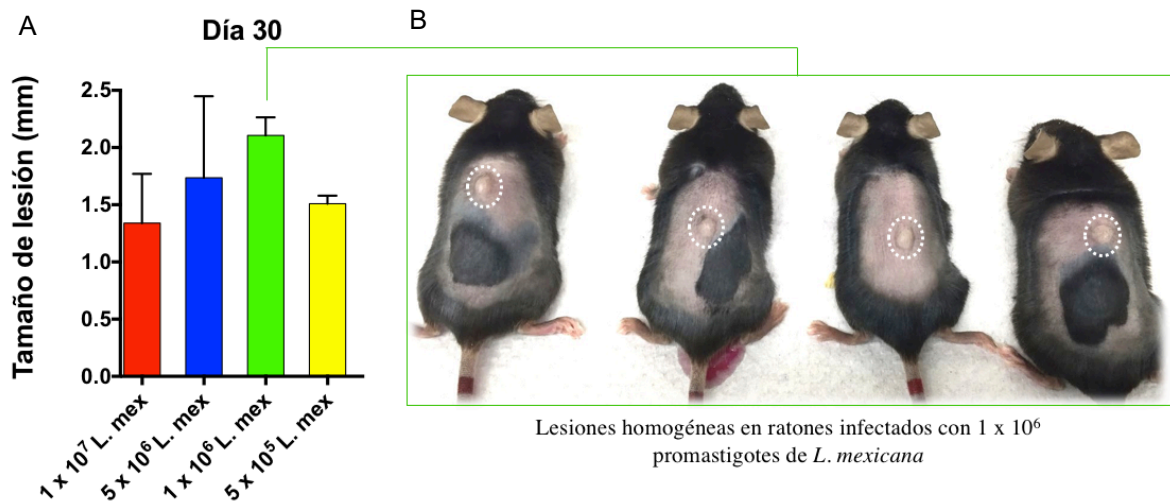
### 8.3 Determinación de la dosis óptima de promastigotes de *L. mexicana* necesaria para generar infección cutánea.

Se formaron 4 grupos de 4 ratones C57BL/6 cada grupo y se infectaron con diferentes dosis de promastigotes ( $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^5$ ) en su noveno día de cultivo. Se le dio seguimiento a las lesiones de todos los grupos durante 30 días, realizando mediciones cada 5 días (**Figura 8**).



**Figura 8. Ratones infectados con diferentes dosis de promastigotes de *L. mexicana* en el día 9 de cultivo. Se infectaron 3 ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas de edad de cada grupo y se les dio seguimiento durante 30 días midiendo la lesión cada 5 días. Los ratones infectados con  $1 \times 10^6$  de parásitos presentaron el mayor tamaño de lesión el día 30 de infección.**

Después de 30 días de seguimiento, observamos que los ratones infectados con  $1 \times 10^6$  de parásitos presentaron el mayor tamaño de lesión (**Figura 9**).



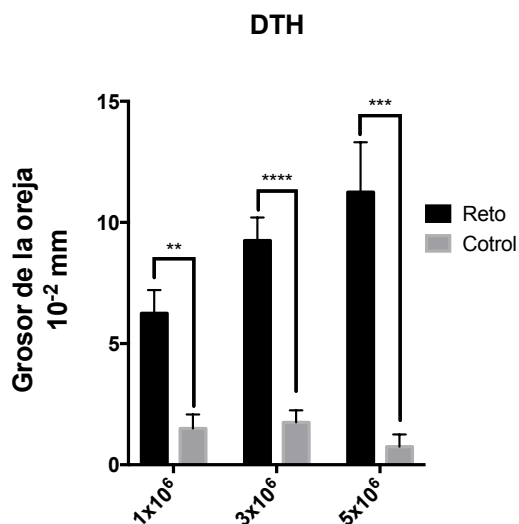
**Figura 9. Ratones infectados con  $1 \times 10^6$  promastigotes en el día 9 de cultivo presentan el mayor tamaño de lesión al día 30 de infección.** A) Tamaño de lesión (mm) día 30 de infección de los 4 grupos B) Grupo de cuatro ratones infectados con  $1 \times 10^6$  parásitos en el día 9 de cultivo. Los ratones presentan lesiones homogéneas y reproducibles a los 30 días de infección. Círculo blanco: lesión.

Con base en los resultados anteriores se estableció el modelo de infección. Experimentalmente establecimos que para lograr una infección cutánea clásica por el parásito *Leishmania mexicana* altamente reproducible, había que infectar ratones en la región dorsal del tronco, por vía intradérmica con  $1 \times 10^6$  de promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* en el día 9 de cultivo, la fase de latencia del parásito.

#### **8.4 Establecimiento de las condiciones necesarias para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía (DTH) contra antígenos de *Leishmania mexicana*.**

Tras la obtención de antígenos de *L. mexicana* a partir de congelar y descongelar un cultivo de la manera previamente descrita, se experimentó para establecer la dosis de antígenos necesaria para sensibilizar y posteriormente retar a un ratón e inducir una reacción de hipersensibilidad tardía.

Para esto se formaron 3 grupos de 4 ratones cada grupo de la cepa C57BL/6, hembras de 6-8 semanas de edad y se sensibilizaron inoculando  $1 \times 10^7$  antígenos particulados por vía subcutánea. 7 días después se retaron las orejas de los ratones de los grupos con diferentes dosis de antígenos ( $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ) y 48 horas más tarde se midió el grosor de las orejas. El grosor de las orejas retadas se comparó con un control negativo que consistió en el grosor de la oreja contralateral a la oreja retada, inyectada con agua inyectable estéril (**Figura 10**).



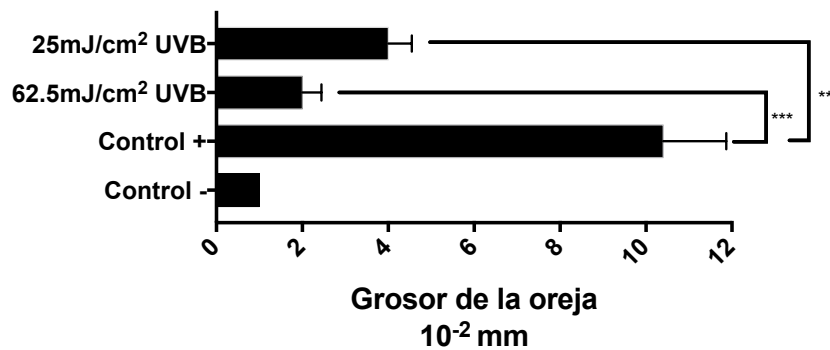
**Figura 10. Reacción de hipersensibilidad tardía (DTH) positiva en las tres condiciones experimentales.** Se sensibilizaron ratones con  $1 \times 10^7$  de antígenos y se retaron 7 días después con diferentes dosis. El grosor de las orejas fue medido 48 horas después del reto. Los 3 grupos mostraron una reacción de hipersensibilidad tardía positiva. \*\* $P < 0.01$ . \*\*\* $P < 0.001$ .

Con los resultados obtenidos se establecieron las condiciones para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía, al sensibilizar con  $1 \times 10^7$  antígenos en un volumen de  $100 \mu\text{L}$  inyectando  $50 \mu\text{L}$  en cada flanco por vía subcutánea de cada ratón y 7 días más tarde retar con 3 millones de antígenos del parásito en un volumen de  $20 \mu\text{L}$  inyectados por vía intradérmica en la oreja.

### 8.5 Supresión de la reacción de hipersensibilidad tardía tras exposición a luz UVB.

Una vez establecidas las condiciones para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía, se buscó encontrar la dosis necesaria de luz UVB a la que se tiene que exponer a un ratón para inducir una supresión de la respuesta inmune celular de memoria (DTH).

Para esto se formaron 3 grupos de 4 ratones cada grupo de la cepa C57BL/6 hembras de 6-8 semanas de edad. Dos grupos se expusieron a diferentes dosis de luz UVB (25mJ/cm<sup>2</sup> y 62.5mJ/cm<sup>2</sup>) y el tercer grupo no se expuso a luz UVB. 4 días más tarde, se sensibilizaron y se retaron los ratones de los 3 grupos de la manera previamente estandarizada y 48 horas después se midió el grosor de las orejas (**Figura 11**).



**Figura 11. Supresión de la reacción de hipersensibilidad tardía en ratones expuestos a luz UVB.** Se expusieron ratones a luz UVB y posteriormente se les indujo una DTH de la manera previamente estandarizada. Los ratones expuestos a 25mJ/cm<sup>2</sup> y 62.5mJ/cm<sup>2</sup> de UVB, suprimieron la reacción de hipersensibilidad tardía. El grupo de ratones no expuestos a UVB “Control +” presentó una reacción de hipersensibilidad tardía positiva. \*\**P* < 0.01. \*\*\**P* < 0.001

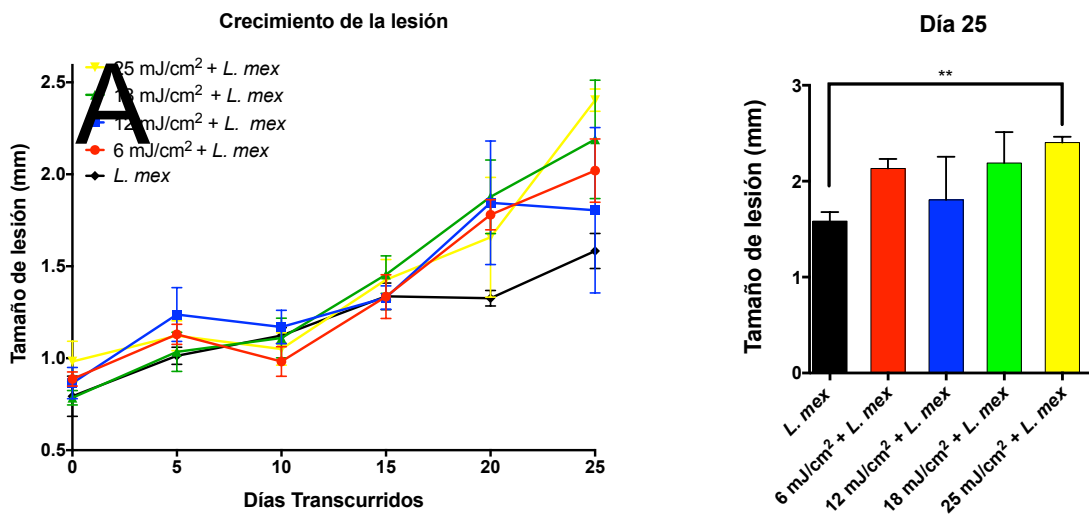
Con los resultados obtenidos se determinó la dosis inmunosupresora de luz UVB. Ratones expuestos a 25mJ/cm<sup>2</sup> y 62.5mJ/cm<sup>2</sup> de UVB 4 días antes del ensayo de DTH, suprimen la reacción de hipersensibilidad tardía, es decir, la respuesta inmune celular de memoria.



## 8.6 Evaluación de la infección por *Leishmania mexicana* en ratones expuestos a diferentes dosis de radiación UVB; primer acercamiento.

Con base en estos resultados se decidió realizar un ensayo para evaluar la evolución de la infección por el parásito *Leishmania mexicana* en ratones expuestos a distintas dosis de radiación UVB, incluida la dosis ya demostrada ser inmunosupresora de 25mJ/cm<sup>2</sup>.

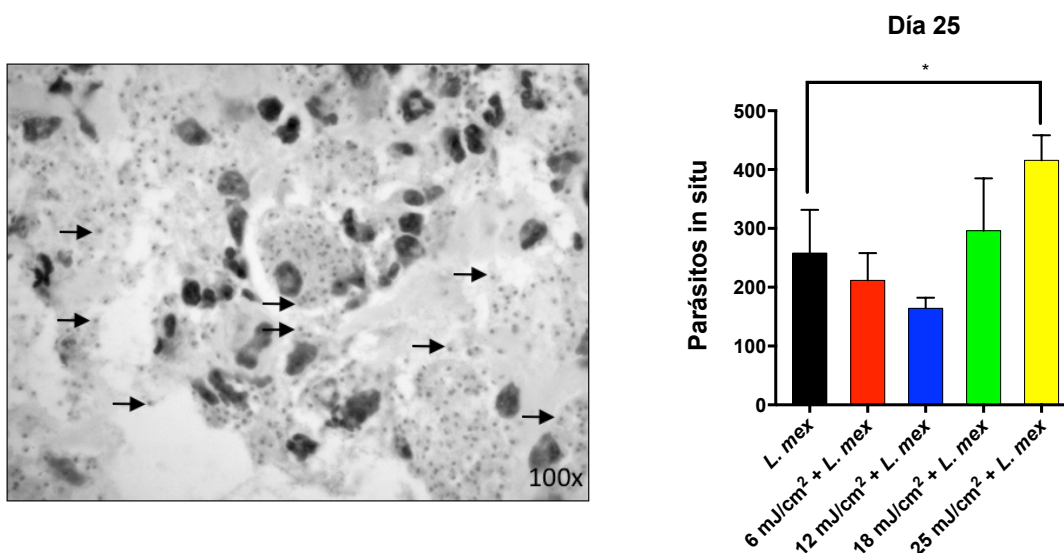
Para esto se formaron 5 grupos de 3 ratones cada grupo de la cepa C57BL/6 hembras de 6-8 semanas de edad. Cuatro grupos se expusieron a diferentes dosis de luz UVB (6mJ/cm<sup>2</sup>, 12mJ/cm<sup>2</sup>, 18mJ/cm<sup>2</sup> y 25mJ/cm<sup>2</sup>) y el quinto grupo no se expuso a luz UVB. 4 días más tarde, se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* y se les dio un seguimiento durante 25 días (Figura 12).



**Figura 12. Los ratones expuestos a luz UVB e infectados presentan un mayor tamaño de lesión el día 25 de infección que los no expuestos e infectados. A)** Grupos de 4 ratones C57BL/6 se expusieron a 6-25 mJ/cm<sup>2</sup> de UVB o no se expusieron y posteriormente se infectaron con amastigotes de *L. mexicana*, el tamaño de lesión se monitorizó durante 25 días. **B)** Tamaño de lesión el día 25 de infección. \*\* $P < 0.01$

Los resultados muestran que los ratones inmunosuprimidos con UVB (25mJ/cm<sup>2</sup>) e infectados, desarrollan un mayor tamaño de lesión que los no expuestos e infectados.

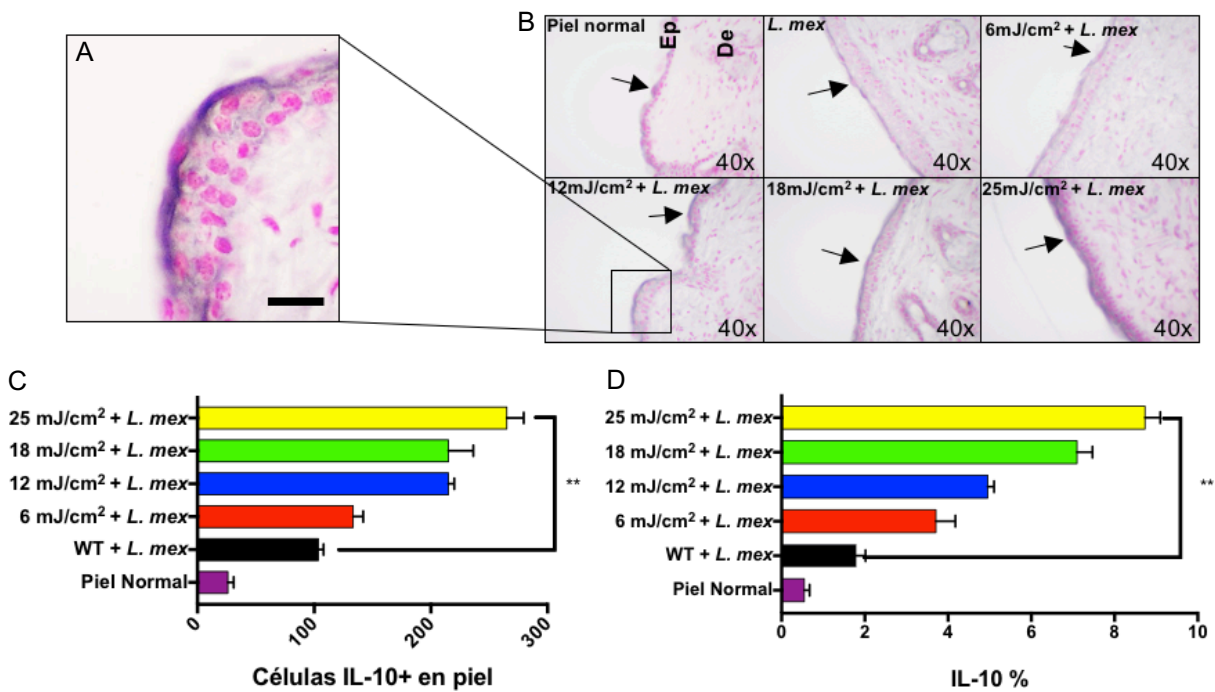
Al día 25 de la infección los ratones fueron sacrificados y se realizó un análisis semicuantitativo para determinar la cantidad de parásitos en la lesión. Observamos que los ratones inmunosuprimidos con UVB ( $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) e infectados presentaron una mayor cantidad de parásitos en el sitio de la lesión que los no inmunosuprimidos e infectados (**Figura 13**).



**Figura 13. Análisis semicuantitativo de parásitos en la lesión.** Después de 25 días de infección los ratones se sacrificaron, se realizaron cortes congelados del tejido de la lesión y tiñeron con H&E. El número de parásitos se determinó contando tres campos a 100x de cada lesión. (Flechas negras: amastigote *Leishmania mexicana*). \* $P < 0.05$

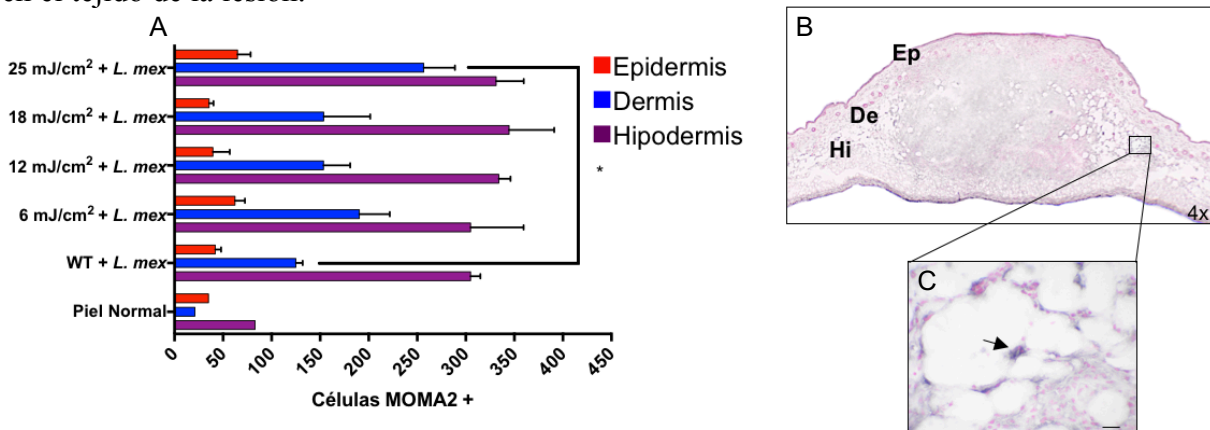
Los ratones radiados con dosis menores a  $25\text{mJ}/\text{cm}^2$  (dosis no inmunosupresoras) no presentaron una diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de la lesión ni en la cantidad de parásitos en la lesión el día 25 de infección en comparación con los no radiados e infectados.

Con base en estos resultados y la evidente diferencia en el tamaño de lesión y la cantidad de parásitos *in situ* entre los grupos, como acercamiento preliminar se decidió realizar un análisis de la presencia de células IL-10 positivas y porcentaje de IL-10 en el tejido de la lesión por medio de la técnica de inmunohistoquímica (**Figura 14**). También se evaluó la presencia y distribución de macrófagos en la lesión de los diferentes grupos (**Figura 15**).



**Figura 14. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IL10 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con amastigotes de *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (25mJ/cm<sup>2</sup> + *L. mex*). Día 25 de infección. A) Célula IL-10+ de la epidermis. B) Micrografías representativas de cada grupo inmunomarcadas IL-10+, se observan células IL-10+ (flechas). C) Número de células IL-10+ en 10 campos microscópicos a 40x. D) Porcentaje de IL-10 en tejido se determinó por análisis de píxeles. Ep: epidermis. De: dermis. Barra de referencia: 15µm. \*\**P* < 0.01**

Los resultados muestran que los ratones inmunosuprimidos con UVB (25mJ/cm<sup>2</sup>) e infectados, presentan una mayor cantidad de células IL-10+ en la epidermis y una mayor cantidad de IL-10 en el tejido de la lesión.

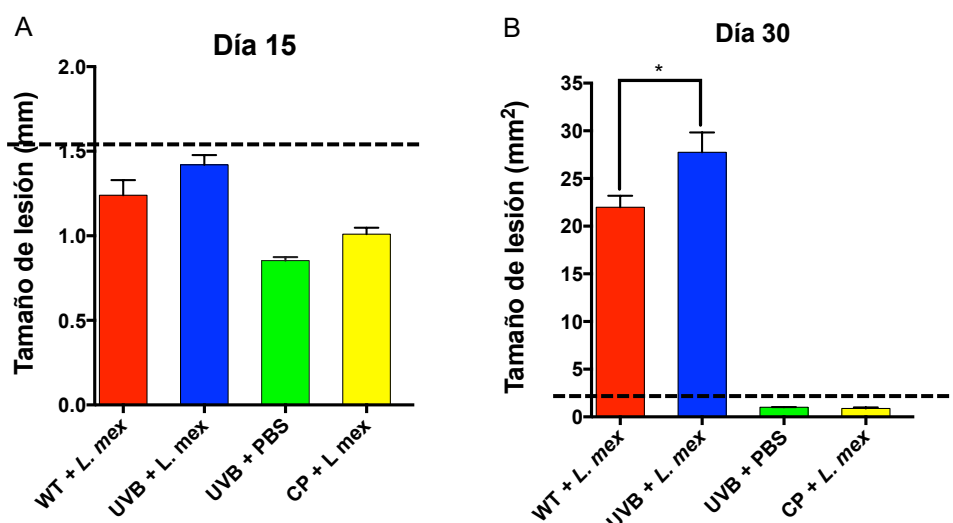


**Figura 15. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-MOMA2 como anticuerpo primario. Día 25 de infección. El número de células MOMA2+ en epidermis, dermis, e hipodermis se determinó contando 10 campos microscópicos en cada capa de la piel a 40x. A) Número de células MOMA2+ en las diferentes capas de la piel. B) Lesión cutánea inmunomarcada. C) Célula MOMA2+ en hipodermis (flecha). Ep: epidermis. De: dermis. Hi: hipodermis. Barra de referencia: 15µm. \**P* < 0.05**

Los resultados muestran que los ratones inmunosuprimidos con UVB ( $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) e infectados presentan una mayor cantidad de células MOMA2+ en la dermis en comparación con los ratones no inmunosuprimidos e infectados.

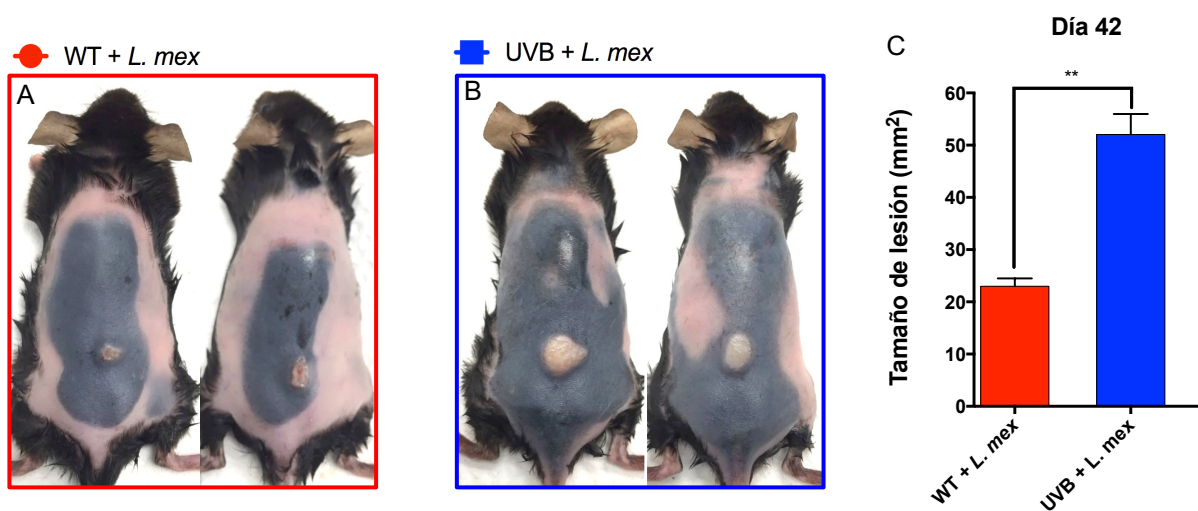
### 8.7 Evaluación macroscópica de la lesión cutánea en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana* y determinación de la carga parasitaria por dilución limitante.

Se formaron 4 grupos de 6 ratones cada grupo. El primer grupo (WT + *L. mex*) consistió en ratones WT infectados. El segundo grupo (UVB + *L. mex*) consistió en ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados. El tercer grupo (UVB + PBS) consistió en ratones inmunosuprimidos con luz UVB e inoculados con PBS. El cuarto grupo (CP + *L. mex*) consistió en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida e infectados. Todos los ratones se infectaron con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *Leishmania mexicana* en su noveno día de cultivo (fase estacionaria). Se midieron las lesiones cada 5 días durante 42 días y se determinó la carga parasitaria al finalizar el ensayo (Figuras 16-18).



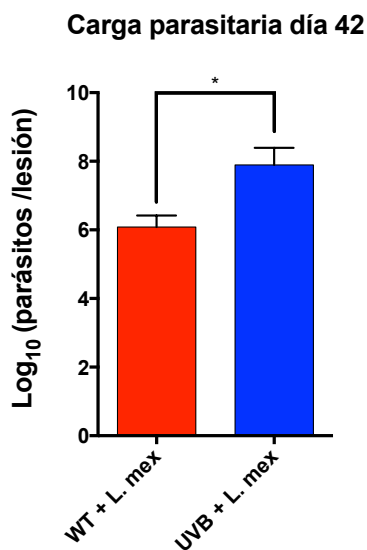
**Figura 16.** Los ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados (UVB + *L. mex*) presentan un mayor tamaño de lesión al día 30 de infección que los no expuestos a UVB e infectados (WT + *L. mex*). Grupos de 6 ratones WT, inmunosuprimidos por UVB (UVB+) e inmunosuprimidos por ciclofosfamida (CP+), fueron infectados en la región dorsal del tronco por vía intradérmica con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana*. Y se les dio seguimiento durante 30 días. **A)** Tamaño de lesión día 15, sin diferencia entre los grupos. **B)** Día 30, los ratones UVB + *L. mex* presentan el mayor tamaño de lesión. \* $P < 0.05$

Los resultados muestran que los ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados (UVB + *L. mex*) presentan un mayor tamaño de lesión al día 30 de infección que los ratones no expuestos a UVB e infectados (WT + *L. mex*). Por otro lado, los ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida e infectados (CP + *L. mex*) no desarrollaron lesión aparente al día 30 de infección (**Figura 16**). La diferencia en el tamaño de lesión se volvió aún más evidente y aumentó en significancia estadística el día 42 de infección; los ratones inmunosuprimidos e infectados presentaron un mayor tamaño de lesión que los no inmunosuprimidos e infectados (**Figura 17**).



**Figura 17.** Los ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados (UVB + *L. mex*) presentan un mayor tamaño de lesión al día 42 de infección que los no expuestos a UVB e infectados (WT + *L. mex*). Grupos de 3 ratones se infectaron en la región dorsal del tronco de la manera descrita en la leyenda de la Figura 16. (A y B) Ratones representativo de cada grupo el día 42 de infección. (C) Tamaño de lesión (mm<sup>2</sup>) día 42 de infección. \*\* $P < 0.01$

El día 42 los ratones fueron sacrificados y se realizó la determinación de carga parasitaria por medio de la técnica de dilución limitante. Los resultados mostraron que los ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados (UVB + *L. mex*) presentaron una mayor carga parasitaria en la lesión que los ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*) (**Figura 18**). Los ratones inmunosuprimidos e infectados no solo presentan un mayor tamaño de lesión, sino que también una mayor cantidad de parásitos en la lesión.

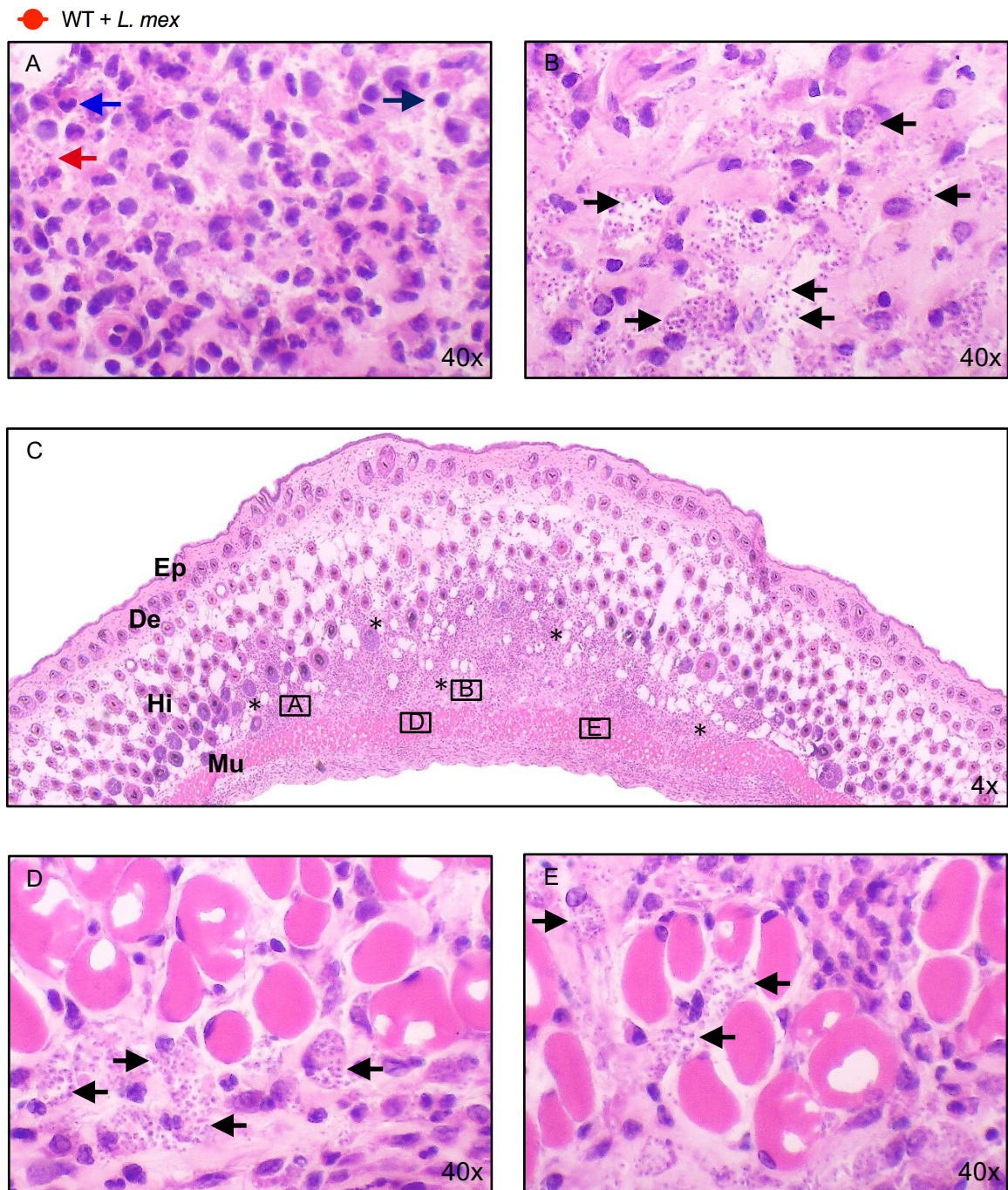


**Figura 18.** Los ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados (UVB + *L. mex*) presentan una mayor carga parasitaria el día 42 de infección que los no expuestos a UVB e infectados (WT + *L. mex*). Grupos de 3 ratones se infectaron en la región dorsal del tronco de la manera descrita en la leyenda de la Figura 16. El día 42 de infección se realizó la determinación de carga parasitaria por medio de la técnica de dilución limitante. \* $P < 0.05$ .

### 8.8 Evaluación histopatológica de la lesión cutánea en ratones C57BL/6

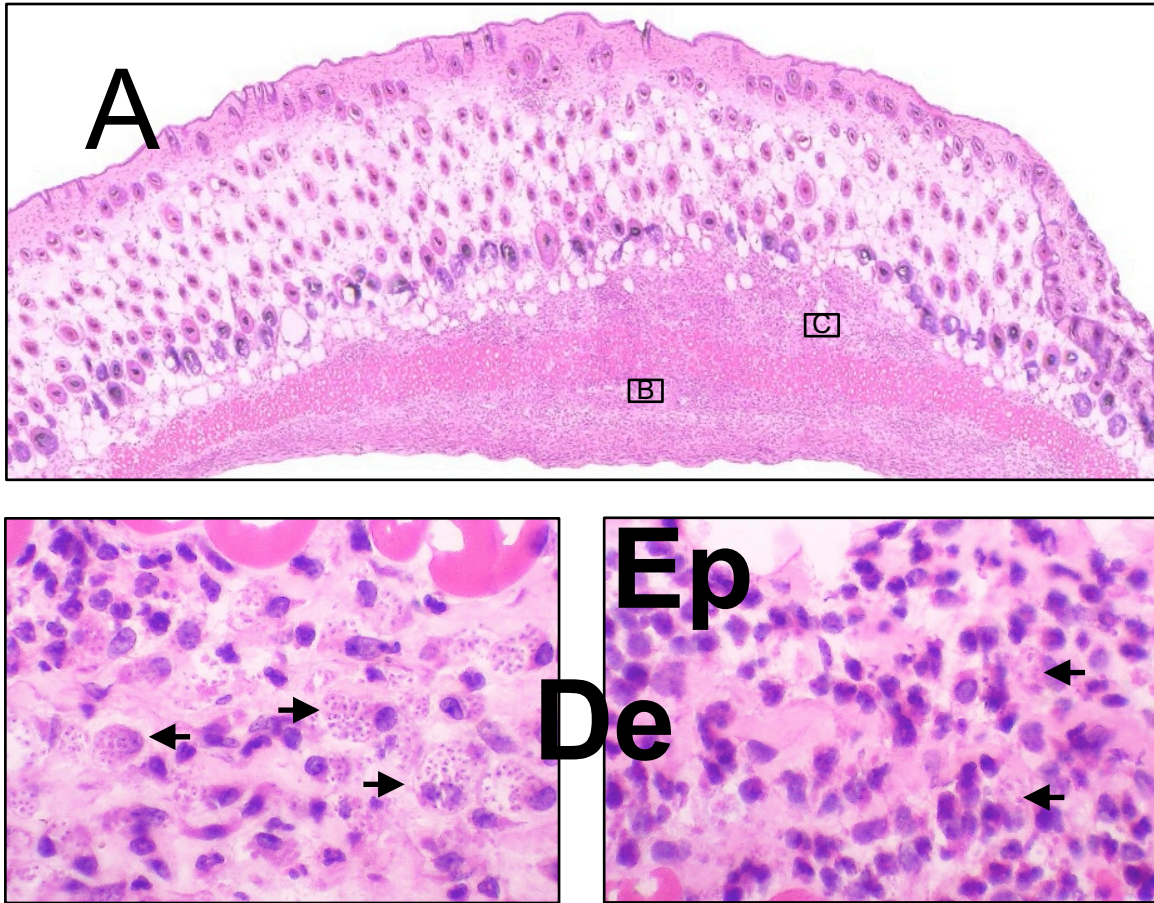
#### **inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana*.**

Se formaron 4 grupos de 6 ratones cada grupo. El primer grupo (WT + *L. mex*) consistió en ratones WT infectados. El segundo grupo (UVB + *L. mex*) consistió en ratones inmunosuprimidos con luz UVB e infectados. El tercer grupo (UVB + PBS) consistió en ratones inmunosuprimidos con luz UVB e inoculados con PBS. El cuarto grupo (CP + *L. mex*) consistió en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida e infectados. Todos los ratones se infectaron con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *Leishmania mexicana* en su noveno día de cultivo (fase estacionaria). Se midieron las lesiones cada 5 días durante 42 días y se sacrificaron 3 ratones de cada grupo los días 15 y 30 de infección. Se obtuvo el tejido lesional, se congeló y tiñó con H&E para realizar el análisis histopatológico (**Figuras 19-24**).



**Figura 19. Lesión cutánea de ratón no inmunosuprimido e infectado (WT + *L. mex*); día 15 de infección.** Después de 15 días de infección los ratones se sacrificaron, se realizaron cortes congelados del tejido de la lesión y tiñeron con H&E. **(A)** Infiltrado celular en la hipodermis, se observan células PMN, linfocitos y células fagocíticas (flechas). **(B)** Amastigotes de *L. mexicana* dentro de células fagocíticas y en el intersticio (flechas). **(C)** Infiltrado celular difuso confinado en la hipodermis con invasión a la capa muscular, presencia de amastigotes en intersticio y células parasitadas (asteriscos) en toda la lesión. **(D y E)** Infiltrado celular en la capa muscular, se observan células PMN, linfocitos y células fagocíticas. Amastigotes en intersticio y células parasitadas (flechas). Ep: epidermis. De: dermis. Hi: hipodermis. Mu: capa muscular.

■ UVB + *L. mex*



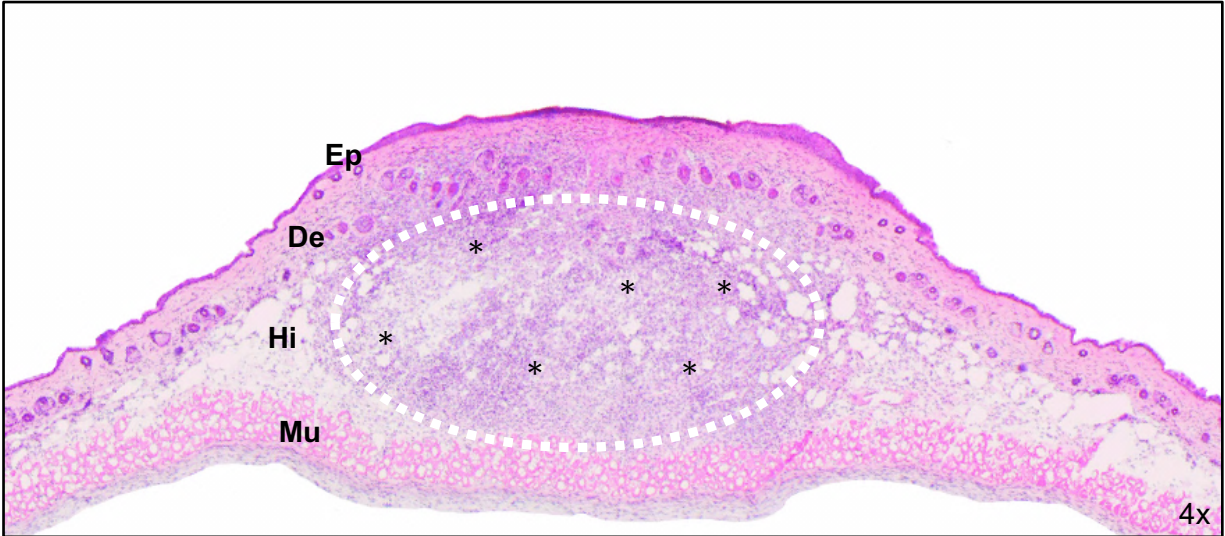
**Figura 20. Lesión cutánea de ratón inmunosuprimido e infectado (UVB + *L. mex*); día 15 de infección.** Después de 15 días de infección los ratones se sacrificaron, se realizaron cortes congelados del tejido de la lesión y tiñeron con H&E. (A) Infiltrado celular difuso en la hipodermis con invasión a la capa muscular e importante presencia parasitaria en capa submuscular. Presencia de amastigotes en intersticio y células parasitadas (asteriscos) en toda la lesión. (B) Amastigotes de *L. mexicana* dentro de células fagocíticas y en el intersticio (flechas) debajo de la capa muscular. (C) Células PMN, linfocitos y células fagocíticas. Amastigotes en intersticio y células parasitadas. Ep: epidermis. De: dermis. Hi: hipodermis. Mu: capa muscular.

El análisis histopatológico a los 15 días de infección en ambos grupos, mostró un infiltrado celular difuso en la hipodermis con invasión a la capa muscular, presencia de amastigotes en intersticio y células parasitadas en toda la lesión. Se observó la presencia de células PMN, linfocitos y células fagocíticas en el infiltrado (Figura 19). En las lesiones de los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex.*) se observó la presencia de parásitos y células fagocíticas parasitadas debajo de la capa muscular, a diferencia de los ratones no



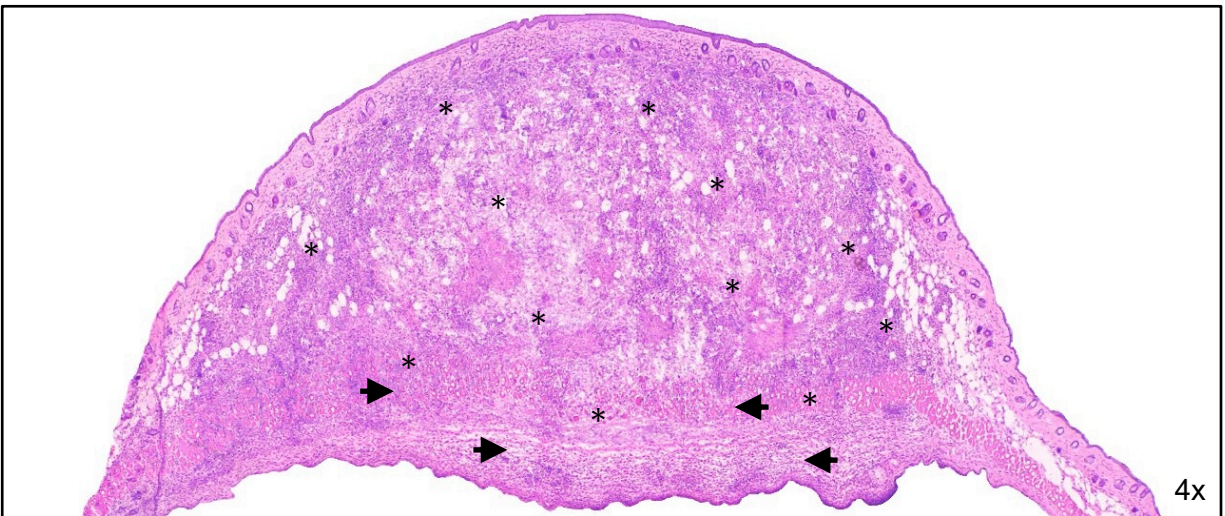
inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*) donde la presencia de parásitos y células parasitadas se limita en la capa muscular y no debajo de ella (**Figura 20**).

● WT + *L. mex*



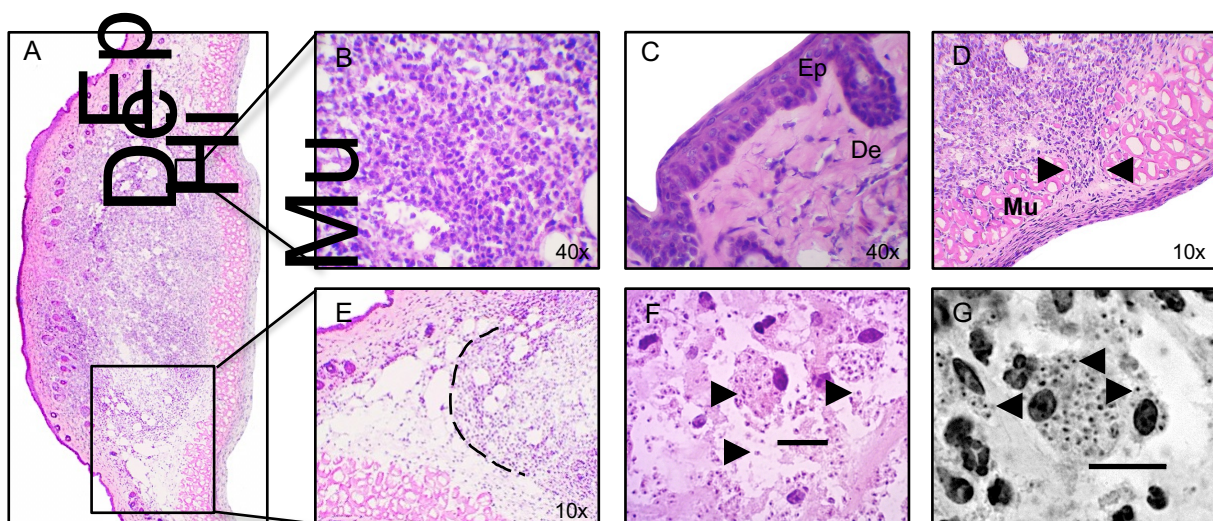
**Figura 21. Lesión cutánea de ratón no inmunosuprimido e infectado (WT + *L. mex*); día 30 de infección.** Después de 30 días de infección los ratones se sacrificaron, se realizaron cortes congelados del tejido de la lesión y tiñeron con H&E. Se observa un infiltrado celular contenido en la dermis e hipodermis sin invasión a la capa muscular, con una predominancia de linfocitos y de células fagocíticas. Presencia de amastigotes dentro de células fagocíticas y en el intersticio (asteriscos). Estructura celular de contención del agente infeccioso (Línea discontinua) Ep: epidermis. De: dermis. Hi: hipodermis. Mu: capa muscular.

■ UVB + *L. mex*



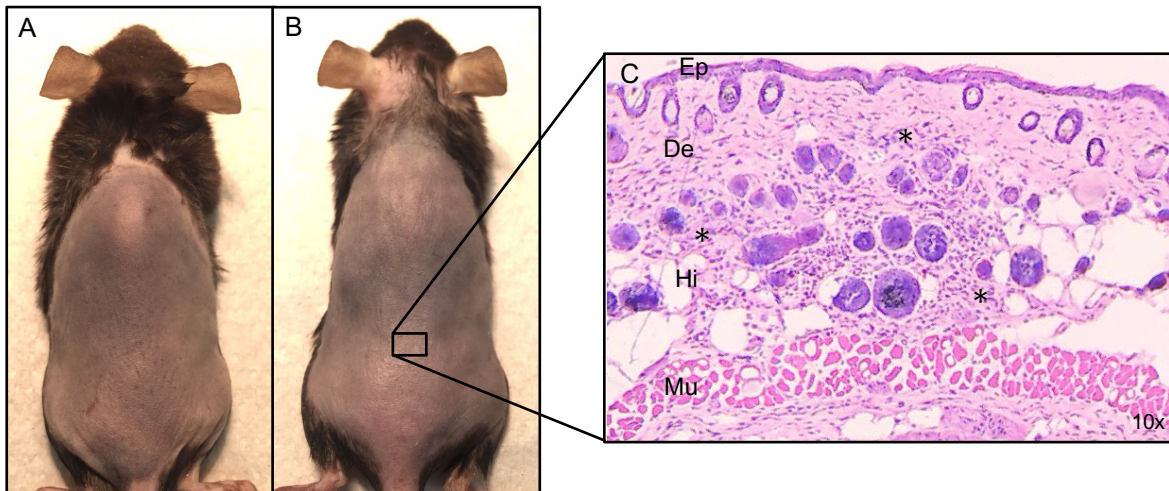
**Figura 22. Lesión cutánea de ratón inmunosuprimido e infectado (UVB + *L. mex*); día 30 de infección.** Se observa una lesión descontrolada sin una estructura de contención del agente infeccioso. Presencia de un Infiltrado celular en la dermis, hipodermis, muscular y submuscular. Predominancia de linfocitos y de células fagocíticas. Presencia de amastigotes dentro de células fagocíticas y en el intersticio (asteriscos). Parásitos en la capa muscular y submuscular (flechas). Ep: epidermis. De: dermis. Hi: hipodermis. Mu: capa muscular.

El análisis histopatológico a los 30 días de infección en los ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*) mostró un infiltrado celular contenido en la dermis e hipodermis sin invasión a la capa muscular, con una predominancia de linfocitos y células fagocíticas. Se observó la formación de una estructura de contención tisular al rededor del agente infeccioso y de células parasitadas (**Figura 21 y 23**). En los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex*.) se observó una lesión descontrolada sin una estructura de contención del agente infeccioso. Presencia de un infiltrado celular en la dermis, hipodermis, muscular y submuscular y predominancia de linfocitos y de células fagocíticas (**Figura 22 y 23**).



**Figura 23. Análisis histológico de lesión cutánea de ratones WT + *L. mex* y UVB + *L. mex*; Día 30.** (A) Vista panorámica de lesión de ratón WT + *L. mex*. Se observa infiltrado celular denso en dermis (De) e hipodermis (Hi). (B) Infiltrado linfocitario en la periferia de la lesión. (C) Aumento de grosor de la epidermis (Ep) y dermis en ratones UVB + *L. mex*. (D) Amastigotes invadiendo la capa muscular (Mu) en ratones UVB + *L. mex* (flechas). (E) Muro de contención tisular entre piel sana y lesión (línea discontinua). (F y G) Amastigotes presentes dentro y fuera de células fagocíticas (flechas). Barra de referencia: 15µm.

En los ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida e infectados (CP + *L. mex*.) no se observó el desarrollo macroscópico de una lesión cutánea. Sin embargo, al realizar el análisis histológico del tejido cutáneo, se observó la presencia de amastigotes y de células fagocíticas infectadas a los 30 días de infección (**Figura 24**).

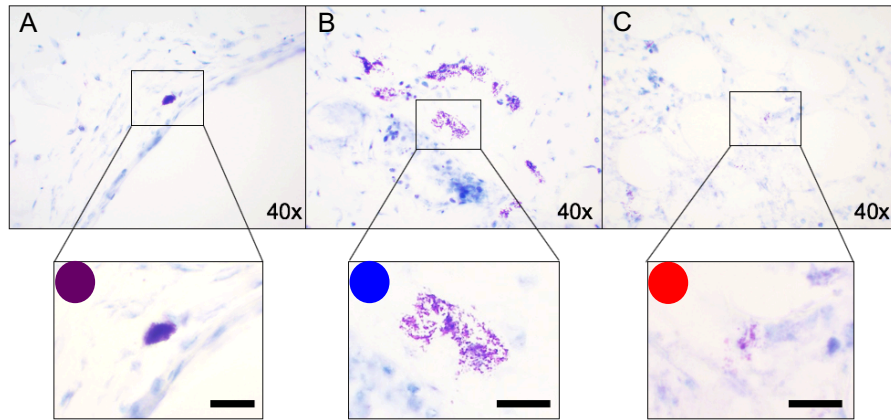


**Figura 24. Análisis histológico de la piel de ratones CP + *L. mex*; Día 30.** En los ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida e infectados (CP + *L. mex*) no se observó el desarrollo macroscópico de una lesión cutánea. Sin embargo, al realizar el análisis histológico del tejido cutáneo, se observó la presencia de amastigotes y de células fagocíticas infectadas a los 30 días de infección. (A y B) Ratones sin lesión aparente a los 30 días. (C) Infiltrado celular mixto (PMN, linfocitos, fagocitos) en la dermis e hipodermis del sitio del inóculo. Se observa la presencia de amastigotes dentro de células fagocíticas (asteriscos). Ep: epidermis. De: dermis. Hi: hipodermis. Mu: capa muscular.

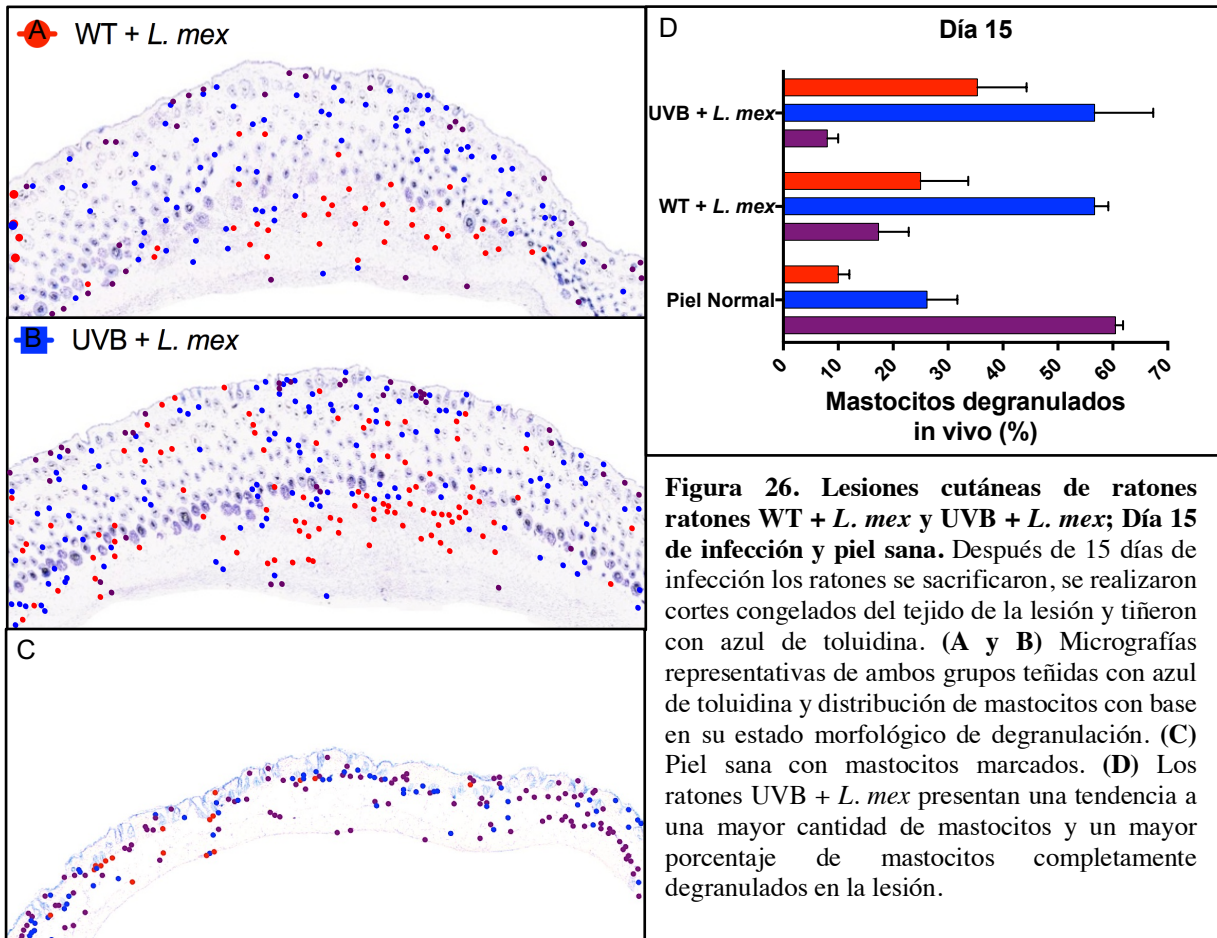
### 8.9 Evaluación de la presencia, distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos en lesiones cutánea de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana*.

A partir del tejido de los cuatro grupos experimentales mencionados anteriormente (Resultado 8.8) se realizaron cortes congelados y se tiñeron con azul de toluidina. Se observó la presencia de mastocitos distribuidos en el tejido sano y en las lesiones y se identificaron 3 estados morfológicos de degranulación. A cada estado morfológico se le otorgó un color falso para poder observar su distribución en las lesiones (**Figura 25**). En las lesiones de 15 días de evolución de los ratones UVB + *L. mex* se observó una mayor cantidad de mastocitos y un mayor porcentaje de mastocitos completamente degranulados que los ratones WT + *L. mex*. En estas lesiones se observa un patrón en la distribución de mastocitos, encontrándose una mayor

cantidad de mastocitos completamente degranulados en el interior de la lesión y mastocitos degranulados o en reposo en la periferia o fuera de ella (**Figura 26**).

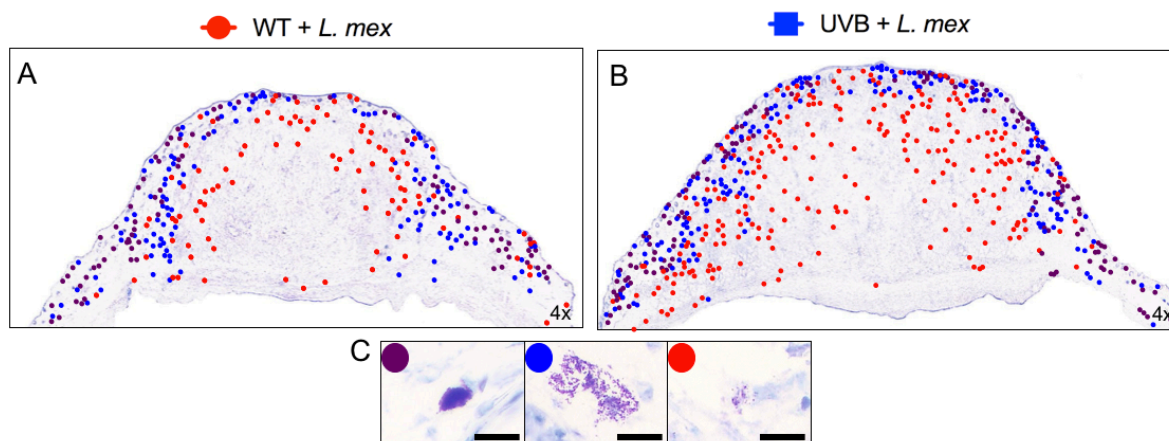


**Figura 25. Estado morfológico de los mastocitos en tejido cutáneo.** A partir del tejido de los grupos experimentales se realizaron cortes congelados y se tiñieron con azul de toluidina. Se observó la presencia de mastocitos distribuidos en el tejido sano y en las lesiones y se identificaron 3 estados morfológicos de degranulación. A cada estado morfológico se le otorgó un color falso para poder observar su distribución en las lesiones. **A)** Mastocito en reposo. **B)** Mastocito en degranulación. **C)** Mastocito completamente degranulado.

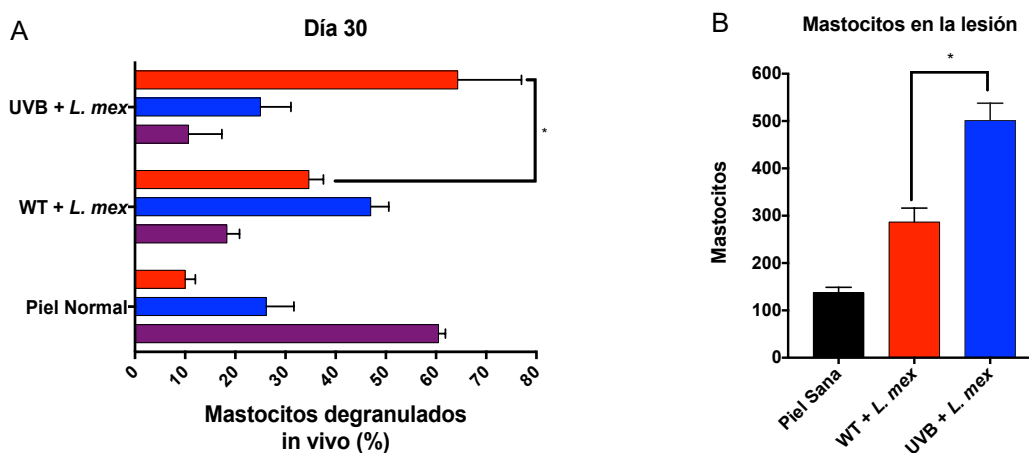


**Figura 26. Lesiones cutáneas de ratones ratones WT + *L. mex* y UVB + *L. mex*; Día 15 de infección y piel sana.** Después de 15 días de infección los ratones se sacrificaron, se realizaron cortes congelados del tejido de la lesión y tiñeron con azul de toluidina y distribución de mastocitos con base en su estado morfológico de degranulación. **(C)** Piel sana con mastocitos marcados. **(D)** Los ratones UVB + *L. mex* presentan una tendencia a una mayor cantidad de mastocitos y un mayor porcentaje de mastocitos completamente degranulados en la lesión.

En las lesiones de 30 días de evolución de los ratones UVB + *L. mex* se observó una mayor cantidad de mastocitos y un mayor porcentaje de mastocitos completamente degranulados que los ratones WT + *L. mex*. En estas lesiones se observa un patrón en la distribución similar de mastocitos, encontrándose una mayor cantidad de mastocitos completamente degranulados en el interior de la lesión y mastocitos degranulados o en reposo en la periferia o fuera de ella (Figuras 27 y 28).



**Figura 27. Lesiones cutáneas de ratones WT + *L. mex* y UVB + *L. mex*; Día 30 de infección.** Después de 30 días de infección los ratones se sacrificaron, se realizaron cortes congelados del tejido de la lesión y tiñeron con azul de toluidina. (A y B) Micrografías representativas de ambos grupos teñidas con azul de toluidina y distribución de mastocitos con base en su estado morfológico de degranulación. (C) Color asignado dependiendo estado morfológico de degranulación. Barra de referencia: 15  $\mu$ m.

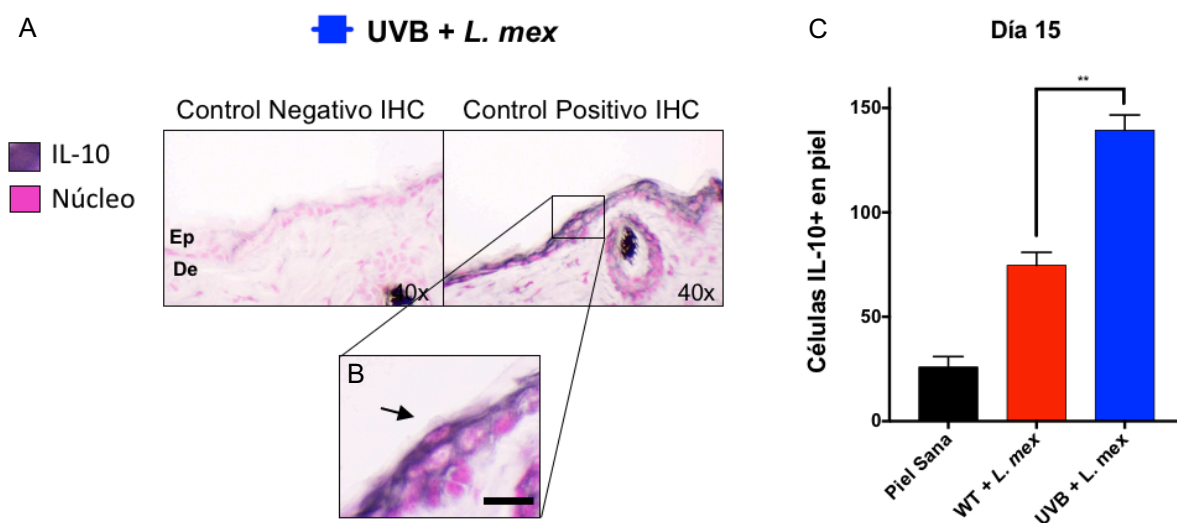


**Figura 28. Análisis de mastocitos en lesiones de ratones WT + *L. mex* y UVB + *L. mex*; Día 30 de infección.** Después de 30 días de infección los ratones se sacrificaron, se realizaron cortes congelados del tejido de la lesión y tiñeron con azul de toluidina. (A) Las lesiones se evaluaron morfológicamente para determinar el porcentaje (%) de mastocitos degranulados. (B) El número de mastocitos se determinó contando células en 10 campos microscópicos a 40x. \* $P < 0.05$ .

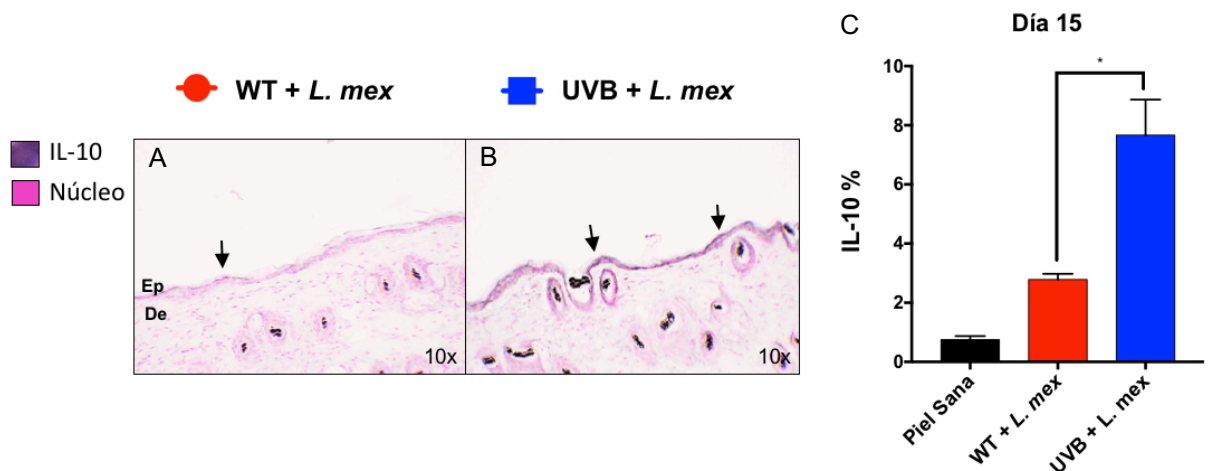
## 8.10 Evaluación de la respuesta inmune local en las lesiones cutáneas de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana*.

A partir del tejido de los cuatro grupos experimentales mencionados anteriormente (Resultado 8.8) se realizaron cortes congelados de lesiones en los días 15 y 30 de infección y se realizó la técnica de inmunohistoquímica utilizando como anticuerpos primarios: IL-10, IFN- $\gamma$ , CD4, CD8 y MOMA2 para la detección de células IL-10+, IL-10 en tejido, células IFN- $\gamma$ +, IFN- $\gamma$  en tejido, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y macrófagos MOMA2+.

Tras el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IL10 como anticuerpo primario, se observaron y cuantificaron una mayor cantidad de células IL-10+ en la epidermis de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* en las lesiones de 15 días de evolución (**Figura 29**). También se observó una mayor cantidad de IL-10 en el tejido de la lesión tras realizado el análisis de píxeles del tejido lesional a los 15 día de evolución (**Figura 30**).

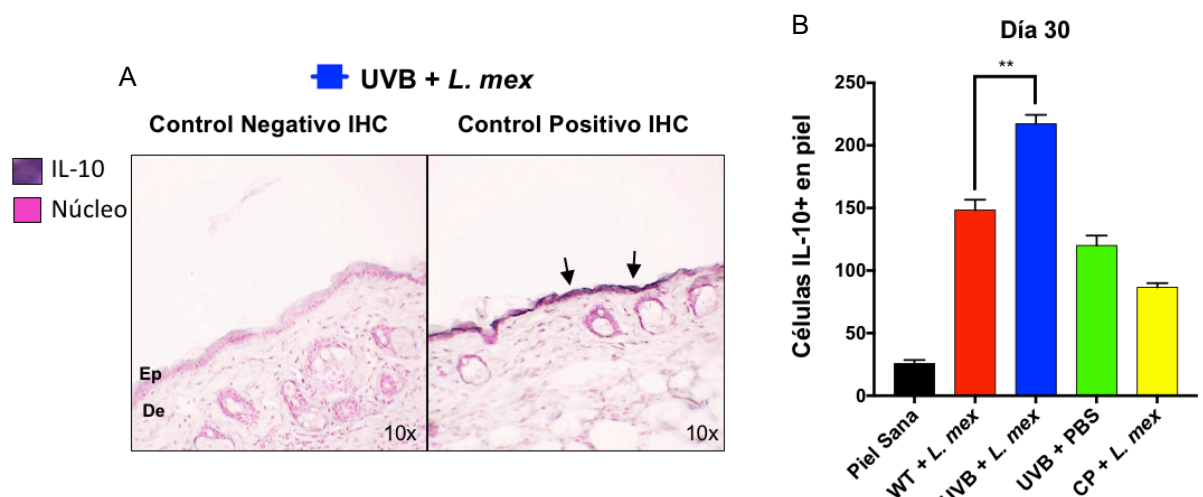


**Figura 29.** Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IL10 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 15 de infección. IHQ representativa de grupo UVB + *L. mex*. (A) Control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC) al control negativo no se le agrega anticuerpo primario anti-IL10. (B) Célula IL-10 positiva (flecha). (C) Número de células IL-10+ en 10 campos microscópicos a 40x. Barra de referencia: 15 $\mu$ m. \*\* $P < 0.01$ .



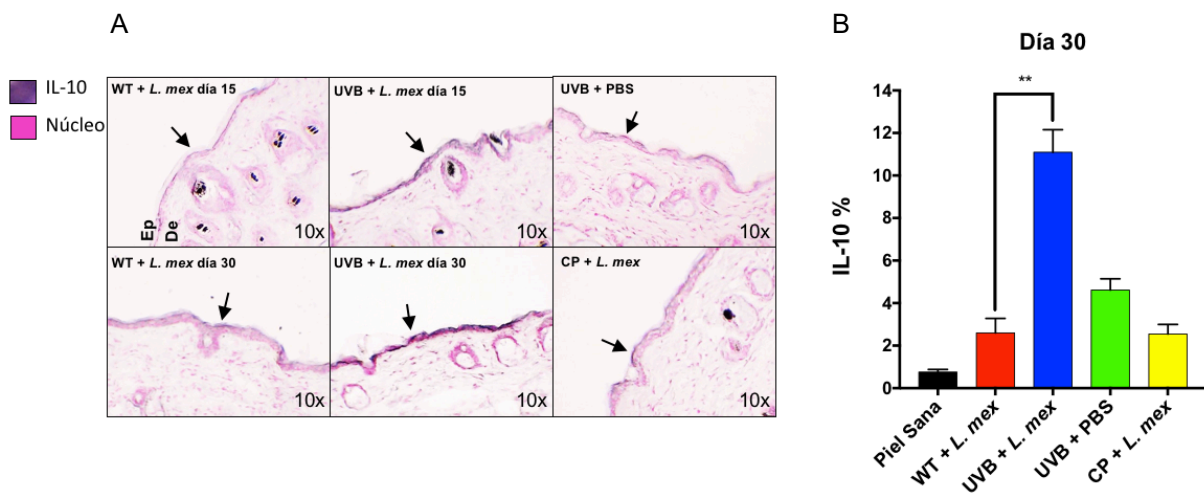
**Figura 30. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IL10 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 15 de infección. (A) Tejido IL-10+ de grupo WT + *L. mex*. (B) Tejido IL-10+ de grupo UVB + *L. mex*. (C) Porcentaje de IL-10 determinado por análisis de pixeles de 3 micrografías representativas de cada grupo en el sitio de lesión. \* $P < 0.05$ .**

Posteriormente se continuó con el análisis inmunohistoquímico de IL-10 en las lesiones de 30 días de evolución. La diferencia observada en las lesiones de 15 días de evolución entre los grupos se mantuvo, se cuantificó una mayor cantidad de células IL-10+ en la epidermis de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* (Figura 31).



**Figura 31. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IL10 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 30 de infección. IHQ representativa de grupo UVB + *L. mex*. (A) Control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC). Células IL-10 positivas (flechas). (B) Número de células IL-10+ en 10 campos microscópicos a 40x. \*\* $P < 0.01$ .**

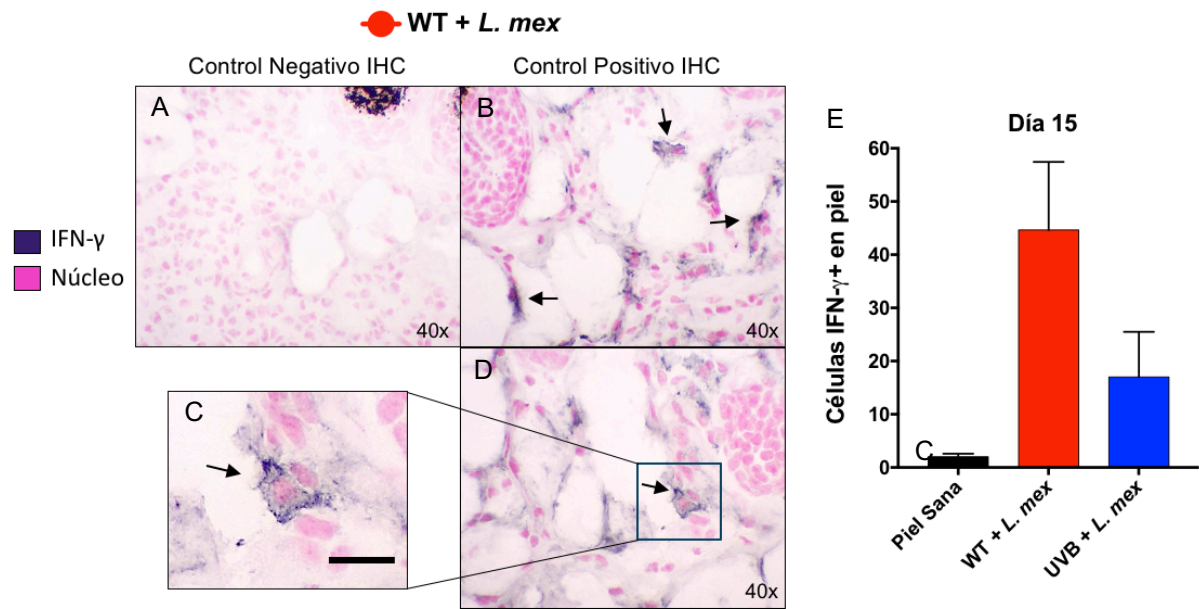
También se observó y cuantificó una mayor cantidad de IL-10 en el tejido de la lesión de los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex*), en las lesiones de 30 días de evolución, en comparación con las lesiones de ratones de los demás grupos tras realizado el análisis de pixeles (**Figura 32**).



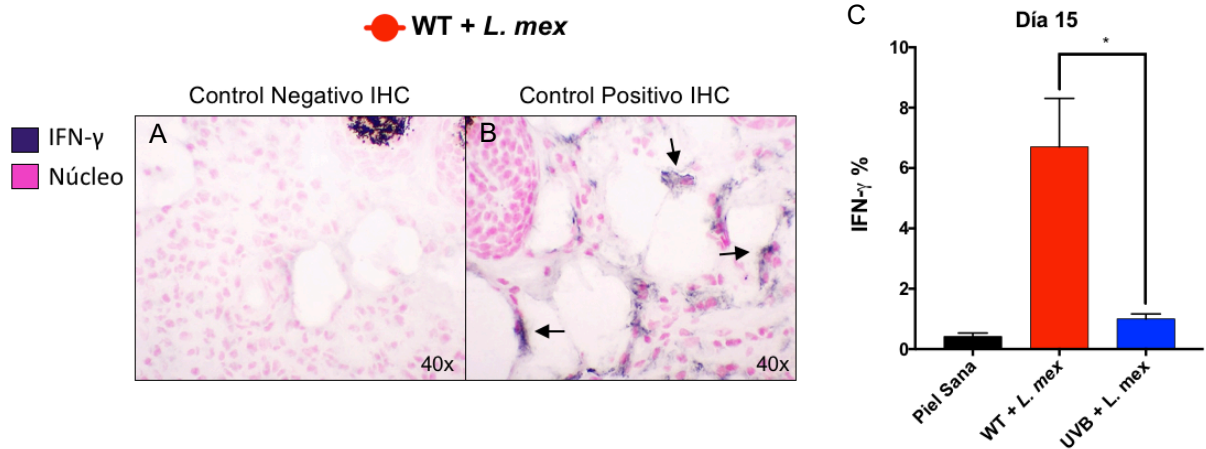
**Figura 32. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IL10 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 30 de infección. (A) Micrografías representativas IL-10+ de cada grupo. Células IL-10+ (flechas). (B) Porcentaje de IL-10 determinado por análisis de pixeles de 3 micrografías representativas de cada grupo en el sitio de lesión.**

Posteriormente se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IFN- $\gamma$  como anticuerpo primario. Tras el análisis se cuantificó una menor cantidad de células IFN- $\gamma$ + en la lesión de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* en las lesiones de 15 días de evolución (**Figura 33**). Al finalizar el análisis cuantitativo de células IFN- $\gamma$ + en la lesión, se realizó la cuantificación de IFN- $\gamma$  en la lesión por análisis de pixeles. Se cuantificó una menor cantidad de IFN- $\gamma$  en el tejido de la lesión de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* en las lesiones de 15 días de evolución (**Figura 34**).



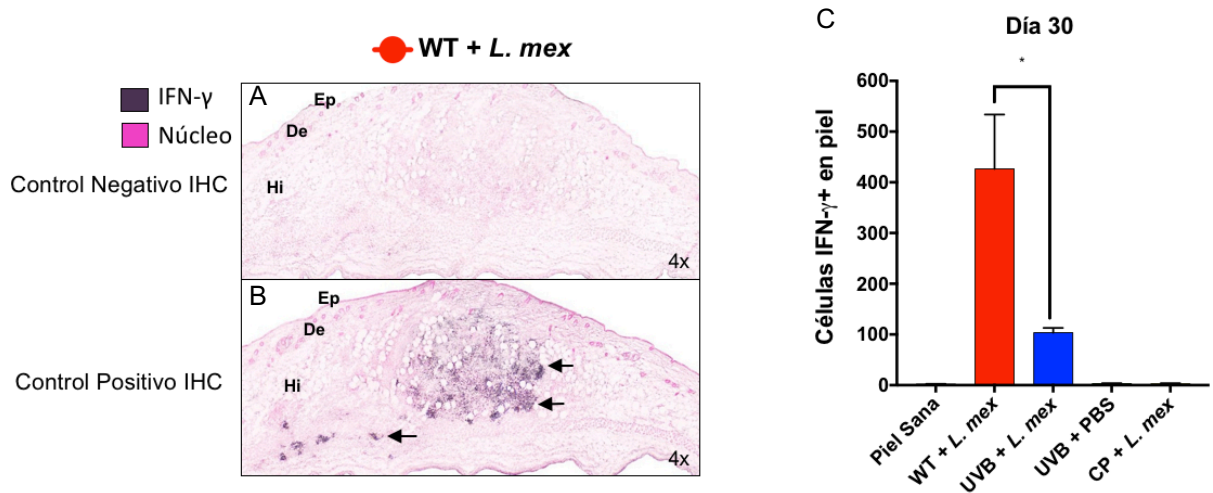


**Figura 33. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IFN- $\gamma$  como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 15 de infección. IHQ representativa de grupo WT + *L. mex*. (A y B) Control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC) al control negativo no se le agrega anticuerpo primario anti-IFN- $\gamma$ . (C y D) Célula IFN- $\gamma$  positiva (flecha). (E) Número de células IFN- $\gamma$ + en 10 campos microscópicos a 40x. Barra de referencia: 15 $\mu$ m.**



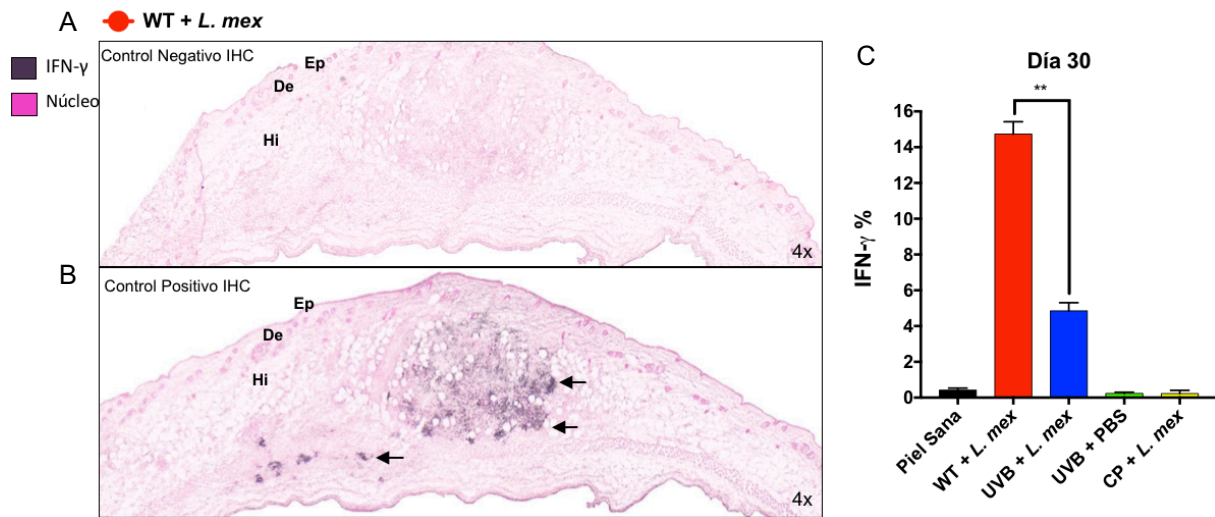
**Figura 34. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IFN- $\gamma$  como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 15 de infección. (A) Tejido IFN- $\gamma$ + de grupo WT + *L. mex*, control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC) al control negativo no se le agrega anticuerpo primario anti-IFN- $\gamma$ . (B) Porcentaje de IFN- $\gamma$  determinado por análisis de pixeles de 3 micrografías representativas de cada grupo en el sitio de lesión. \* $P < 0.05$ .**

Posteriormente se continuó con el análisis inmunohistoquímico de IFN- $\gamma$  en las lesiones de 30 días de evolución. La diferencia observada en las lesiones de 15 días de evolución entre los grupos se mantuvo, se cuantificó una menor cantidad de células IFN- $\gamma$ + en la lesión de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex*, algo inmunológicamente desfavorable para la resolución de la infección en los ratones inmunosuprimidos e infectados (Figura 35).



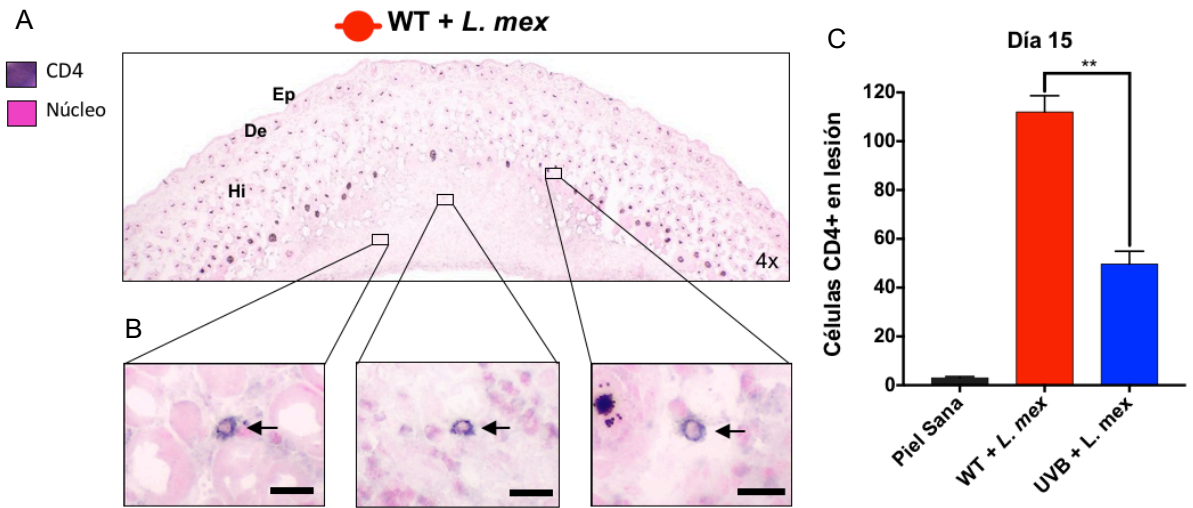
**Figura 35. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IFN- $\gamma$  como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 30 de infección. IHQ representativa de grupo WT + *L. mex*. (A y B) Control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC) al control negativo no se le agrega anticuerpo primario anti-IFN- $\gamma$ . Inmunomarcaje en células IFN- $\gamma$  positivas (flechas). (C) Número de células IFN- $\gamma$ + en 10 campos microscópicos a 40x. \* $P < 0.05$ .**

También se observó y cuantificó una menor cantidad de inmunomarcaje IFN- $\gamma$ + en el tejido de la lesión de los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex*), en las lesiones de 30 días de evolución, en comparación con las lesiones de ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*) tras realizado el análisis de píxeles (Figura 36). Se observa una importante presencia de IFN- $\gamma$ + en las lesiones de los ratones WT + *L. mex* a los 30 días de infección. Algo que resulta inmunológicamente favorable para la eliminación del agente infeccioso (Figura 36 B).

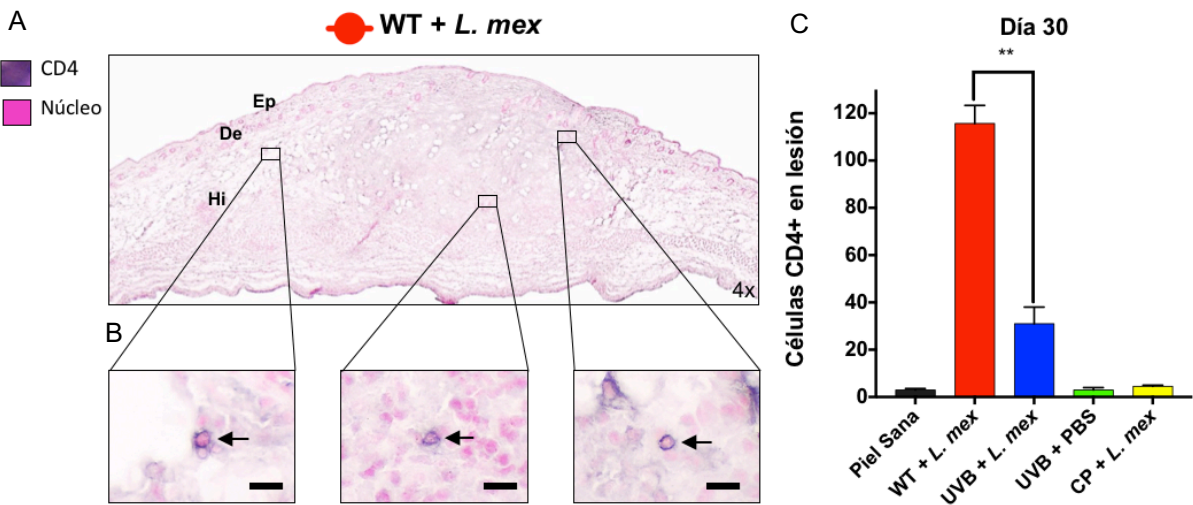


**Figura 36. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IFN- $\gamma$  como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 30 de infección. (A y B) Tejido IFN- $\gamma$ + de grupo WT + *L. mex*, control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC) al control negativo no se le agrega anticuerpo primario anti-IFN- $\gamma$ . (B) Porcentaje de IFN- $\gamma$  determinado por análisis de píxeles de 3 micrografías representativas de cada grupo en el sitio de lesión. \*\* $P < 0.01$ .**

Más adelante, se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD4+ como anticuerpo primario en las lesiones de 15 y 30 días de evolución. Tras el análisis se cuantificó una menor cantidad de células CD4+ en las lesiones de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* a los 15 días de evolución (**Figura 37**). También se observó y cuantificó una menor cantidad de células CD4+ en las lesiones de los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex*) en comparación con los ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*), en las lesiones de 30 días de evolución (**Figura 38**). La trascendencia de la presencia de linfocitos T cooperadores CD4+ en las lesiones por *L. mexicana* depende del subtipo al que pertenezcan. Los linfocitos T CD4+ Th1 se han asociado a la resolución de la infección. Linfocitos T CD4+ Th2 y T reguladores se han asociado al establecimiento y cronicidad de la misma.

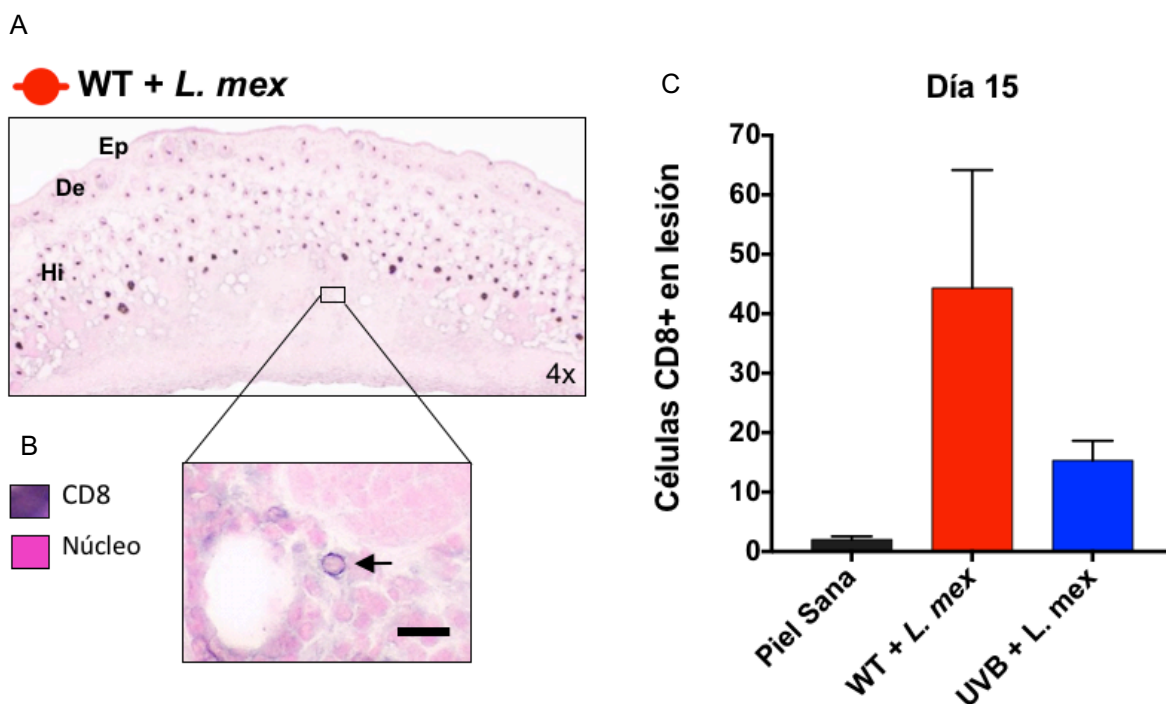


**Figura 37. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD4 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 15 de infección. (A) Inmunohistoquímica representativa de grupo WT + *L. mex*. (B) Linfocitos T CD4+ inmunomarcados. Se observa el inmunomarcaje en los antígenos de superficie de las células (flechas). (C) Número de células CD4+ en 10 campos microscópicos a 40x. \*\* $P < 0.01$ . Barra de referencia: 15 $\mu$ m.**



**Figura 38. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD4 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 30 de infección. (A) Inmunohistoquímica representativa de grupo WT + *L. mex*. (B) Linfocitos T CD4+ inmunomarcados. Se observa el inmunomarcaje en los antígenos de superficie de las células (flechas). (C) Número de células CD4+ en 10 campos microscópicos a 40x. \*\* $P < 0.01$ . Barra de referencia: 15 $\mu$ m.**

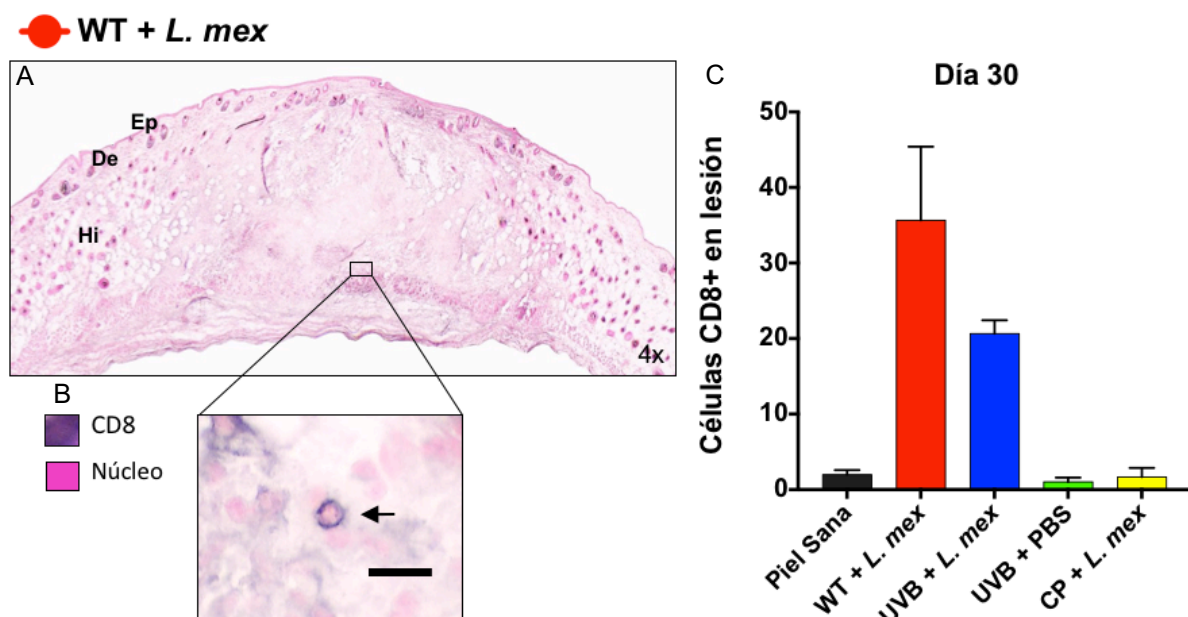
Más adelante se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD8+ como anticuerpo primario en las lesiones de 15 y 30 días de evolución. Tras el análisis del tejido lesional de 15 días de evolución, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de células CD8+ entre los dos grupos. Se presentó una tendencia hacia una mayor cantidad de células CD8+ en las lesiones de los ratones WT + *L. mex* en comparación con los ratones UVB + *L. mex*, pero sin significancia estadística (**Figura 39**).



**Figura 39.** Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD8 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 15 de infección. (A) Inmunohistoquímica representativa de grupo WT + *L. mex*. (B) Linfocito T CD8+ inmunomarcado. Se observa el inmunomarcaje en los antígenos de superficie de la célula (flecha). (C) Número de células CD8+ en 10 campos microscópicos a 40x. Barra de referencia: 15µm.

La tendencia persiste a los 30 días de evolución, en donde se cuantificó una mayor cantidad de células CD8+ en las lesiones de los ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*) en comparación con los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex*). Sin embargo, tras el análisis estadístico no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los

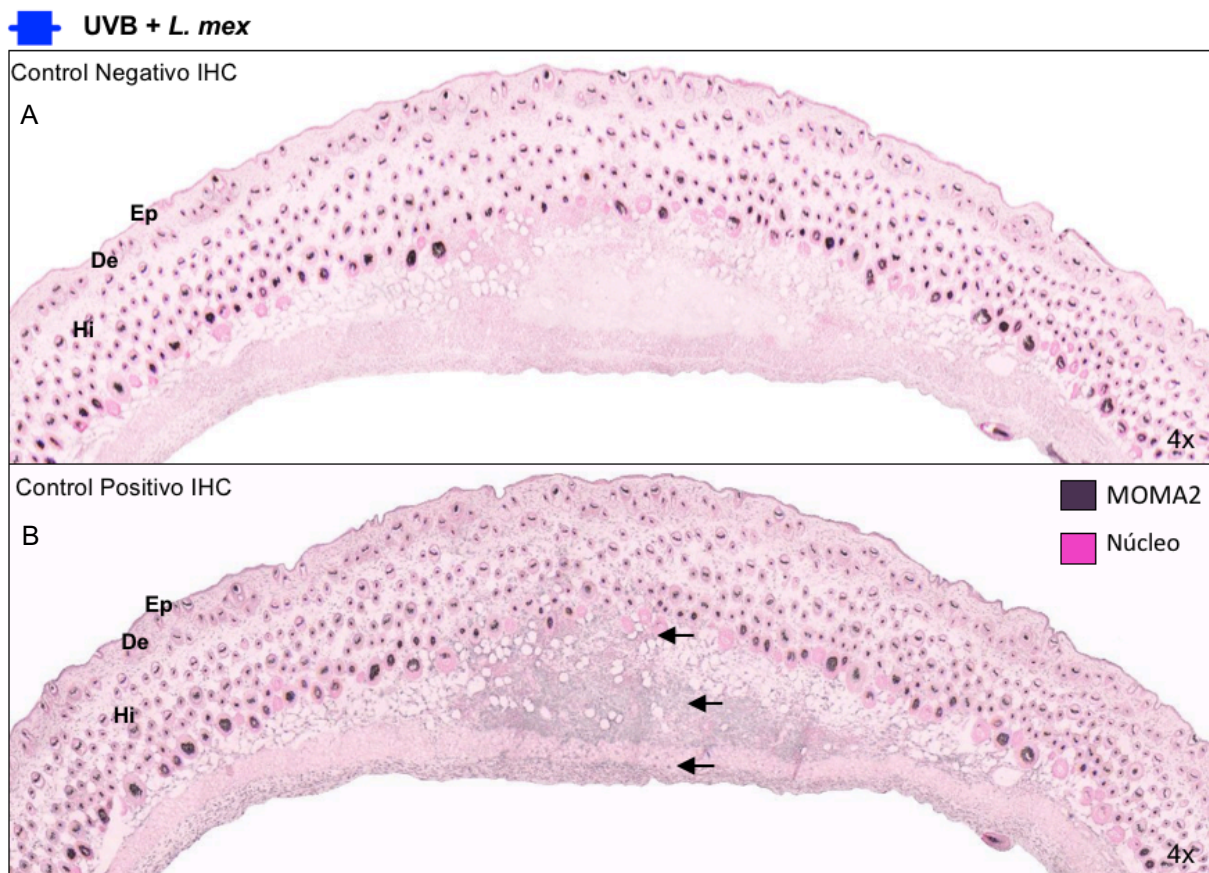
grupos en las lesiones de 30 días de evolución (**Figura 40**). Hasta la fecha, la trascendencia de la presencia de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> en las lesiones por *Leishmania mexicana* es incierta, no se ha asociado con la resolución o el establecimiento de la infección.



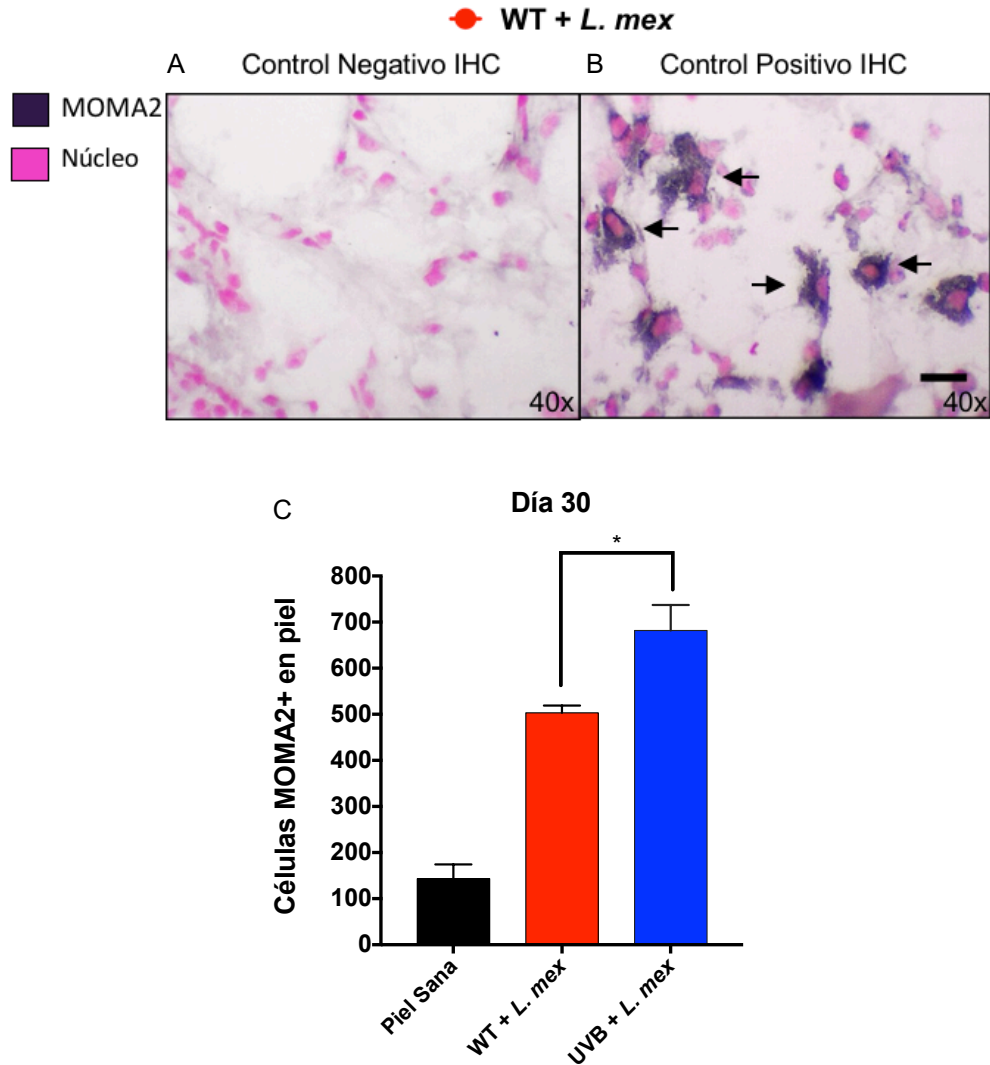
**Figura 40. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD8 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 30 de infección. (A) Inmunohistoquímica representativa de grupo WT + *L. mex*. (B) Linfocito T CD8<sup>+</sup> inmunomarcado. Se observa el inmunomarcaje en los antígenos de superficie de la célula (flecha). (C) Número de células CD8<sup>+</sup> en 10 campos microscópicos a 40x. Barra de referencia: 15µm.**

Por último, se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-MOMA2<sup>+</sup> (un antígeno intracelular presente en los monocitos circulantes y macrófagos tisulares) como anticuerpo primario en las lesiones de 15 y 30 días de evolución. Tras el análisis no se observó una diferencia en la cantidad ni distribución de macrófagos tisulares en las lesiones de los ratones a los 15 días de evolución. En ambos grupos resultó evidente que los macrófagos son las células predominantes en el sitio de la lesión (**Figura 41**). De igual forma se realizó el análisis cuantitativo y de distribución de macrófagos en las lesiones de 30 días de evolución de ambos

grupos. Se cuantificó una mayor cantidad de células MOMA2+ en las lesiones de los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex*) en comparación con los ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*), en las lesiones de 30 días de evolución (**Figura 42**). La trascendencia de la presencia de macrófagos en las lesiones por *Leishmania mexicana* depende del ambiente de citocinas en el que se encuentren. En un ambiente donde predomina IFN- $\gamma$  se han asociado a la resolución de la infección. En un ambiente donde predomina IL-10 se han asociado al establecimiento y cronicidad de la misma.



**Figura 41. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-MOMA2 como anticuerpo primario en piel de ratón inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 15 de infección.** Inmunohistoquímica representativa de grupo UVB + *L. mex*. (A y B) Control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC) al control negativo no se le agrega anticuerpo primario anti-MOMA2.



**Figura 42. Análisis inmunohistoquímico utilizando anti-MOMA2 como anticuerpo primario en piel de ratón C57BL/6 sano, infectado con *L. mexicana* (WT + *L. mex*) e inmunosuprimido con UVB e infectado (UVB + *L. mex*); Día 30 de infección.** Inmunohistoquímica representativa de grupo WT + *L. mex*. (A y B) Control negativo y positivo de inmunohistoquímica (IHC) al control negativo no se le agrega anticuerpo primario anti-MOMA2. Macrófagos inmunomarcados (flechas). (C) Número de células MOMA2+ en 10 campos microscópicos a 40x. Barra de referencia: 15µm.



## 9. Discusión

### 9.1 Cultivo del parásito, fases de diferenciación y curva de crecimiento

Antes de establecer un modelo de infección, es necesario entender las condiciones biológicas naturales en las que ésta sucede y conocer los elementos que participan y son necesarios para que se lleve a cabo. En un escenario silvestre, la mosca de la arena se infecta del parásito *Leishmania mexicana* cuando ésta se alimenta/succiona sangre de un mamífero infectado con el parásito. Durante las primeras 12-18 horas tras la llegada del parásito al tracto gastrointestinal del vector, comienza la diferenciación de su forma de amastigote a promastigote. Los promastigotes inicialmente transformados se denominan procíclicos y permanecen cortos, ovoides y con una movilidad muy limitada. La primera etapa de multiplicación de esta forma comienza aproximadamente a las 18-24 horas. Durante las siguientes 36-60 horas la multiplicación rápida continúa, acompañada por la transformación de los promastigotes a una forma alargada, delgada y móvil denominada nectomonada. Siete días más adelante la migración de los promastigotes al tracto digestivo superior y a la válvula estomodal continúa hasta que se logra una acumulación masiva de parásitos detrás de la válvula. Durante esta migración sucede otra etapa de diferenciación del parásito de la forma de nectomonada a la forma de haptomonada, con una tasa muy baja de división y en promastigotes metacíclicos, que son formas cortas, delgadas y altamente activas con un flagelo al menos el doble de la longitud del cuerpo celular y que nunca se ven en división. Algunos parásitos, principalmente los promastigotes metacíclicos, migran más allá de la válvula estomodal hacia el esófago, la faringe y la probóscide y son depositados por el vector en la piel del siguiente hospedero cuando vuelve a alimentarse <sup>105</sup>. Esto toma relevancia debido a que está extensamente demostrado que ésta

forma del parásito (promastigote metacíclico) predomina en el inóculo y es necesario que la mayor parte de los parásitos inoculados se encuentren en este estado de diferenciación morfológica para generar una infección <sup>106</sup>. Algo que se debe de tomar en cuenta si alguien desea infectar ratones en un laboratorio de una forma reproducible y efectiva.

Para poder replicar las condiciones silvestres en el laboratorio, fue necesario identificar el día en el cultivo en el que el parásito se encontrara en la forma de diferenciación infectiva, es decir, de promastigote metacíclico no divisorio. Para esto realizamos una curva de crecimiento del parásito para conocer su comportamiento en el cultivo e identificar las fases de crecimiento y de diferenciación. Identificamos las 4 fases de crecimiento: fase de latencia del día 1 al 3, fase exponencial días 3 a 5, fase estacionaria del día 5 al día 10 y fase de declive o muerte celular del día 10 al día 12 (**Figura 1**). El comportamiento del parásito en el cultivo resultó similar al previamente reportado en las especies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania infantum*, presentando un crecimiento constante durante los primeros 5 días, y entrando en la fase estacionaria a partir del 5to día de cultivo <sup>107, 108</sup>. Este comportamiento en el cultivo también había sido reportado en un análisis de eventos morfométricos y del ciclo celular de la especie *Leishmania mexicana* (cepa MNYC/BZ/62/M379) <sup>109</sup>. El resultado de la curva de crecimiento y la comparación de los datos obtenidos de la literatura universal nos permitió identificar que la fase estacionaria (del día 5 al día 10 del cultivo) representa la fase en la que la mayor parte de los parásitos en el cultivo se encuentran en la forma de promastigote metacíclico no divisorio, la forma infectiva del parásito. Este resultado sirvió como base para decidir los días del cultivo en los que se iban a tomar parásitos para realizar los primeros ensayos de infección y más adelante establecer el modelo de infección.

## 9.2 Modelo de infección

Durante décadas se han utilizado modelos murinos para el estudio experimental de la infección por *Leishmania spp.* La mayoría de ellos se han establecido inoculando parásitos en el cojinete plantar de ratones. Se ha descrito que las cepas C57BL/6, CBA/J, C3H y BIOD2 resisten la infección y resuelven en pocos meses <sup>110</sup>. Por otro lado, BALB/c y todas las cepas inmunodeficientes de células T manifiestan una infección visceral sistémica que conduce a la muerte <sup>111</sup>. La resistencia y la susceptibilidad están estrechamente relacionadas con el desarrollo de respuestas de células T de tipo Th1 o Th2, respectivamente lo cual ha hecho que este modelo de infección sea popular entre los inmunólogos de todo el mundo para estudiar la dicotomía Th1-Th2 <sup>112</sup>. La infección de ratones singénicos con *Leishmania major* proporciona el mejor modelo para la inmunorregulación que se produce durante una respuesta mediada por células a un patógeno intracelular. En ratones BALB/c susceptibles, la infección cutánea por *L. major* provoca una enfermedad progresiva con diseminación visceral que se asocia con la presencia de células de tipo Th2 específicas del parásito en los ganglios linfáticos regionales, es decir, células T efectoras CD4+ que liberan IL-4 después de la estimulación. A la inversa, las cepas CBA, C3H o C57BL/6 controlan fácilmente la infección y desarrollan una respuesta robusta asociada con la aparición de células de tipo Th1, es decir, células T efectoras CD4+ que liberan IFN- $\gamma$ , pero no IL-4, y son necesarias para la activación de la inmunidad dependiente de fagocitos <sup>113</sup>. <sup>114</sup>. Hasta la fecha, se han descrito decenas de modelos de infección por *Leishmania spp.* y se ha observado que la enfermedad evoluciona de manera distinta dependiendo de la especie de *Leishmania spp.* en cuestión, la vía de inoculación de los parásitos, la cantidad de parásitos inoculados, el estado de diferenciación morfológica del parásito en el momento de la infección y la cepa del ratón elegido como modelo <sup>115</sup>. Debido al objetivo de nuestro trabajo (evaluar la

respuesta inmune local en la piel de ratones radiados con UVB) buscamos establecer la infección en la piel de la región dorsal de los ratones. Teniendo como antecedente importante y tomando como base los resultados observados en la curva de crecimiento (**Figura 1**), se tomaron parásitos en los días 5, 7, 9 y 11 de cultivo y fueron inoculados a la misma dosis ( $1 \times 10^7$ ) por vía intradérmica en la región dorsal del tronco de ratones C57BL/6 hembra de 6-10 semanas de edad. Se dio seguimiento de las lesiones durante 30 días y observamos que los ratones inoculados con parásitos en el noveno día de cultivo presentaron el crecimiento más uniforme y el mayor tamaño de lesión (**Figuras 2-7**). Previamente había sido reportado en estudios *in vivo* e *in vitro* que en el noveno día de cultivo del parásito *Leishmania mexicana* es cuando se encuentra el mayor porcentaje de promastigotes metacíclicos no divisorios, la forma infectiva<sup>37</sup>. Posteriormente se infectaron ratones con diferentes dosis de parásitos ( $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$ ) todos tomados el día 9 de cultivo, se les dio seguimiento durante 30 días y observamos que los ratones inoculados con  $1 \times 10^6$  de promastigotes metacíclicos presentaban el crecimiento más uniforme y el mayor tamaño de lesión en comparación con los otros grupos. Con respecto a la dosis inoculada, un estudio reportó que en ratones BALB/c susceptibles, no se observó ningún signo clínico (aumento en el tamaño del cojinete plantar infectado) después de la inoculación subcutánea de dosis bajas de parásitos ( $10^2$  a  $10^3$  parásitos). A la inversa, la inoculación de dosis altas ( $10^5$  a  $10^7$  parásitos) condujo a un aumento significativo del cojinete plantar<sup>116</sup>. Este efecto dosis-dependiente había sido reportado previamente<sup>117</sup>. En otros trabajos se había reportado que en ratones C57BL/6, independientemente de la dosis ( $10^2$  a  $10^7$ ), las lesiones mostraron una tendencia a la resolución y esto se asoció con la inducción de una respuesta inmune Th1 (analizada para las dosis de  $10^2$  y  $10^6$ )<sup>118</sup>. Sin embargo, en otro estudio, la respuesta clínica clásica (curación de la lesión y respuesta inmune Th1) se observó solo cuando los ratones C57BL/6 se inocularon con una dosis alta de parásitos ( $10^6$ )<sup>119</sup>. En los

ensayos de infección realizados por nuestro grupo de trabajo, demostramos experimentalmente algunos de los fenómenos previamente reportados; la trascendencia del día del cultivo en el que el parásito es inoculado, un reflejo de su estado diferencial, y la evolución de la lesión temprana dosis-dependiente al inocular distintas dosis y observar diferencias en el desarrollo de la lesión. En resumen, nuestros resultados y la literatura consultada demuestran que la dosis inoculada, el estado diferencial del parásito, la vía de inoculación, la especie de *Leishmania spp* en cuestión y las bases genéticas del ratón influyen en la respuesta inmune del hospedero y, por lo tanto, en el desarrollo de la enfermedad. Experimentalmente establecimos que para lograr una infección cutánea clásica en la región dorsal del tronco de ratones hembra de la cepa C57BL/6 por el parásito *Leishmania mexicana*, altamente reproducible, había que infectar ratones en esa región por vía intradérmica con  $1 \times 10^6$  de promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* en un volumen de 20 $\mu$ L de agua inyectable estéril, el día 9 de cultivo del parásito (fase estacionaria, mayor porcentaje del cultivo en estado de diferenciación de promastigote metacíclico no divisorio). Sin embargo, se recomienda que todo aquél que desee replicar este modelo de infección, realice ensayos preliminares para determinar el día de mayor infectividad de los parásitos y ajuste la dosis dependiendo del objetivo específico de su trabajo.

### **9.3 Establecimiento de las condiciones necesarias para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía (DTH) y supresión tras exposición a luz UVB**

La reacción de hipersensibilidad tardía ha sido, y sigue siendo, un sistema de ensayo ampliamente utilizado para medir la función inmune *in vivo*. Aunque poco sofisticado para los estándares actuales, este ensayo tiene grandes ventajas porque presenta un sistema modelo rápido, económico y confiable para ayudar a establecer ensayos de supresión inmunitaria

inducida por UV y a analizar los mecanismos involucrados <sup>120</sup>. Para establecer un ensayo estandarizado de inducción de reacción de hipersensibilidad tardía se deben de estandarizar los siguientes parámetros: el antígeno que será utilizado y el método de obtención del antígeno dado el caso, la dosis de antígenos para la sensibilización, la dosis de antígenos para el reto, la vía por la cual serán inyectados los antígenos, el volumen del vehículo, los tiempos entre sensibilización, reto y medición final y los parámetros de medición a evaluar para determinar si la inducción de DTH es positiva o negativa.

En nuestro caso, se utilizaron antígenos particulados del parásito *Leishmania mexicana*, estos fueron obtenidos a partir de un cultivo de parásitos vivos que fue lavado y transferido a solución salina estéril, posteriormente congelado a -80°C y descongelado a temperatura ambiente, repitiendo este proceso 3 veces. La elección del antígeno a utilizar para la inducción de una DTH depende de su disponibilidad y del objetivo del trabajo en cuestión. En un trabajo metodológico de referencia de supresión de DTH por exposición a UVR publicado en el 2002, se utilizaron antígenos derivados de *Cándida albicans* fijados en formaldehído <sup>120</sup>. En otro trabajo donde se exploró la posibilidad de una aceleración del desarrollo de leishmaniosis cutánea progresiva en ratones previamente sensibilizados para *Leishmania major*, se utilizaron parásitos de la especie *Leishmania major* fijados en formaldehído <sup>121</sup>. Y en otros ensayos se ha reportado el uso de ovoalbúmina <sup>122</sup>, 1-Cloro-2,4-Di-Nitrobenceno (DNCB) <sup>123</sup>, 2-4-Di-Nitrofluorobenceno (DNFB) en ensayos de inducción y supresión de hipersensibilidad por contacto (CHS) por exposición a UVR <sup>124, 125</sup>, unidades formadoras de placa del virus del herpes simple, entre otros antígenos virales, fúngicos y parasitarios <sup>126</sup>. Una vez obtenido el antígeno, se determinaron las vías de sensibilización y de reto. Como vía de sensibilización, se utilizó la vía subcutánea de cada flanco de los ratones y se determinó la dosis de sensibilización

inoculando  $1 \times 10^7$  de antígenos particulados del parásito *Leishmania mexicana* en un volumen de  $100\mu\text{L}$ ,  $50\mu\text{L}$  en cada flanco. La vía subcutánea e intradérmica son las vías más frecuentemente utilizadas para inducir sensibilización en ensayos de DTH <sup>120-122</sup>. Por otro lado, la aplicación directa del antígeno en una formulación tópica sobre la piel rasurada del ratón es la vía utilizada en ensayos de CHS <sup>124, 125</sup>. En otros ensayos de inducción de DTH utilizando antígenos particulados derivados del parásito *Leishmania major*, se reportaron diversas dosis inductoras de sensibilización, desde  $1 \times 10^5$  hasta  $2 \times 10^7$  de parásitos fijados en formaldehído por vía intradérmica <sup>121</sup>. En el trabajo metodológico de referencia de supresión de DTH por exposición a UVR mencionado previamente, se utilizó una dosis de sensibilización similar a la estandarizada por nuestro equipo de trabajo de  $1 \times 10^7$  antígenos derivados de *Cándida albicans* fijados en formaldehído <sup>120</sup>. En otro trabajo referenciado anteriormente, se estableció como dosis de sensibilización la inoculación de  $100\ \mu\text{g}$  de ovoalbúmina por vía subcutánea en cada flanco de los ratones <sup>122</sup>. En otro reporte se realizó la sensibilización inoculando  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de placa del virus del herpes simple por vía subcutánea en el cuello de los ratones <sup>126</sup>. Y en el caso de ensayos de CHS mediante la administración tópica directa del antígeno en la piel rasurada del ratón, se han reportado dosis de  $0.5\ \text{mg}$  de DNCB o  $25\ \mu\text{L}$  de DNFB al 0.5% aplicación directa <sup>124, 125</sup>. Como se mencionó anteriormente, y aquí repasado, es evidente que dependiendo del antígeno utilizado y del objetivo del trabajo en cuestión, la estandarización de las condiciones de inducción de sensibilización pueden variar significativamente entre ensayos. En nuestro ensayo, se determinó que el reto antigénico se realizara 7 días después de la sensibilización, administrando la dosis de antígenos por vía intradérmica en la oreja derecha de los ratones. Como control se utilizó la oreja contralateral en donde se inoculó agua inyectable estéril. La medición del grosor de ambas orejas se realizó 48 horas más tarde. Ensayos

estandarizados publicados en la literatura universal, nos demuestran la flexibilidad a la hora de determinar las condiciones del reto que este ensayo le permite al investigador. En nuestro caso, establecimos el tiempo de espera entre la sensibilización y el reto en 7 días, una condición similar a las previamente reportadas <sup>122</sup>. Otros ensayos estandarizados, reportan que la inducción del reto se puede realizar 5, 6 o hasta 10 días después de la sensibilización y observar una induración reflejo de una reacción de hipersensibilidad tardía de manera reproducible y confiable <sup>120, 123, 126</sup>. Incluso en un ensayo donde se utilizan antígenos a partir de *Leishmania major* se demostró positividad al realizar el reto tan temprano como 3 días después de la sensibilización, aunque al final hayan estandarizado y recomienden 6 días de espera <sup>121</sup>. Al igual que en la sensibilización, los sitios más utilizados para realizar el reto antigénico son el cojinete plantar y la oreja de los ratones. En nuestros ensayos preliminares, se experimentó con 3 dosis distintas de antígenos para el reto antigénico:  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$ . En los tres ensayos observamos un aumento estadísticamente significativo en el grosor de las orejas retadas en comparación con las orejas control. Dosis similares de antígenos para establecer el reto (desde  $1 \times 10^6$  hasta  $1 \times 10^7$  de parásitos de la especie *Leishmania major* fijados en formaldehído) habían sido previamente reportadas como dosis de reto efectivas en ensayos de DTH establecidos <sup>121</sup>. En otro trabajo modelo, utilizaron *Candida albicans* fijada en formaldehído como antígeno de reto a una dosis de  $5 \times 10^6$  de antígenos particulados del microorganismo, observando positividad en la reacción de hipersensibilidad tardía <sup>120</sup>. Al igual que en las variables ya repasadas, existen diferencias entre los ensayos reportados en cuanto al tiempo de espera posterior al reto para realizar la medición de la oreja o cojinete plantar retado. En nuestro caso esperamos 48 horas posterior al reto para realizar las mediciones. Otros trabajos reportan realizar una sola medición del grosor a las 18-24 horas <sup>120</sup>. Por otro lado, se han reportado esquemas de múltiples mediciones, midiendo cada 24 horas durante 3 días <sup>122</sup>, cada 24 horas



durante 4 días <sup>123</sup> o cada 3 horas durante 48 horas <sup>121</sup> posterior al reto. En nuestro ensayo de DTH utilizamos la oreja contralateral de los ratones inoculada por vía intradérmica con agua inyectable estéril como control. Si bien esta no es una práctica incorrecta, no es recomendado debido a que el agua inyectable estéril no imita adecuadamente el efecto irritante que causa la inyección del antígeno <sup>120</sup>. Otros ensayos reportan utilizar como control orejas de ratones sanos no sensibilizados y únicamente retados con la misma dosis de antígeno <sup>120, 121</sup>. Al finalizar el ensayo, la respuesta inflamatoria de fondo de la oreja control se mide y se le resta al grosor de la oreja del control positivo, es decir, del ratón sensibilizado y retado. Con los resultados obtenidos y la literatura consultada se establecieron las condiciones para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía, al sensibilizar con  $1 \times 10^7$  antígenos particulados de *Leishmania mexicana* en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  inyectando 50  $\mu\text{L}$  en cada flanco por vía subcutánea de cada ratón y 7 días más tarde retar con  $3 \times 10^6$  de antígenos del parásito en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  inyectados por vía intradérmica en la oreja derecha. Se utiliza como control la oreja izquierda en la cual se inyectan 20  $\mu\text{L}$  de agua inyectable estéril y 48 horas más adelante, se realiza la medición del grosor de ambas orejas.

La inmunosupresión inducida por UVB es un fenómeno ampliamente conocido y mundialmente utilizado en experimentación animal. Una vez establecidas las condiciones para inducir una reacción de hipersensibilidad tardía, nos dimos a la tarea de estandarizar un protocolo, con todas sus implicaciones, de inmunosupresión inducida por UVB. Para establecer un ensayo estandarizado de inmunosupresión inducida por UVB se deben de estandarizar los siguientes parámetros: la cantidad mínima de ratones por grupo a utilizar, la fuente de radiación ultravioleta, el espectro y la intensidad de emisión de la lámpara, el tratamiento de los ratones antes y durante la exposición a UV, el tiempo y la distancia de exposición, la dosis

inmunosupresora, el tiempo entre la exposición a UVR y la sensibilización de los ratones (para esto se debe tener estandarizado el protocolo de inducción de DTH) y los controles que serán utilizados para poder validar los datos. En nuestro ensayo utilizamos grupos de 5 ratones cada grupo como mínimo, siguiendo la recomendación internacional de utilizar de 5-10 ratones <sup>120</sup>. Como fuente de radiación ultravioleta se utilizaron dos lámparas solares Philips UVL FS-40T12 con un espectro e intensidad de emisión de 0.5% UVC (200-280 nm), 60% UVB (280-320 nm), 40% UVA (320-400 nm). Esta fuente de UV es ampliamente utilizada por la comunidad internacional, aunque lo comúnmente reportado son bancos de 6 lámparas <sup>120</sup>. Los ratones fueron rasurados y depilados inmediatamente antes de ser expuestos a UVR. Aunque no existe un consenso general, autores reportan rasurar y depilar a los ratones el mismo día <sup>120</sup>, 1 día antes <sup>122</sup>, o hasta 2 días antes <sup>125</sup> de la exposición a UVR. Es importante tener cuidado al rasurar y depilar para no ocasionar quemaduras ni heridas y dar exactamente el mismo tratamiento a todos los ratones incluidos los controles no expuestos a UV. Durante la exposición es importante cubrir las orejas y la cabeza de los ratones. En nuestro caso utilizamos papel cartón grueso para cubrir la cabeza, las orejas y una franja de la piel de la región dorsal del tronco que es donde posteriormente se infectaría a los ratones. La idea de utilizar una franja de cartón para cubrir la región dorsal de los ratones irradiados surgió como una necesidad después de haber realizado ensayos preliminares en donde no se cubría la piel que iba a ser infectada o se cubría con un pequeño rectángulo de cartón y el día de la infección el engrosamiento y el daño por quemadura de la piel era tal que resultaba imposible realizar las infecciones. Otra razón por la que decidimos cubrir la región a infectar, fue que observamos que a los 15 días los ratones experimentaban descamación del espesor total del tejido cutáneo radiado e infectado. Otros autores reportan cubrir las orejas con papel aluminio <sup>123</sup>, cinta negra opaca <sup>124</sup> o metacrilato de metilo de color

negro <sup>122</sup>. La distancia de exposición es variable reportándose entre 20 a 40 cm de distancia entre la lámpara y el ratón irradiado.

La dosis de UVB depende del tiempo de exposición. En nuestro ensayo, se probaron distintos tiempos (dosis) de exposición. Inicialmente el problema radicó en que, para llegar a las dosis inmunosupresoras previamente reportadas en la literatura, el tiempo de exposición de los ratones a luz UV era tal, que el calor y la emisión de UVA de la lámpara generaba quemaduras graves en las áreas expuestas de los ratones y esto imposibilitaba poder continuar con el ensayo. Tras numerosos ensayos preliminares demostramos que la exposición a 62.5 mJ/cm<sup>2</sup> y 25mJ/cm<sup>2</sup> de UVB es suficiente para suprimir la reacción de hipersensibilidad tardía previamente estandarizada y no generar lesiones ni quemaduras que imposibiliten a los ratones de poder continuar con el ensayo. En otros ensayos se han reportado dosis de UVB inmunosupresoras consideradas “bajas dosis” que van desde 72mJ/cm<sup>2</sup> <sup>125</sup>, 180mJ/cm<sup>2</sup> <sup>124</sup>, y 300mJ/cm<sup>2</sup> <sup>123</sup> hasta dosis inmunosupresoras consideradas “altas dosis” como 10 kJ/m<sup>2</sup> <sup>120</sup>. El ensayo de exposición y el tiempo entre exposición a UV y la sensibilización (o en el caso de nuestro modelo, de la infección) también varía entre ensayos. En nuestro caso, se realizó la exposición a una dosis única de 25mJ/cm<sup>2</sup> y 4 días más tarde se realizó la sensibilización o la infección de los ratones. En la literatura se reportan diferencias en esta variable. En un ensayo donde se utilizó una sola exposición a 10 kJ/m<sup>2</sup> de UVB, se reportó una espera de 3-5 días entre la exposición y la sensibilización para la inducción de DTH <sup>120</sup>. En otro caso se utilizó un esquema de exposición de 150 mJ/cm<sup>2</sup> 1 vez al día durante 3 días seguidos y posteriormente la sensibilización para inducción de DTH <sup>122</sup>. En otro trabajo se reportó una sola exposición a 300 mJ/cm<sup>2</sup> y 10 días después se realizó la sensibilización para inducción de DTH <sup>123</sup>. Y en otros ensayos se realizaba la exposición a UVB y 2 días después <sup>125</sup> o 3 días después <sup>124, 126</sup> se realizaba la sensibilización o la infección de los ratones. Por último, es importante mencionar que los controles para estos

experimentos son cruciales. El control positivo consiste en el grosor de la oreja de un grupo de ratones sanos no irradiados que están sensibilizados y posteriormente son retados. El control negativo consiste en el grosor de la oreja de un grupo de ratones que son irradiados, no son sensibilizados, y son retados con agua inyectable estéril. Y los grupos experimentales, el grosor de la oreja de ratones que son irradiados, sensibilizados y retados. La respuesta de fondo del engrosamiento de las orejas de los controles negativos se resta de los valores obtenidos en el grupo de control positivo y de los grupos experimentales.

#### **9.4 Evaluación de la infección por *Leishmania mexicana* en ratones expuestos a diferentes dosis de radiación UVB; primer acercamiento.**

Se realizó un ensayo preliminar para evaluar la evolución de las lesiones de ratones expuestos a distintas dosis de radiación UV e infectados con *L. mexicana*. Para esto, se tomaron 3 grupos de ratones y se expusieron a dosis no inmunosupresoras; 6 mJ/cm<sup>2</sup>, 12 mJ/cm<sup>2</sup> y 18 mJ/cm<sup>2</sup> una dosis por grupo, y se incluyó un grupo expuesto a la dosis inmunosupresora de UVB 25mJ/cm<sup>2</sup>. Posteriormente se infectó a todos los ratones con amastigotes del parásito *Leishmania mexicana*. En 25 días de seguimiento se observó que las lesiones de todos los ratones expuestos a cualquier dosis de UV eran de mayor tamaño que las lesiones de los ratones no expuestos a UV e infectados. Sin embargo, tras realizado el análisis estadístico únicamente las lesiones de los ratones expuestos a la dosis inmunosupresora 25mJ/cm<sup>2</sup> presentaron significancia estadística en la diferencia del tamaño de la lesión en comparación con los ratones no expuestos a UV e infectados. Posteriormente se realizó la determinación de la carga parasitaria por análisis semicuantitativo *in situ* y se observó una mayor cantidad de parásitos en las lesiones de los ratones radiados con 25mJ/cm<sup>2</sup> e infectados en comparación con los ratones radiados con dosis

no inmunosupresoras y el grupo no radiado e infectado. Ciertamente este ensayo preliminar no es la primer evidencia publicada en donde se observe que un agente patógeno prolifere y la infección se exacerbe en un hospedero inmunosuprimido por UVB. En uno de los primeros trabajos publicados en este respecto, utilizaron el virus del herpes simple tipo 1 (HSV1)<sup>127</sup>. Los autores partieron de la observación de que seres humanos y animales de experimentación infectados con HSV1 continuaban albergando al virus en el sistema nervioso durante el resto de sus vidas y que aunque no mostraran datos de infección, el virus podía ser aislado a partir de la raíz dorsal del ganglio de los nervios asociados con el sitio de lesión recurrente a través del cultivo del ganglio completo *in vitro* <sup>128</sup>. Los autores se preguntaron si ante un estímulo inmunosupresor inducido tras la exposición a UVB era posible la recurrencia de la infección. Para responder esta pregunta, tomaron ratones blancos Swiss, los infectaron con HSV1 y de 4 a 14 semanas después de controlada la infección primaria, los ratones fueron expuestos a luz UV. Los resultados fueron alentadores, los ratones expuestos a UV presentaron recurrencia de la infección e incluso se aisló HSV1 del sitio irradiado <sup>127</sup>. Años más adelante el mismo grupo de trabajo publicó otro ensayo similar, utilizando HSV1 y aplicando otros estímulos inmunosupresores incluida la UV, nuevamente observando una recurrencia de la infección en los ratones inmunosuprimidos <sup>129</sup>. Continuando en el contexto de HSV1, otro grupo de trabajo estandarizó un modelo animal utilizando ratones C3H. Los autores expusieron a los ratones a una dosis preestablecida de UVB de 96mJ/cm<sup>2</sup> y 3 días más adelante los infectaron con HSV1. Hasta 7 semanas después de la infección primaria volvieron a exponer a los ratones a la dosis mencionada y el 80% presentó recurrencia de la infección <sup>130</sup>. En otro estudio más reciente se demostró que la inmunosupresión inducida por UVB provocó que un grupo de ratones de una cepa inmunocompetente se volviera altamente susceptible a la enfermedad causada por el virus del papiloma de ratón tipo 1 (MmuPV1). En este estudio se formaron 3 grupos de ratones de la

cepa FVB/NJ. El primer grupo no se expuso a UVB, el segundo grupo se expuso a 150 mJ/cm<sup>2</sup> de UVB y el tercer grupo a 300 mJ/cm<sup>2</sup>. Posteriormente se infectó a los ratones con el virus del papiloma de ratón tipo 1 y se les dio seguimiento. 3 meses después, el 0% de los ratones del grupo 1 (no inmunosuprimidos) y del grupo 2 (expuestos a 150 mJ/cm<sup>2</sup>) no presentaron el desarrollo de papilomas. Por otro lado, más del 55% de los ratones del grupo 3 (expuestos a 300mJ/cm<sup>2</sup>) habían desarrollado papilomatosis <sup>123</sup>. En aquél trabajo además de demostrar que la inmunosupresión inducida por UVB se relaciona directamente con el desarrollo de la enfermedad por MmuPV1, nosotros destacamos que al igual que en nuestro ensayo preliminar, la dosis específica de UVB a la que se expone a los ratones puede influir en el desarrollo de la lesión (Grupo 3, ratones expuestos a 300mJ/cm<sup>2</sup> en donde >55% desarrolló papilomatosis) o no tener un efecto significativo en la capacidad inmunológica del hospedero en el combate a la infección (Grupo 2, ratones expuestos a 150mJ/cm<sup>2</sup> en donde el 0% desarrolló papilomatosis). Al igual que ellos, en nuestro ensayo preliminar observamos diferencias en el tamaño de la lesión y la carga parasitaria presentada por los ratones expuestos a las dosis de 6 mJ/cm<sup>2</sup>, 12 mJ/cm<sup>2</sup> y 18 mJ/cm<sup>2</sup> de UVB en comparación con el tamaño de la lesión y la carga parasitaria de los ratones expuestos a 25mJ/cm<sup>2</sup> de UVB. Esta serie de resultados, trabajos referenciados y algunos otros que serán discutidos más adelante, representan evidencia experimental que soporta la hipótesis que la inmunosupresión inducida por luz UVB tiene un efecto en el sistema inmunológico lo suficientemente importante como para afectar directamente en la evolución y el desarrollo de una enfermedad infecciosa.

Con base en estos resultados y la evidente diferencia en el tamaño de lesión y la cantidad de parásitos *in situ* entre los grupos, como acercamiento preliminar realizamos un análisis de la presencia de células IL-10 positivas y porcentaje de IL-10 en la epidermis del tejido lesional y la evaluación de la presencia y distribución de macrófagos en la lesión de los diferentes grupos

por IHQ. Todos los ratones radiados presentaron una mayor cantidad de células IL-10+ en la epidermis y una mayor cantidad de IL-10 en el tejido de la lesión en comparación con los ratones no radiados e infectados, pero únicamente los ratones radiados con 25mJ/cm<sup>2</sup> presentaron diferencia estadísticamente significativa. La tendencia presentada por los ratones radiados con dosis no inmunosupresoras no es de menospreciarse. Esta tendencia es reflejo evidente de un fenómeno de producción y liberación de IL-10 dosis-dependiente inducido por la exposición a UVR, un fenómeno previamente reportado <sup>131</sup>. La técnica de IHQ realizada en todas las lesiones de los ratones de todos los grupos y la reconstrucción de las lesiones nos permitió mapear e identificar que los principales productores de esta citocina se encuentran en la epidermis del tejido lesional. Con base en lo observado y lo reportado en la literatura, las células observadas y responsables de esta producción muy seguramente sean queratinocitos <sup>132</sup>. El análisis inmunohistoquímico utilizando anti-MOMA2 como anticuerpo primario y la reconstrucción de las lesiones de este ensayo preliminar, nos permitió evidenciar a los macrófagos como la célula principal en el tejido lesional de los ratones de ambos grupos, algo previamente reportado <sup>67,68</sup>. A pesar de haber obtenido información valiosa y observado fenómenos interesantes en este ensayo preliminar y los experimentos subsecuentes, es importante mencionar que durante su realización se presentaron algunos imprevistos. La principal desventaja fue la falta de control sobre la dosis inoculada. Las infecciones de los ratones se realizaron a partir de parásitos en su forma de amastigote obtenidos del macerado de una lesión de larga evolución de un ratón C57BL/6 infectado con *L. mexicana*. El ratón fue sacrificado minutos antes de comenzar el ensayo, se maceró la lesión y a partir del macerado se realizaron las infecciones. Si bien, todas las infecciones se hicieron en el mismo momento, a partir del mismo macerado y llevando a cabo la misma serie de pasos, es algo que se debe de tomar en cuenta aquel que desee reproducir estos resultados. En resumen, independientemente de los detalles metodológicos enfrentados en

este ensayo preliminar, observamos que los ratones inmunosuprimidos con UVB (25mJ/cm<sup>2</sup>) e infectados con *L. mexicana* desarrollan lesiones de mayor tamaño, presentan una mayor carga parasitaria por análisis semicuantitativo *in situ* y una mayor cantidad de IL-10 en la epidermis de las lesiones que los ratones no inmunosuprimidos e infectados. También observamos la tendencia al desarrollo de un mayor tamaño de lesión y una mayor cantidad de células IL-10+ en la epidermis de los ratones radiados con dosis de UVB no inmunosupresoras, lo cual nos habla de una relación entre el tamaño de la lesión y la liberación de IL-10 dosis-dependiente, independientemente de que la dosis de UVB en cuestión no genere supresión de DTH. Por último, con base en estos resultados preliminares, se decidió llevar los ensayos de infección más allá de los 25 días y repetir la exposición de UVB al menos cada 15 días a lo largo de la duración de los siguientes ensayos.

**9.5 Evaluación de la evolución de la infección en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana* y determinación de la carga parasitaria por dilución limitante.**

El modelo de infección establecido utilizando ratones hembra de la cepa C57BL/6, inmunosuprimidos con luz UVB, infectados con parásitos de la especie *Leishmania mexicana* en la fase de promastigote metacíclico a una dosis de  $1 \times 10^6$  por vía intradérmica en la región dorsal del tronco, es un modelo de infección que actualmente no está reportado en la literatura universal. Después de estandarizado el modelo de infección y las condiciones para la inmunosupresión, se inmunosuprimieron e infectaron ratones de la manera antes descrita. Se midieron las lesiones cada 5 días durante 42 días y se determinó la carga parasitaria al finalizar el ensayo. Los resultados mostraron que los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L.*



*mex*) presentaron un mayor tamaño de lesión al día 30 y 42 de infección y una mayor carga parasitaria, que los ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*). Durante décadas se han utilizado modelos murinos para el estudio experimental de la infección por *Leishmania spp.* pero no hay reportes de un modelo de infección en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con UVB e infectados con *Leishmania mexicana* en la piel de la región dorsal del tronco. Los reportes existentes donde se haya utilizado ratones C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana* difieren del nuestro en aspectos fundamentales como: la elección del sitio de infección (por lo general se utiliza el cojinete plantar o las orejas de los ratones), el método de medición empleado y las unidades en las que se reporta el tamaño de la lesión (algunos autores utilizan calibrador dial Vernier y miden únicamente el Eje X, otros el Eje Y, otros miden ambos Ejes y determinan el área, otros utilizan un micrómetro digital y determinan circunferencia, etc.) y por supuesto, la exposición a UVB. Esto dificulta aún más la comparación de nuestros resultados con lo reportado en la literatura. En nuestro trabajo la evolución de las lesiones fue documentada utilizando dos métodos. La medición del diámetro del eje X de las lesiones se realizó utilizando un micrómetro digital Mitutoyo y se expresó en milímetros, y la medición de las lesiones en los ejes X y Y se utilizó un calibrador dial Vernier y se expresó en mm<sup>2</sup>. Los ratones del grupo WT + *L. mex* desarrollaron lesiones homogéneas y con un crecimiento constante, algo previamente observado en el establecimiento del modelo y ensayos preliminares. Este comportamiento de la evolución de la infección en cuanto a tamaño de lesión, había sido previamente reportado en otros trabajos. En un trabajo donde se comparó la evolución de las lesiones de ratones de la cepa BALB/c, C57BL/6 y C3H infectados con bajas (10<sup>3</sup>) y altas (5 x 10<sup>6</sup>) dosis de *Leishmania mexicana* se reportó un comportamiento similar al observado en nuestros experimentos en la evolución de la lesión de los ratones C57BL/6 infectados con altas dosis durante las primeras 6 semanas <sup>133</sup>. En otro trabajo donde infectaron ratones BALB/c por vía intradérmica con

*Leishmania amazonensis* reportaron el tamaño de la lesión a las 6 semanas de aproximadamente 20 mm<sup>2</sup> <sup>134</sup>. Un tamaño similar al observado en los ratones del grupo WT + *L. mex* en nuestro ensayo. En otro trabajo donde infectaron ratones C57BL/6 en el cojinete plantar con promastigotes de *L. mexicana* también reportaron un crecimiento constante de las lesiones durante las primeras 6 semanas y un tamaño al finalizar la sexta semana similar al observado en nuestro grupo experimental WT + *L. mex* <sup>135</sup>. Durante la evolución de las lesiones de los ratones de los grupos WT + *L. mex* y UVB + *L. mex* observamos que las lesiones de los ratones WT+ *L. mex* comenzaba a presentar datos de ulceración que se tornan evidentes para el día 42 de la infección, algo que no se observó en los ratones UVB + *L. mex*. Muy probablemente esto se deba al aumento de la división celular de los queratinocitos inducido por la radiación UV, lo que lleva a la acumulación de queratinocitos epidérmicos y aumento del grosor de la epidermis <sup>136</sup>. Algo observado en el análisis histopatológico de estas lesiones que será discutido más adelante. El papel que juega la ulceración de las lesiones de los ratones WT + *L. mex* en la resolución o cronicidad de la infección, es incierto y sin duda presenta un motivo para evaluar la evolución de las lesiones durante una mayor cantidad de tiempo.

Como se comentó en la discusión del punto anterior, este ensayo no representa la primer evidencia publicada en donde se observe que un agente patógeno prolifere y la infección se exacerbe en un hospedero inmunosuprimido por exposición a UVB. Además de los trabajos previamente mencionados en donde se demostró la recurrencia de la infección por el virus HSV1 en ratones blancos Swiss infectados y semanas más tarde expuestos a luz UV <sup>127</sup>, el establecimiento del modelo animal utilizando ratones C3H inmunosuprimidos con UVB e infectados con HSV1 donde demostraron una recurrencia del 80% de la infección al volver a exponer a los ratones a una dosis inmunosupresora de UVB <sup>130</sup> ó el trabajo donde demostraron que la inmunosupresión inducida por UVB en un grupo de ratones de una cepa

inmunocompetente los volvía altamente susceptibles a la enfermedad causada por el virus MmuPV1 <sup>123</sup>, se ha reportado este fenómeno de susceptibilidad en modelos experimentales utilizando otros agentes infecciosos además de los virus.

En nuestros resultados observamos una correlación entre el aumento en el tamaño de la lesión y el aumento de la carga parasitaria. Esta correlación ya había sido reportada en modelos de infección utilizando ratones C57BL/6 y al parásito *Leishmania mexicana*, pero bajo condiciones experimentales distintas (utilizaron otra cepa del parásito [MNYC/BZ/62/M379], inicialmente se inocularon  $5 \times 10^6$  parásitos, y las infecciones se realizaron en el cojinete plantar) <sup>89</sup>. A diferencia de nuestros resultados, existen reportes donde no siempre sucede esta correlación en ratones inmunosuprimidos con UVB. Tal es el caso de un trabajo donde se expusieron ratones de la cepa BALB/c y C3H a  $45 \text{ kJ/m}^2$  de UVB y tres días más tarde se infectaron con  $1 \times 10^6$  de bacilos vivos de *Mycobacterium bovis*. Se monitorearon las lesiones realizando mediciones del cojinete plantar (sitio del inóculo) y periódicamente se determinó el número de bacterias en los ganglios linfáticos regionales y en el bazo de los ratones infectados. Al finalizar el ensayo, no observaron una diferencia significativa en el grosor del cojinete plantar de los animales inmunosuprimidos e infectados en comparación con los no inmunosuprimidos e infectados, de ninguna de las dos cepas. Pero sí observaron que los ratones inmunosuprimidos e infectados de ambas cepas, presentaban una mayor cantidad de bacterias en los ganglios linfáticos regionales y en el bazo a los 21, 42 y 65 días de infección <sup>137</sup>. Es evidente que el agente patógeno en cuestión juega un papel clave en el comportamiento de la infección y los parámetros micro o macroscópicos que el investigador debe establecer para medir la evolución de la misma deben adecuarse a cada caso en particular. En referencia a lo mencionado, hay reportes donde ratones inmunosuprimidos con UVB e infectados no muestran susceptibilidad ante el agente patógeno. Tal es el caso de un trabajo donde utilizaron ratones C57BL/6 los expusieron a una dosis de 80-

170 kJ/m<sup>2</sup> de UVB y posteriormente infectaron con *Schistosoma mansoni*. Establecieron como parámetros del desarrollo de enfermedad: la formación de granulomas en el hígado, fibrosis, y carga parasitaria. Al finalizar el estudio no se observaron diferencias entre los ratones inmunosuprimidos e infectados y los controles no inmunosuprimidos e infectados. Los autores concluyeron que la inmunosupresión inducida por radiación UV no causa alteraciones importantes en la esquistosomiasis en contraste con los estudios sobre otras enfermedades infecciosas <sup>138</sup>. Por último, es importante mencionar que la carga parasitaria presentada por los ratones del grupo WT + *L. mex.* en las lesiones de 6 semanas de evolución es similar a la reportada en un trabajo de referencia de la técnica de dilución limitante donde infectaron ratones C57BL/6 con *Leishmania mexicana* y se realizó la misma técnica para determinar carga parasitaria en lesiones del mismo tiempo de evolución <sup>139</sup>. Como se discutirá más adelante, las lesiones de mayor tamaño presentadas por los ratones del grupo UVB + *L. mex.* a los 30 días, son el reflejo macroscópico de un microambiente inmunológico desfavorable para los ratones inmunosuprimidos.

#### **9.6 Evaluación histopatológica de la lesión cutánea en ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana*.**

Se sabe que existe un espectro tanto clínico como histológico en la leishmaniosis cutánea <sup>140</sup>. El espectro y su variabilidad dependen de varios factores, como el tipo y la duración de la lesión, la cepa de *Leishmania* infectante, la ubicación geográfica en la que haya sido adquirida, la carga parasitaria, la inmunidad del hospedero, etc <sup>141</sup>. Las lesiones evolucionan de ser una pápula/nódulo que se torna blando a la formación de una placa/nódulo que posteriormente pierde la cubierta dermoepidérmica y se ulcera. Al cabo de 3-4 meses se forma una úlcera bien

circunscrita de bordes indurados y fondo limpio que tiende a sanar de 3-12 meses después <sup>141</sup>. En las lesiones cutáneas por *Leishmania* se pueden identificar patrones histológicos indicativos de pronóstico favorable o desfavorable para la resolución <sup>142</sup>. En nuestro estudio, se realizó el análisis histopatológico a partir de cortes congelados teñidos con H&E del tejido lesional de los 4 grupos experimentales (WT + *L. mex*, UVB + *L. mex*, UVB + PBS y CP + *L. mex*) a los 15 y 30 días de evolución de la infección. El análisis a los 15 días de infección en las lesiones de los ratones del grupo WT + *L. mex* mostró un infiltrado celular difuso en la hipodermis con invasión a la capa muscular, presencia de amastigotes en intersticio y células parasitadas en toda la lesión. Se observó la presencia de células PMN, linfocitos y células fagocíticas en el infiltrado. En las lesiones de los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex*) se observó la presencia de parásitos y células fagocíticas parasitadas debajo de la capa muscular, a diferencia de los ratones no inmunosuprimidos e infectados donde la presencia de parásitos y células parasitadas se limitó en la capa muscular y no debajo de ella. De igual forma el tejido de estos ratones presentó un infiltrado celular difuso en la hipodermis y la presencia de células PMN, linfocitos y células fagocíticas en el infiltrado. El espectro histológico de la leishmaniosis cutánea se ha clasificado de diversas maneras en diferentes tipos. Uno de los primeros reportes de su clasificación la encasilla en tres formas: forma tuberculoide, forma de predominio de macrófagos y forma intermedia <sup>143</sup>. Anteriormente se habían reportado dos patrones histológicos: lesiones tempranas (<1 año de evolución) caracterizadas por la presencia de un infiltrado de macrófagos difuso y gran cantidad de parásitos en la lesión, y lesiones tardías (>1 año) con un infiltrado granulomatoso <sup>144</sup>. Esta clasificación ha sido utilizada por otros autores <sup>145</sup>. En otro trabajo se sugirió una clasificación de cuatro patrones diferentes dependiendo de las diferentes poblaciones celulares, formación de granuloma, presencia de necrosis y recuento de parásitos <sup>146</sup>. El análisis realizado a los 15 días por nuestro equipo de trabajo es ambicioso al

tratarse de una enfermedad crónica, las diferencias histopatológicas observadas a los 15 días entre los dos grupos experimentales son finas y es muy temprano en la infección para clasificarlas según la literatura. La diferencia más destacada observada que persiste hasta los 30 días de evolución es la presencia de amastigotes en células fagocíticas o en el intersticio en la capa muscular y debajo de ella. El análisis histopatológico a los 30 días de infección en los ratones no inmunosuprimidos e infectados (WT + *L. mex*) mostró un infiltrado celular contenido en la dermis e hipodermis sin invasión a la capa muscular, con una predominancia de linfocitos y células fagocíticas. Se observó la formación de una estructura de contención tisular al rededor del agente infeccioso y de células parasitadas. En los ratones inmunosuprimidos e infectados (UVB + *L. mex.*) se observó una lesión descontrolada sin la formación franca de una estructura de contención del agente infeccioso. Presencia de un infiltrado celular en la dermis, hipodermis, muscular y submuscular y predominancia de linfocitos y de células fagocíticas. En una serie de publicaciones significativas se dilucidó la patogenia de la leishmaniosis cutánea y se clasificó en 5 subtipos; involucro difuso de macrófagos sin necrosis (tipo 1), necrosis difusa de macrófagos (tipo 2), necrosis focal de macrófagos (tipo 3), granuloma tuberculoide reactivo temprano (tipo 4) y granuloma tuberculoide (lupoide) (tipo 5). El autor también hizo hincapié en que la resolución se produce en la mitad del espectro de la leishmaniosis y que, a diferencia de la lepra, la LCL no es principalmente una afección granulomatosa. Se destacó además que: el granuloma intacto de macrófagos sin necrosis, la lisis de macrófagos con necrosis y la activación de los macrófagos con formación de granuloma tuberculoide representan las tres respuestas importantes del huésped contra *Leishmania* <sup>142, 147, 148</sup>. Además de la respuesta granulomatosa, *Leishmania* induce una respuesta tisular destructiva en la dermis y la epidermis, que es más marcada en algunas formas de LCL del Nuevo Mundo <sup>149</sup>. Según la clasificación descrita las lesiones de los ratones del grupo WT + *L. mex* de 30 días de evolución presentan

características del tipo 3 y 4, con la presencia de una necrosis focal de macrófagos en el centro de la lesión y el inicio de formación de un granuloma. Estos tipos de lesión se han asociado a la formación de un granuloma y la eliminación efectiva de parásitos por activación de macrófagos en células epitelioides <sup>142, 147</sup>. Lo cual indica que las lesiones de 30 días de evolución de los ratones del grupo WT + *L. mex.* presentan un ambiente histopatológico favorable hacia la contención y resolución de la lesión. Por otro lado, las lesiones de los ratones del grupo UVB + *L. mex* de 30 días de evolución presentan características principalmente del tipo 2, con la presencia de una necrosis difusa de macrófagos, algo que refleja una elevada cantidad de parásitos en la lesión y de muerte celular desorganizada, lo cual nos indica de la presencia de un ambiente histopatológico desfavorable hacia la contención y resolución de la lesión. Los granulomas se caracterizan por la presencia de histiocitos que han evolucionado a células epitelioides, que forman agregados más o menos definidos en los que se puede encontrar otras poblaciones de células inflamatorias. La formación de granulomas es el resultado de una compleja interacción inflamatoria entre un antígeno persistente no degradable y una respuesta inmune crónica del hospedero caracterizada por: actividad de macrófagos, respuesta celular Th1, actividad excesiva de células B, complejos inmunes circulantes y un amplia gama de mediadores biológicos <sup>150</sup>. La formación de granulomas comúnmente se ha asociado con lesiones de meses o años de evolución, pero en el caso de LCL no siempre es así. Aunque el granuloma epitelioides reactivo temprano es común en LCL de corta evolución, el granuloma tuberculoide bien organizado es raro. Sin embargo, hay reportes de la formación de esta estructura histológica en lesiones de apenas cuatro semanas de evolución <sup>142</sup>. En otro estudio, en el 25% de las lesiones agudas se encontraban células epitelioides e infiltrado linfocitario <sup>151</sup>. Se ha sugerido que en la LCL la población de células epitelioides puede ocurrir en cualquier etapa de la evolución de la enfermedad. Incluso las lesiones tempranas con alta carga parasitaria

pueden mostrar granuloma en el borde de las lesiones y secciones más profundas de la biopsia/necropsia <sup>142,147</sup>. Por último, es importante mencionar que en el análisis histopatológico a los 30 días de infección de las lesiones de los ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida e infectados (CP + *L. mex.*) no se observó el desarrollo macroscópico de una lesión cutánea, sin embargo, se observó la presencia de amastigotes y de células fagocíticas infectadas a los 30 días de infección.

### **9.7 Evaluación de la presencia, distribución y porcentaje de degranulación de mastocitos y su papel en la patogénesis en lesiones cutánea de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana***

Los mastocitos son células efectoras importantes del sistema inmunológico y tienen funciones inmunomoduladoras en procesos de salud y enfermedad. Se distinguen por su alto contenido de gránulos secretores electrodenso, que se llenan con grandes cantidades de compuestos inmunomoduladores preformados y pre-activados. Cuando se activan apropiadamente, los mastocitos sufren una degranulación, un proceso mediante el cual los gránulos preformados se liberan rápidamente en el entorno. En muchos casos, los efectos que tienen los mastocitos en la respuesta inmune están estrechamente asociados con las acciones biológicas de los compuestos granulosos que liberan <sup>152</sup>. Los mastocitos producen tres clases principales de mediadores: mediadores asociados con gránulos preformados; mediadores lipídicos; y una amplia variedad de citocinas y quimiocinas. Algunas de las citocinas producidas por los mastocitos incluyen mediadores pro-inflamatorios clásicos como TNF o IL-1 $\beta$ , o mediadores anti-inflamatorios o inmunomoduladores como IL-10 o TGF- $\beta$ . También se han descrito como fuente importante de citocinas tipo Th2: IL-4, IL-5 e IL-13 o de citocinas de tipo Th1: IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18 <sup>94</sup>. En



nuestro trabajo, el análisis histológico de las lesiones teñidas con azul de toluidina reveló una importante presencia de mastocitos en las lesiones y en el tejido circundante de los 4 grupos experimentales (WT + *L. mex*, UVB + *L. mex*, UVB + PBS y CP + *L. mex*) a los 15 y 30 días de evolución de la infección. A primer instancia resultó evidente notar una diferencia en el patrón de distribución de los mastocitos en las lesiones de los diferentes grupos, en la cantidad de mastocitos presentes y en el porcentaje de degranulación que presentaban las células. En un trabajo previamente reportado, se realizó un análisis de cuantificación y porcentaje de degranulación de mastocitos en ratones C57BL/6 y BALB/c infectados con *Leishmania mexicana*. En ese trabajo se infectaron los ratones con  $1 \times 10^6$  promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* en el cojinete plantar. Se realizó análisis de la cantidad de mastocitos y porcentaje de degranulación después de 1 hora, 3 horas, 3 días, 1, 3, 4 y 8 semanas de infección en ambos grupos de ratones. A diferencia de nuestra clasificación morfológica de degranulación en 3 categorías, los autores reportaron únicamente 2 estados morfológicos de degranulación: degranulado o no degranulado <sup>153</sup>. En ese trabajo los autores observaron un fenómeno similar al observado por nuestro grupo de trabajo, un incremento en la cantidad y un gran incremento en el porcentaje de degranulación de los mastocitos en las lesiones cutáneas de los ratones de ambos grupos en comparación con los ratones no infectados. En nuestro trabajo, en las lesiones de 15 días de evolución de los ratones UVB + *L. mex* se observó una mayor cantidad de mastocitos y un mayor porcentaje de mastocitos completamente degranulados que los ratones WT + *L. mex*. En estas lesiones se observó un patrón en la distribución de mastocitos, encontrándose una mayor cantidad de mastocitos completamente degranulados en el interior de la lesión y mastocitos degranulados o en reposo en la periferia o fuera de ella. En las lesiones de 30 días de evolución de los ratones UVB + *L. mex* se observó una mayor cantidad de mastocitos y un mayor porcentaje de mastocitos completamente degranulados que los ratones WT + *L. mex*. En

estas lesiones se observa un patrón en la distribución similar de mastocitos entre ambos grupos, encontrándose una mayor cantidad de mastocitos completamente degranulados en el interior de la lesión y mastocitos degranulados o en reposo en la periferia o fuera de ella. La activación y degranulación de los mastocitos o la producción y liberación de citocinas sin degranulación, depende del estímulo de una variedad de receptores exógenos o endógenos que poseen estas células <sup>154</sup>. Algunos de estos receptores son: receptores Fc (FcεRI, FcγRI, FcγRII y FcγRIII), receptores tipo Toll (TLR1 al 7 y TLR 9), receptores tipo NOD, receptores del complemento, receptores de citocinas, etc <sup>155</sup>. La degranulación o no degranulación depende del receptor activado, por ejemplo: TLR4 puede ser activado por LPS de bacterias Gram-negativas, lo cual induce la producción de citocinas sin que la célula se degranule. Por otro lado, la activación a través de TLR2 por peptidoglucanos puede resultar en la degranulación y producción de citocinas <sup>156</sup>. En el contexto de una infección por *Leishmania mexicana* se ha demostrado experimentalmente que el lipofosfoglucono (LPG) que abunda en la membrana del parásito es un ligando para TLR2 <sup>157</sup>. Continuando con el trabajo referenciado anteriormente, además del aumento en la cantidad de mastocitos y el aumento en la degranulación que los autores reportaron, compatible con nuestros resultados, los autores realizaron un análisis comparativo de la respuesta de mastocitos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados *in vitro* con LPG de *Leishmania mexicana*. Los resultados demostraron que los mastocitos de los ratones C57BL/6 estimulados con LPG a través de TLR2 llevan a una mayor producción de TNF-α, IL-10 y MIP-1α que los mastocitos de los ratones BALB/c <sup>153</sup>. Adjudicándole a los mastocitos un papel de promotores de una afluencia sostenida de células al sitio de la lesión en la infección cutánea por *Leishmania mexicana*.

En otro estudio en donde se investigó el papel de los mastocitos durante la infección por *Leishmania major*, se realizó un análisis morfológico de los mastocitos en la piel de ratones C57BL/6 resistentes y BALB/c susceptibles infectados con *Leishmania major*. Al igual que en nuestro estudio y el antes referenciado, encontraron un gran porcentaje de degranulación de los mastocitos en el tejido de lesión por *L. major* en ambas cepas de ratones. Posteriormente examinaron el curso de la infección en ratones genéticamente modificados deficientes de mastocitos (WBB6F<sub>1</sub>-*W/W<sup>v</sup>* o WCB6F<sub>1</sub>-*SI/SI<sup>d</sup>*). Observaron que los mastocitos aumentaron significativamente la intensidad y el tamaño máximo de las lesiones cutáneas en los sitios de infección por *L. major*, y en algunos casos prolongaron sustancialmente la persistencia de las infecciones <sup>97</sup>. El fenómeno antes descrito es compatible con lo observado por nuestro equipo de trabajo en las lesiones de los ratones pertenecientes al grupo UVB + *L. mex.* en los que se cuantificó una mayor cantidad de mastocitos en el sitio de lesión, un mayor porcentaje de mastocitos degranulados en el sitio de lesión y un mayor tamaño de lesión en comparación con las lesiones de los ratones del grupo WT + *L. mex.*

Hasta este punto de la discusión no se ha mencionado el factor que más influye en la cantidad, distribución y porcentaje de degranulación de los mastocitos de la piel de las lesiones estudiadas en nuestro trabajo, la radiación UV. La biología de los mastocitos de la piel y las respuestas cutáneas de mastocitos están influenciadas por los efectos de factores ambientales incluida la radiación ultravioleta. El número de mastocitos en la piel humana, por ejemplo, es mayor en las áreas expuestas al sol en comparación con la piel no expuesta, <sup>158, 159</sup> y se ha demostrado que el número de mastocitos en las capas superficiales de la piel es hasta 10 veces más alto que en el tejido subcutáneo <sup>160</sup>. Es bien sabido que los mastocitos dérmicos son un importante mediador celular de la supresión de la inmunidad adaptativa inducida por UV a través de la producción de IL-10 <sup>161 162</sup>. En un estudio realizado con mastocitos de piel humana purificados, compararon

los efectos de diferentes protocolos de irradiación en la inducción de liberación espontánea de mediadores típicos de mastocitos. Los mastocitos purificados fueron expuestos a distintas dosis de UVA (0, 5, 10, 15, 20, 25 J/cm<sup>2</sup>) y de UVB (0.5, 25, 50, 75, 100 mJ/cm<sup>2</sup>). Los autores observaron que los mastocitos en reposo expuestos tanto a UVA como UVB liberaban altas cantidades de histamina <sup>163</sup>. En el contexto de una infección por *Leishmania mexicana*, la liberación temprana de histamina por parte de los mastocitos cutáneos irradiados con UVB podría favorecer a la respuesta tipo Th2 <sup>164</sup> y adicionalmente causar vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. La liberación de TNF- $\alpha$  en conjunto con histamina, contribuye como un potencial inductor de inflamación, llevando a un aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio, aumento de la permeabilidad vascular y quimiotaxis de neutrófilos al sitio irradiado e infectado. Estos eventos inflamatorios pueden llevar a una extravasación rápida de leucocitos de los vasos sanguíneos a los tejidos circundantes donde los parásitos pueden encontrar nuevos hospederos, exacerbando la lesión <sup>153</sup>. Ciertamente esta serie de eventos desencadenados tras la exposición a UVB, representan un panorama inmunológico desfavorable en la piel de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex*. Además de la inducción de liberación de histamina por parte de los mastocitos radiados, se ha descrito que en la piel irradiada sucede un aumento en el reclutamiento, la cantidad <sup>165</sup>, la degranulación <sup>166, 167</sup> y la producción de IL-10 inmunosupresora <sup>168</sup> por parte de los mastocitos. En un estudio realizado en ratones C57BL/6 se demostró que la exposición a 3 dosis de 0.15 J/cm<sup>2</sup> de UVB es suficiente para inducir supresión de la reacción de hipersensibilidad tardía y un reclutamiento rápido de mastocitos a la superficie de la piel irradiada en comparación con la piel no radiada <sup>165</sup>. Además se ha descrito que la endotelina-1 <sup>166</sup> y el ácido cis-urocánico <sup>167</sup> que son algunos de los mediadores moleculares liberados por las células cutáneas tras la exposición

a UVB, inducen la degranulación de los mastocitos. Algo que en parte explica el aumento de la cantidad de mastocitos y el aumento en el porcentaje de degranulación en las lesiones de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex*. Además del aumento en la cantidad de mastocitos al sitio irradiado de la piel, aumento de la degranulación y aumento de la liberación de histamina, se ha descrito que los mastocitos radiados liberan IL-10. En un estudio realizado en ratones C57BL/6 expuestos a UVB, se demostró que los mastocitos que migraban a la piel radiada liberaban cantidades importantes de IL-10, y ésta contribuía a los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores del microambiente cutáneo <sup>168</sup>. Nuevamente, algo inmunológicamente desfavorable para la resolución de la infección en los ratones UVB + *L. mex*. En resumen, los resultados experimentales obtenidos y analizados por nuestro grupo de trabajo y la literatura universal consultada y antes discutida, nos plantea un panorama general de los mecanismos que se desencadenan tras la exposición a UVB y los efectos que estos tienen en el papel que juegan los mastocitos, directa o indirectamente, en la respuesta contra *Leishmania*. Es evidente que los mastocitos juegan un papel clave en las modificaciones del microambiente cutáneo inducidas por UVB previo a la llegada del parásito a la piel irradiada y durante el curso de la infección. Sin embargo, sería aventurado responsabilizar únicamente a estas células del incremento en el tamaño de la lesión o la falta de control que se tiene sobre el microorganismo en los ratones UVB + *L. mex*. No obstante, se ha presentado evidencia y bibliografía que demuestra, al menos en parte, que los mastocitos juegan un papel importante en la patogénesis de esta infección bajo estas circunstancias.

**9.8 Evaluación del papel de IL-10, IFN- $\gamma$ , linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y macrófagos en la respuesta inmune local de las lesiones cutáneas de ratones C57BL/6 inmunosuprimidos con luz UVB e infectados con *Leishmania mexicana*.**

Para analizar la presencia y cantidad de células IL-10+, IL-10 en tejido, células IFN- $\gamma$ +, IFN- $\gamma$  en tejido, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y macrófagos en las lesiones de los ratones de los diferentes grupos, se realizaron cortes congelados en los días 15 y 30 de infección y se realizó la técnica de inmunohistoquímica utilizando como anticuerpo primario: IL-10, IFN- $\gamma$ , CD4, CD8 y MOMA2. Tras el análisis inmunohistoquímico de las lesiones nos encontramos ante dos panoramas inmunológicamente contrastantes. Como se presentó y discutió en el resultado anterior, es evidente que las modificaciones del microambiente cutáneo desencadenadas tras la exposición a UVB previo a la llegada del parásito a la piel irradiada, y durante el curso de la infección, repercuten de forma directa o indirecta en el desarrollo de la lesión. El tamaño de lesión, la carga parasitaria y lo observado en el análisis histopatológico, son el reflejo de un microambiente orquestado y efectuado por mediadores y células del sistema inmune. Los fenómenos observados en las lesiones de los ratones UVB + *L. mex.* en los días que fueron analizados, sugieren que el microambiente inmunológico local resulta desfavorable para la eliminación del parásito y la resolución de la infección.

Tras el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IL10 como anticuerpo primario, se cuantificó una mayor cantidad de células IL-10+ en la epidermis de los ratones UVB + *L. mex.* en comparación con los ratones WT + *L. mex.* en las lesiones de 15 y 30 días de evolución. También se observó una mayor cantidad de IL-10 en el tejido de la lesión tras realizado el análisis de pixeles del tejido lesional a los 15 y 30 días de evolución. El aumento de IL-10 en la

piel de ratones irradiados con UVB e infectados con *L. mexicana* en comparación con los ratones no irradiados e infectados, ya había sido observado y documentado en uno de nuestros ensayos preliminares antes discutidos. En aquel punto incluso se discutió acerca del probable fenómeno dosis-dependiente entre exposición a UVB y aumento de IL-10. En este sentido es importante discutir dos puntos: 1) los mecanismos que se desencadenan tras la exposición a UVB y llevan a una mayor producción de IL-10 en la piel radiada, independientemente de la presencia de *Leishmania* y 2) el papel que juega la IL-10 como mediador inmunológico en promover el establecimiento o cronicidad de la infección. En breve, la naturaleza energética de la radiación electromagnética como fenómeno físico le permite incidir directamente sobre los átomos de los enlaces químicos de las células y moléculas que se encuentran en las capas superficiales de la piel <sup>64</sup>. Dependiendo de la dosis de UV, los enlaces químicos pueden sufrir cambios conformacionales o de otra índole que modifican a la molécula y su función o efecto biológico, y se convierten en una señal biológicamente reconocible <sup>99</sup>. Algunos fenómenos descritos que se desencadenan tras la exposición a UVB y llevan a una mayor producción de IL-10 son: 1) La fotoisomerización del ácido urocánico (UCA) de su conformación *trans* a su conformación *cis* <sup>169</sup>. El *cis*-UCA es una molécula inmunosupresora con repercusiones locales y sistémicas. En relación a IL-10 se ha demostrado que esta molécula es responsable de iniciar una cadena de eventos biológicos que comienzan por la inducción de mastocitos a la liberación de histamina la cual estimula la producción de prostanoïdes por ende aumentan los niveles de PGE<sub>2</sub> <sup>170, 171</sup> y promueve el inicio de la cadena PGE<sub>2</sub> → IL-4 → IL-10 antes descrita <sup>102</sup>. También se ha descrito el efecto inmunosupresor sistémico de *cis*-UCA al inducir la liberación de IL-10 por parte de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados <sup>172</sup>. 2) La producción directa de IL-10 por los queratinocitos de la epidermis radiada <sup>100, 173</sup>. 3) La producción de una gran cantidad de IL-10 por parte de macrófagos CD11b<sup>+</sup> que infiltran la piel radiada con UVB <sup>174</sup>. 4) El factor activador de

plaquetas (PAF) que es liberado por los queratinocitos radiados, aumenta la producción de COX2 y promueve la cadena PGE2 → IL-4 → IL-10<sup>175,176</sup>. 5) Células T supresoras activadas productoras de IL-10 pero no de IL-4 ni IFN- $\gamma$ <sup>177</sup>. 6) Como se discutió en el resultado anterior, se ha descrito que en la piel irradiada hay un aumento en el reclutamiento<sup>165</sup>, la degranulación<sup>166, 167</sup> y la producción de IL-10 inmunosupresora<sup>168</sup> por parte de los mastocitos. Estos son algunos de los mecanismos que se desencadenan tras la exposición a luz UVB y de las células probablemente implicadas en el aumento de IL-10+ en las lesiones de la piel de los ratones del grupo UVB + *L. mex* cuantificado por nuestro grupo de trabajo. Las dos citocinas inmunosupresoras que más se han asociado con formas no curativas de leishmaniosis cutánea son IL-4 e IL-10. Aunque aún no se haya logrado describir completamente la patogénesis y las implicaciones de la leishmaniosis cutánea por *L. mexicana*, a diferencia de *L. major* que ha sido extensamente estudiada, la evidencia actual en este respecto representa un pilar sólido de referencia. Tal es el caso de una serie de trabajos en los que se ha desenmascarado poco a poco el papel que juega la IL-10 en el establecimiento y cronicidad de la infección por *L. mexicana*. En uno de los trabajos mencionados, utilizaron ratones de la cepa C57BL/6-IL-10<sup>-/-</sup> modificados genéticamente deficientes en la producción de IL-10. Posteriormente los infectaron con 5 x 10<sup>6</sup> de promastigotes de *L. mexicana* en el cojinete plantar y le dieron seguimiento a las infecciones. Los autores observaron que los ratones deficientes de IL-10 presentaban una disminución en el tamaño de la lesión y en la carga parasitaria y todos los ratones del grupo terminaban resolviendo las infecciones. Por otro lado, las lesiones de los ratones no modificados genéticamente e infectados, continuaron aumentando de tamaño al igual que la carga parasitaria >28 semanas después del día de infección<sup>88</sup>. En otro estudio realizado por el mismo grupo de trabajo, utilizaron ratones C57BL/6 con una modificación genética distinta, en este caso poblaciones



celulares específicas eran las que presentaban la deficiencia en la producción de IL-10. Se infectaron los ratones de la manera previamente mencionada y se les dio seguimiento. Los autores observaron que los ratones, cuyas células T (CD4+ y CD8+) eran deficientes en la producción de IL-10, resolvían las lesiones a diferencia de los ratones deficientes en la producción de IL-10 por parte de los macrófagos, o no deficientes <sup>89</sup>. En otro estudio realizado por otro grupo de trabajo se observa el mismo fenómeno en ratones C57BL/6 modificados genéticamente deficientes en la producción de IL-10 e IL-4 infectados con *L. tropica*. Los ratones presentaron una disminución del tamaño de la lesión y de la carga parasitaria en función del tiempo a diferencia de los ratones control <sup>178</sup>. Después de analizar los resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo y la literatura aquí repasada, en conjunto, estos datos indican que la IL-10 contribuye en gran medida a la incapacidad de ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana* de controlar a los parásitos y resolver la infección. Esto tiene una implicación directa en el mal pronóstico de las lesiones de los ratones del grupo UVB + *L. mex* debido al elevado nivel de IL-10 presente en el sitio de la lesión, producto de los múltiples mecanismos biológicos desencadenados tras la exposición a luz UVB. La IL-10 es una citocina de linfocitos Th2 que anula la producción de citocinas de linfocitos Th1, en particular de IFN- $\gamma$  <sup>99</sup>. La importante producción de IL-10 inducida por UVB cambia la respuesta inmune de un tipo Th1 de resistencia y resolución a un tipo Th2 de susceptibilidad. Dicho de otra manera, todo indica que de continuar el estímulo de UVB y la cadena de eventos subsecuentes que llevan a la elevada producción de IL-10, el panorama inmunológico hacia la resolución de la infección en esos ratones es desfavorable. Posteriormente realizamos el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-IFN- $\gamma$  como anticuerpo primario. En este análisis se cuantificó una menor cantidad de células IFN- $\gamma$ + en la lesión de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT +

*L. mex* en las lesiones de 15 y 30 días de evolución. También se observó una menor cantidad de IFN- $\gamma$  en el tejido de la lesión tras realizado el análisis de pixeles del tejido lesional a los 15 y 30 días de evolución. El papel del IFN- $\gamma$  en la infección por *Leishmania mexicana* tiene una implicación directa en la resolución de la infección debido a que la eliminación del parásito por parte de los macrófagos es promovida por el IFN- $\gamma$  producido por linfocitos CD4+ y CD8+ <sup>76</sup>.

<sup>77</sup>. Estudios seminales en los que utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 y BALB/c infectados con el parásito *L. major*, correlacionaron el control de la carga parasitaria y la resolución de la infección con la producción de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos T CD4+ y el desarrollo de una infección descontrolada con la ausencia de IFN- $\gamma$  en C57BL/6 y BALB/c respectivamente <sup>90,91</sup>.

En un estudio reciente realizado en ratones C57BL/6 modificados genéticamente deficientes en la producción de IL-10 (IL-10 -/-) e infectados con *L. mexicana*, se demostró que éstos resuelven la lesión y exhiben un aumento en el nivel de IFN- $\gamma$  y la producción de óxido nítrico, en comparación con ratones WT infectados <sup>88</sup>. Por otro lado, en estudios previos se había demostrado que ratones C57BL/6 modificados genéticamente deficientes en la producción de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ -/-) o en el receptor para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  R-/-) infectados con *L. major*, se volvían altamente susceptibles a la infección y se observaba una expansión de la respuesta tipo Th2 <sup>92</sup>.

Antagónico a IL-10, estos estudios demuestran que IFN- $\gamma$  juega un papel clave en la eliminación del parásito y la resolución de la infección, y a la inversa, su ausencia induce susceptibilidad a la infección y permite expansión de una respuesta tipo Th2 permisible <sup>92, 93</sup>. Después de los resultados obtenidos y de una revisión de la literatura antes citada, los resultados observados por nuestro equipo de trabajo sugieren que el IFN- $\gamma$  presente en las lesiones de los ratones WT + *L. mex* contribuye en la eliminación del parásito y pinta un panorama inmunológicamente favorable para la resolución de la infección. Por otro lado, el bajo nivel de IFN- $\gamma$  observado en

las lesiones de los ratones UVB + *L. mex* aunado a un elevado nivel de IL-10 contribuye en gran medida a la incapacidad de los ratones de ese grupo de controlar los parásitos y pinta un panorama inmunológico desfavorable para la resolución de la infección. Posteriormente realizamos el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD4 como anticuerpo primario. En este análisis se cuantificó una menor cantidad de células CD4+ en las lesiones de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* en las lesiones de 15 y 30 días de evolución. La trascendencia de la presencia de linfocitos T cooperadores CD4+ en las lesiones por *L. mexicana* no solo depende de la cantidad de células presentes en el sitio de la lesión, sino en el subtipo al que pertenecen. Los linfocitos T CD4+ Th1 se han asociado a la resolución de la infección y los linfocitos T CD4+ Th2 y T reguladores se han asociado al establecimiento y cronicidad de la misma. Como se mencionó en el punto anterior, estudios seminales en los que utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 y BALB/c infectados con el parásito *L. major*, correlacionaron el control de la carga parasitaria y la resolución de la infección con la elaboración de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos T CD4+ y el desarrollo de una infección descontrolada con la ausencia de IFN- $\gamma$  en C57BL/6 y BALB/c respectivamente <sup>90, 91</sup>. Esos estudios históricos de la respuesta inmune en contra de *Leishmania* definieron el modelo de infección que apoyó las observaciones realizadas *in vitro* en las que la respuesta de células T se puede dividir con base en el perfil de las citocinas que producen <sup>179</sup>. Los linfocitos T CD4+ Th1 y Th2 se distinguen por las citocinas que secretan. Las células Th1 secretan activadores de la inmunidad mediada por células como el IFN- $\gamma$  mientras que las células Th2 secretan citocinas que promueven la respuesta inmune mediada por anticuerpos como IL-4. La mayoría de las cepas de ratones (C57BL/6, C3H, CBA) desarrollan una infección cutánea autolimitada cuando se infectan con *L. major*. En estos ratones, la resolución de la infección está mediada por células

Th1 que producen IFN- $\gamma$ <sup>79</sup>. No cabe duda de que la dicotomía Th1-Th2 y su papel en el establecimiento o resolución de la infección por *Leishmania* se ha investigado de manera extensa. No obstante, los ratones del grupo UVB + *L. mex* han sido expuestos a UVB antes y durante el transcurso de la infección, por lo tanto, el panorama inmunológico en el que se ha desarrollado la infección es distinto y se sale de los modelos de infección previamente reportados. Como se ha mencionado, la exposición a los rayos UVB desencadena una cascada de citocinas, que comienza en PAF, incluyendo subsecuentemente PGE<sub>2</sub>, IL-4 e IL-10. Por lo que en ratones radiados, las respuestas Th1 se encuentran desactivadas, dando como resultado una inmunosupresión sistémica inducida por UVB<sup>175,180</sup>. La IL-10 es una citocina de linfocitos Th2 que anula la producción de citocinas de linfocitos Th1, en particular de IFN- $\gamma$ <sup>99</sup>. La producción de IL-10 inducida por UVB cambia la respuesta inmune de un tipo Th1 de resistencia a un tipo Th2 de susceptibilidad. Los resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo y la literatura antes repasada nos sugieren que, más importante que la cantidad de linfocitos CD4<sup>+</sup> presentes en el sitio de la lesión como parámetro predictivo de establecimiento/resolución de la infección, es el subtipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> al que pertenezcan. Es decir, la trascendencia de la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en las lesiones no solo depende de la cantidad de células presentes, sino del subtipo al que pertenecen. En el caso de los ratones del grupo UVB + *L. mex*, por los fenómenos inducidos tras la exposición a UVB y la importante presencia de IL-10 discutida previamente, es probable que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que predominan en las lesiones son del tipo Th2 o T reguladores, como se demostró experimentalmente en un contexto de inmunosupresión por UVB<sup>181</sup>. Por otro lado, en el caso de los ratones del grupo WT + *L. mex*, por el microambiente lesional rico en IFN- $\gamma$  es probable que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que predominan son del tipo Th1. Posteriormente realizamos el

análisis inmunohistoquímico utilizando anti-CD8 como anticuerpo primario. En este análisis no se observó una diferencia significativa en la cantidad de células CD8+ en las lesiones de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* en las lesiones de 15 y 30 días de evolución. Los primeros estudios que abordaron la importancia de las células T CD8+ en la leishmaniosis cutánea, sugirieron que las células T CD8+ no jugaban un papel en la protección. En esos estudios los autores utilizaron ratones deficientes de células T CD8+ y  $\beta$ 2-microglobulina, los infectaron con *L. major* y *L. mexicana*. Posteriormente observaron que los ratones resolvían las infecciones al igual que los ratones WT infectados<sup>81,82</sup>. Otros modelos de infección revelaron que las células T CD8+ desempeñaban un papel en la protección a través de la producción de IFN- $\gamma$ <sup>83</sup>. Ahora se sabe que el papel de las células T CD8+ en la protección o en el desarrollo de patología en la leishmaniosis cutánea, está directamente relacionado con sus funciones efectoras. Es decir, las células T CD8+ son protectoras cuando producen IFN- $\gamma$ , pero promueven la patología cuando son citolíticas. Por lo tanto, en una infección primaria, las células T CD8+ localizadas en los ganglios linfáticos regionales producen IFN- $\gamma$  y contribuyen al desarrollo de linfocitos CD4+ Th1 que inducen la activación de macrófagos y promueven la eliminación de los parásitos, favoreciendo a la resolución de la infección. En contraste, las células T CD8+ que migran a las lesiones en una infección primaria producen poco IFN- $\gamma$ , y en cambio exhiben un fenotipo citolítico que aumenta la muerte celular, lo que lleva a una respuesta inflamatoria exagerada que promueve aún más el daño tisular en la lesión<sup>80</sup>. En nuestro trabajo, observamos células T CD8+ en el tejido lesional de ambos grupos experimentales, pero no presentaron una diferencia estadísticamente significativa. Aunque el papel de las células T CD8+ en la protección o desarrollo de patología se relacione con las funciones efectoras, hasta la fecha no se ha asociado su presencia con la resolución o el establecimiento de la infección.

Por último, se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando anti-MOMA2 como anticuerpo primario. En este análisis se observó una mayor cantidad de macrófagos en las lesiones de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con los ratones WT + *L. mex* en las lesiones de 30 días de evolución. La trascendencia de la presencia de macrófagos en las lesiones por *L. mexicana* depende del ambiente de citocinas en el que se encuentren. El aclaramiento del parásito está determinado por la capacidad de los macrófagos de producir óxido nítrico a través de su activación por iNOS. Además del óxido nítrico, la producción de otros intermediarios oxidativos por los macrófagos activados complementa su actividad leishmanicida. Los mecanismos leishmanicidas de los macrófagos son activados tras la producción de óxido nítrico a través de su estimulación con citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ . Por otro lado, citocinas como IL-4, IL-10, y TGF- $\beta$  disminuyen la producción de óxido nítrico y por consiguiente atenúan la capacidad leishmanicida de los macrófagos <sup>73</sup>. En el escenario en el que los macrófagos que se encuentren en el microambiente de la lesión no se encuentren activados, su presencia resulta contraproducente ya que el parásito será fagocitado y utilizará al macrófago como reservorio donde continuará replicándose <sup>73</sup>. En el contexto de piel irradiada con UVB, un grupo de trabajo demostró experimentalmente que tras la exposición de la piel a la dosis inmunosupresora de 90 mJ/cm<sup>2</sup> de UVB, se observa una migración importante de macrófagos CD11b+ a la dermoepidermis radiada. Además, los macrófagos arriban en un estado activo de síntesis y liberación de IL-10, incluso a una mayor cantidad que los queratinocitos radiados <sup>174 182</sup>. Este fenómeno resulta doblemente contraproducente ya que los macrófagos se convierten en un blanco para el parásito, y además la liberación de IL-10 al microambiente lesional irradiado disminuye la producción de óxido nítrico, disminuye la capacidad leishmanicida de los macrófagos, anula la producción de citocinas de linfocitos Th1, en particular de IFN- $\gamma$  <sup>99</sup>, etc. En otro estudio

realizado por el mismo grupo de trabajo, se demostró experimentalmente que tras la exposición de la piel a 4 dosis mínimas de eritema (MED), no solo sucedía una migración transcapilar de macrófagos al sitio irradiado, si no que también se estimulaba la proliferación *in situ* de macrófagos a partir de un precursor dérmico<sup>183</sup>. Estos fenómenos de migración de macrófagos y proliferación *in situ* en la piel irradiada pudieran explicar la diferencia en la cantidad de macrófagos cuantificados en las lesiones de los ratones del grupo UVB + *L. mex* en comparación con el grupo WT + *L. mex*. Los resultados obtenidos y la literatura antes repasada en complemento con lo previamente discutido sugiere que la mayor cantidad de macrófagos observados en el microambiente lesional de los ratones UVB + *L. mex* en comparación con WT + *L. mex*, independientemente de que el macrófago activado sea la célula leishmanicida por excelencia, no es indicativo de un mejor pronóstico ni de una mayor tasa de eliminación del parásito. Esto debido a que la activación de los mecanismos leishmanicidas del macrófago dependen del microambiente de citocinas en el que se encuentre y en el caso de las lesiones de los ratones UVB + *L. mex* no predomina un microambiente que favorezca su activación.

En resumen, el análisis inmunohistoquímico de las lesiones nos muestra dos panoramas inmunológicamente contrastantes. Resulta evidente que las modificaciones del microambiente cutáneo desencadenadas tras la exposición a UVB previo a la llegada del parásito a la piel irradiada, y durante el curso de la infección, repercuten de forma directa e indirecta en el desarrollo de la lesión. El tamaño de lesión, la carga parasitaria y lo observado en el análisis histopatológico, son el reflejo de un microambiente orquestado y efectuado por mediadores y células del sistema inmune. Las lesiones de los ratones inmunosuprimidos por UVB e infectados por *L. mexicana* presentan un microambiente inmunológico desfavorable para la resolución de la infección caracterizado por la elevada presencia de mastocitos, macrófagos e IL-10 y la ausencia de INF- $\gamma$ .

## **10. Conclusión**

Los resultados sugieren que la exposición a luz UVB, a dosis inmunosupresoras antes y durante la infección cutánea con el parásito *Leishmania mexicana*, juega un papel en el desarrollo de un mayor tamaño de lesión y una mayor carga parasitaria.



## 11. Perspectivas

- Determinar el perfil M1/M2 de los macrófagos en el ambiente lesional.
- Utilizar marcadores específicos para el análisis de mastocitos.
- Identificar a las células IL-10 + e IFN- $\gamma$  + en el sitio de lesión.
- Realizar ensayos de infección en animales inmunosuprimidos inoculando dosis de parásitos no infectivos.
- Evaluar la carga parasitaria en una etapa más temprana de la infección para analizar el efecto de la segunda y tercer dosis de UVB sobre la cantidad de parásitos presentes en la lesión.
- Evaluar la presencia de parásitos en órganos linfoides secundarios de ratones inmunosuprimidos e infectados.
- Evaluar la evolución de las lesiones durante una mayor cantidad de tiempo.

## 12. Bibliografía

1. Marco A. Becerril Flores. Historia de la parasitología. in *Parasitología Médica* 1–6 (2008).
2. Marco A. Becerril Flores. Aspectos generales de la parasitología. in *Parasitología Médica* 7–11 (2008).
3. Organización Mundial de la Salud. *Leishmaniasis*. (2018).
4. Scott, P. & Novais, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 581 (2016).
5. Marco A. Becerril Flores. Leishmaniasis. in *Parasitología Médica* 58–65 (2008).
6. Kevric, I., Cappel, M. A. & Keeling, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. *Granulomatous Disord. Adult Skin* **33**, 579–593 (2015).
7. Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO & Marzochi KB. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. *2003*
8. Zink, A. R. *et al.* Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1616–1617 (2006).
9. Maspero, G., Sayce, A. H. & McClure, M. L. *The dawn of civilization : Egypt and Chaldea*. (London : Society for Promoting Christian Knowledge, 1910).
10. Moine, G. L. & Raymond, J. S. Leishmaniasis and Inca settlement in the Peruvian jungle. *J. Hist. Geogr.* **13**, 113–129 (1987).
11. Frías, L., Leles, D. & Araújo, A. Studies on protozoa in ancient remains - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 1–12 (2013).
12. Leishman, W. B. ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA. *Br. Med. J.* **1**, 1252–1254 (1903).
13. Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. *Natl Med J India*. (1903).
14. Ross, R. NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. *Br. Med. J.* **2**, 1261–1262 (1903).
15. Ross, R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. *Br. Med. J.* **2**, 1401–1401 (1903).
16. Akhoundi, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004349 (2016).
17. Shaw, J. *et al.* Characterization of Leishmania (Leishmania) waltoni n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 552–558 (2015).
18. ESPINOSA, O. A., SERRANO, M. G., CAMARGO, E. P., TEIXEIRA, M. M. G. & SHAW, J. J. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. *Parasitology* **145**, 430–442 (2018).
19. Tropical Disease Research. *Leishmaniasis*. (Tropical Disease Research & WHO, 2017).

20. World Health Organization. *Neglected tropical diseases*. (2018).
21. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS ONE* **7**, e35671 (2012).
22. World Health Organization. *Leishmaniasis - Epidemiological Situation*. (2018).
23. World Health Organization. *Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported*. (2017).
24. Teresa Uribarren Berrueta. *LEISHMANIOSIS o LEISHMANIASIS*. (Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, 2017).
25. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence; Mexico. *PLOS ONE* **7**, e35671 (2012).
26. Organización Mundial de la Salud. *Leishmaniasis; Principales factores de riesgo*. (2018).
27. Organización Mundial de la Salud. *Leishmaniasis; Datos y cifras*. (2018).
28. Organización Mundial de la Salud. *Leishmaniasis; Diagnóstico y tratamiento*. (2018).
29. Marco Antonio Becerril. Leishmaniosis; Características Generales del Parásito. in *Parasitología Médica* (McGraw-Hill, 2008).
30. P. A. Bates and M. E. Rogers. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. *Curr. Mol. Med.* **4**, 601–609 (2004).
31. Cunningham, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. *Exp. Mol. Pathol.* **72**, 132–141 (2002).
32. C. R. Davies, A. M. Cooper, C. Peacock, R. P. Lane & J. M. Blackwell. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of Leishmania major in the sandfly Phlebotomus papatasi. *Parasitology* (1990).
33. Turco, S. J., Späth, G. F. & Beverley, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species. *Trends Parasitol.* **17**, 223–226 (2001).
34. Bates, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* **37**, 1097–1106 (2007).
35. Dostálová, A. & Volf, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* **5**, 276–276 (2012).
36. Pimenta, P. *et al.* Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sandfly midgut. *Science* **256**, 1812 (1992).
37. Gossage, S. M., Rogers, M. E. & Bates, P. A. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* **33**, 1027–1034 (2003).
38. Kaye, P. & Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 604 (2011).
39. Marco Antonio Becerril. Leishmaniosis; Mecanismos Patogénicos. in *Parasitología Médica* **59** (2008).
40. *Skin; How does skin work?* (NIH - National Library of Medicine, 2018).
41. Leslie Gartner. Sistema Tegumentario. in *Texto Atlas de Histología* **327** (2009).
42. Leslie Gartner. Sistema Tegumentario; Epidermis. in *Texto Atlas de Histología* **328–333** (2009).
43. Leslie Gartner. Sistema Tegumentario; Dermis. in *Texto Atlas de Histología* **334–336** (2009).
44. PubMed Health. *How does skin work?; The deepest layer (subcutis)*. (Institute for Quality and Efficiency

in Health Care, 2016).

45. Kenji Kabashima. Overview: Immunology of the Skin. in *Immunology of the Skin 1* (Springer Japan, 2016).
46. K. E., F & K. E. Fichtelius. The Skin - a First Level Lymphoid Organ? *Int. Arch. Allergy Immunol.* (1971). doi:10.1159/000230480
47. Streilein JW. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* (1983).
48. Bos, J. D. & Kapsenberg, M. L. The skin immune system Its cellular constituents and their interactions. *Immunol. Today* **7**, 235–240 (1986).
49. Clark, R. A. *et al.* The Vast Majority of CLA<sup>+</sup> T Cells Are Resident in Normal Skin. *J. Immunol.* **176**, 4431 (2006).
50. Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z. & Nickoloff, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 679–691 (2009).
51. Richmond, J. M. & Harris, J. E. Immunology and Skin in Health and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, a015339 (2014).
52. ALEXANDER J.F. LAZAR & GEORGE F. MURPHY. La piel. in *Patología estructural y funcional de Robbins y Cotran* 1167 (ElSevier, 2010).
53. Douglas A Plager. Structure of the Skin and Cutaneous Immunology. in *Middleton's Allergy: Principles and Practice One*, (ElSevier, 2014).
54. Laura E Castrillón Rivera. La función inmunológica de la piel. *Dermatol. Rev Mex* (2008).
55. Ruocco, E., Baroni, A., Donnarumma, G. & Ruocco, V. Diagnostic procedures in dermatology. *Adv. Dermatol. Diagn. Part II* **29**, 548–556 (2011).
56. CÉSAR EDUARDO MONTALVO ARENAS. *Técnica Histológica*. (UNAM, 2010).
57. *Immunohistochemistry*. (NIH - National Cancer Institute, 2018).
58. Streete, J. The Nature of Electromagnetic Radiation. in *The Sun-Earth System* (1996).
59. *Electromagnetic Radiation*. (UC Davis Library, the California State University, 2015).
60. Malainey, M. E. Electromagnetic Radiation. in *A Consumer's Guide to Archaeological Science: Analytical Techniques* 23–26 (Springer New York, 2011).
61. *Electromagnetic spectrum*. (Encyclopedia Britannica, 2018).
62. *Ultraviolet radiation and health*. (World Health Organization, 2018).
63. *Radiación ultravioleta*. (Organización Mundial de la Salud, 2018).
64. Lucas, J. *What Is Ultraviolet Light?* (Live Science, 2017).
65. *¿Qué es la radiación ultravioleta (UV)?* (American Cancer Society).
66. Mougneau, E., Bihl, F. & Glaichenhaus, N. Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunol. Rev.* **240**, 286–296 (2011).
67. Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A. & Sacks, D. L. Efficient Capture of Infected Neutrophils by Dendritic Cells in the Skin Inhibits the Early Anti-Leishmania Response. *PLoS Pathog.* **8**, e1002536 (2012).
68. Ng, L. G. *et al.* Migratory Dermal Dendritic Cells Act as Rapid Sensors of Protozoan Parasites. *PLoS*

*Pathog.* **4**, e1000222 (2008).

69. van Zandbergen, G. *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *J. Immunol.* **173**, 6521 (2004).
70. Ribeiro-Gomes, F. L. & Sacks, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 59 (2012).
71. Kostka, S. L. *et al.* IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 3039–3046 (2009).
72. Belkaid, Y. *et al.* 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 (2000).
73. Liu, D. & Uzonna, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 83 (2012).
74. Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur. J. Dermatol.* (2007). doi:10.1684/ejd.2007.0122
75. Woelbing, F. *et al.* Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J. Exp. Med.* **203**, 177 (2006).
76. Von Stebut, E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp. Dermatol.* **16**, 340–346 (2007).
77. Velez, I. D. & Robledo, S. M. Generalidades de la Leishmaniasis. in *Manual Diagnóstico y control de la leishmaniasis en Centroamérica* (Universidad de Antioquia, 2010).
78. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*
79. Rogers, K. A. *et al.* Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**, 1–7 (2002).
80. Novais, F. O. & Scott, P. CD8(+) T cells in cutaneous leishmaniasis: The good, the bad and the ugly. *Semin. Immunopathol.* **37**, 251–259 (2015).
81. Wang, Z. E. *et al.* Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* **151**, 2077 (1993).
82. Huber, M., Timms, E., Mak, T. W., Röllinghoff, M. & Lohoff, M. Effective and Long-Lasting Immunity against the Parasite *Leishmania major* in CD8-Deficient Mice. *Infect. Immun.* **66**, 3968–3970 (1998).
83. Belkaid, Y. *et al.* CD8 T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following Low-Dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.* **168**, 3992 (2002).
84. Nateghi Rostami, M. *et al.* CD8(+) T Cells as a Source of IFN-γ Production in Human Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e845 (2010).
85. Zuluaga, M. & Robledo, S. M. Las células de Langerhans en la inmunidad a leishmaniasis. *Biomédica* **24**, 302–317 (2004).
86. Contreras, I. *et al.* Impact of *Leishmania mexicana* Infection on Dendritic Cell Signaling and Functions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3202 (2014).
87. Petritus, P. M., Manzoni-de-Almeida, D., Gimblet, C., Gonzalez Lombana, C. & Scott, P. *Leishmania*

mexicana Induces Limited Recruitment and Activation of Monocytes and Monocyte-Derived Dendritic Cells Early during Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1858 (2012).

88. Buxbaum, L. U. & Scott, P. Interleukin 10- and Fc $\gamma$  Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. *Infect. Immun.* **73**, 2101–2108 (2005).
89. Buxbaum, L. U. Interleukin-10 from T Cells, but Not Macrophages and Granulocytes, Is Required for Chronic Disease in *Leishmania mexicana* Infection. *Infect. Immun.* **83**, 1366–1371 (2015).
90. Reiner, S. L. & Locksley, R. M. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 151–177 (1995).
91. Scott, P., Pearce, E., Cheever, A. W., Coffman, R. L. & Sher, A. Role of Cytokines and CD4<sup>+</sup> T-Cell Subsets in the Regulation of Parasite Immunity and Disease. *Immunol. Rev.* **112**, 161–182 (1989).
92. Pinheiro, R. O. & Rossi-Bergmann, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 79–82 (2007).
93. Kima, P. E. & Soong, L. Interferon Gamma in Leishmaniasis. *Front. Immunol.* **4**, 156 (2013).
94. Marshall, J. S. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* **4**, 787–799 (2004).
95. VILLASEÑOR-CARDOSO, M. I. *et al.* Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol.* **30**, 425–434 (2008).
96. SAHA, B., TONKAL, A. M. D. J., CROFT, S. & ROY, S. Mast cells at the host–pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **137**, 19–23 (2004).
97. Wershil, B. K., Theodos, C. M., Galli, S. J. & Titus, R. G. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *J. Immunol.* **152**, 4563 (1994).
98. I. E. Kochevar & M. A. Pathak. Photophysics, photochemistry, and photobiology. in *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* 220 (McGraw-Hill, 1999).
99. Schade, N., Esser, C. & Krutmann, J. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 699–708 (2005).
100. Ullrich, S. E. THE ROLE OF EPIDERMAL CYTOKINES IN THE GENERATION OF CUTANEOUS IMMUNE REACTIONS and ULTRAVIOLET RADIATION-INDUCED IMMUNE SUPPRESSION. *Photochem. Photobiol.* **62**, 389–401 (1995).
101. Ullrich, S. E. & Schmitt, D. A. The role of cytokines in UV-induced systemic immune suppression. *J. Dermatol. Sci.* **23**, S10–S12 (2000).
102. Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V. W. & Ullrich, S. E. A Cytokine Cascade Including Prostaglandin E<sub>2</sub>, IL-4, and IL-10 Is Responsible for UV-Induced Systemic Immune Suppression. *J. Immunol.* **160**, 3783 (1998).
103. Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* **158**, 781–794 (1983).
104. Ullrich, S. E. & Byrne, S. N. The Immunologic Revolution: Photoimmunology. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 896–905 (2012).
105. Sacks, D. & Kamhawi, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 453–483 (2001).

106. Stamper, L. W. *et al.* Infection parameters in the sand fly vector that predict transmission of *Leishmania major*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1288–e1288 (2011).
107. Sifontes-Rodríguez, S. *et al.* The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania* in vitro and in vivo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 166–173 (2015).
108. Celeste, B. & Carolina S. Guimarães, M. *Growth curves of Leishmania braziliensis braziliensis promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's Drosophila medium as assessed by anti-Leishmania human sera.* **30**, (1988).
109. Wheeler, R. J., Gluenz, E. & Gull, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol. Microbiol.* **79**, 647–662 (2011).
110. Handman, E. Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. *Aust J Exp Biol Med Sci* (1979).
111. HOWARD, J. G., HALE, C. & CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropicum* in mice. *Parasite Immunol.* **2**, 303–314 (1980).
112. Lohoff, M. The Th1/Th2 Paradigm and Experimental Murine Leishmaniasis. *Int Arch Allergy Immunol* (1998stu).
113. Scott, P. Development and regulation of cell-mediated immunity in experimental Leishmaniasis. *Immunol. Res.* **27**, 489–498 (2003).
114. Locksley, R. M. & Louis, J. A. Immunology of leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 413–418 (1992).
115. Loeuillet, C., Bañuls, A.-L. & Hide, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit. Vectors* **9**, 144–144 (2016).
116. Bretscher, P., Wei, G., Menon, J. & Bielefeldt-Ohmann, H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes 'susceptible' mice resistant to *Leishmania major*. *Science* **257**, 539 (1992).
117. Menon, J. N. & Bretscher, P. A. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4020–4028 (1998).
118. Doherty, T. M. & Coffman, R. L. *Leishmania major*: Effect of Infectious Dose on T Cell Subset Development in BALB/c Mice. *Exp. Parasitol.* **84**, 124–135 (1996).
119. Uzonna, J. E., Joyce, K. L. & Scott, P. Low Dose *Leishmania major* Promotes a Transient T Helper Cell Type 2 Response That Is Down-regulated by Interferon  $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Exp. Med.* **199**, 1559 (2004).
120. Nghiem, D. X., Walterscheid, J. P., Kazimi, N. & Ullrich, S. E. Ultraviolet radiation-induced immunosuppression of delayed-type hypersensitivity in mice. *Methods* **28**, 25–33 (2002).
121. Dhaliwal, J. S. & Liew, F. Y. Induction of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania major* and the concomitant acceleration of disease development in progressive murine cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **55**, 645–651 (1987).
122. Rana, S., Rogers, L. J. & Halliday, G. M. Systemic low-dose UVB inhibits CD8 T cells and skin

inflammation by alternative and novel mechanisms. *Am. J. Pathol.* **178**, 2783–2791 (2011).

123. Uberoi, A., Yoshida, S., Frazer, I. H., Pitot, H. C. & Lambert, P. F. Role of Ultraviolet Radiation in Papillomavirus-Induced Disease. *PLOS Pathog.* **12**, e1005664 (2016).
124. Meeran, S. M., Katiyar, S., Elmets, C. A. & Katiyar, S. K. Silymarin inhibits UV radiation-induced immunosuppression through augmentation of interleukin-12 in mice. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1660 (2006).
125. Katiyar, S. K., Challa, A., McCormick, T. S., Cooper, K. D. & Mukhtar, H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis* **20**, 2117–2124 (1999).
126. El-Ghorr, A. A. & Norval, M. The UV Waveband Dependencies in Mice Differ for the Suppression of Contact Hypersensitivity, Delayed-Type Hypersensitivity and Cis-Urocanic Acid Formation. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 757–762 (1999).
127. Blyth, W. A., Hill, T. J., Field, H. J. & Harbour, D. A. Reactivation of Herpes Simplex Virus Infection by Ultraviolet Light and Possible Involvement of Prostaglandins. *J. Gen. Virol.* **33**, 547–550 (1976).
128. Stevens, J. G. Latent herpes simplex virus and the nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol.* (1975).
129. Harbour, D. A., Hill, T. J. & Blyth, W. A. Recurrent Herpes Simplex in the Mouse: Inflammation in the Skin and Activation of Virus in the Ganglia Following Peripheral Stimulation. *J. Gen. Virol.* **64**, 1491–1498 (1983).
130. Norval, M. A Murine Model of Herpes Simplex Virus Recrudescence. *J. gen. Virol.* (1987).
131. Kang, K., Gilliam, A. C., Chen, G., Tootell, E. & Cooper, K. D. In Human Skin, UVB Initiates Early Induction of IL-10 Over IL-12 Preferentially in the Expanding Dermal Monocytic/Macrophagic Population. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 31–38 (1998).
132. Enk, C. D., Sredni, D., Blauvelt, A. & Katz, S. I. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *J. Immunol.* **154**, 4851 (1995).
133. Rosas, L. E. *et al.* Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int. Immunol.* **17**, 1347–1357 (2005).
134. Khaskhely, N. M. *et al.* Low-Dose UVB Contributes to Host Resistance against *Leishmania amazonensis* Infection in Mice through Induction of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha Cytokines. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 677 (2002).
135. Chu, N., Thomas, B. N., Patel, S. R. & Buxbaum, L. U. IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 6939–6946 (2010).
136. D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. & Scott, T. UV radiation and the skin. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 12222–12248 (2013).
137. Jeevan, A. & Kripke, M. L. Effect of a single exposure to ultraviolet radiation on *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection in mice. *J. Immunol.* **143**, 2837 (1989).
138. Noonanan, F. P. & Lewis, F. A. UVB-INDUCED IMMUNE SUPPRESSION AND INFECTION WITH SCHISTOSOMA MANSONI. *Photochem. Photobiol.* **61**, 99–105 (1995).
139. Buxbaum, L. U., Uzonna, J. E., Goldschmidt, M. H. & Scott, P. Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3206–3215 (2002).
140. D.R. Mehregan & Mehregan, D. A. Histopathology of cutaneous leishmaniasis. *Gulf J Dermatol Venerol*



- (1997).
141. Grevelink, S. A. & Lerner, E. A. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* (1996).
  142. Ridley, D. S. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. *J Pathol* (1983).
  143. Bryceson, A. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. Clinical and histological features of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1969).
  144. Kurban, A. K. Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol* (1966).
  145. Mansour, L. Histopathological study of different clinical forms of cutaneous leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol* (1993).
  146. Gafar, A. The pathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* (1995).
  147. Ridley, D. S. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1979).
  148. Ridley, D. S. Cutaneous leishmaniasis: immune complex formation and necrosis in the acute phase. *Br J Exp Pathol* (1984).
  149. Ridley, D. S. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Trans. Roy. SOC.Trop. Med. Hyg.* (1980).
  150. Aoun, J. *et al.* Caseating granulomas in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3255–e3255 (2014).
  151. Azadeh, B. Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis due to *L. Tropics*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1985).
  152. Wernersson, S. & Pejler, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 478 (2014).
  153. VILLASEÑOR-CARDOSO, M. I. *et al.* Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite Immunol.* **30**, 425–434 (2008).
  154. Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N. & Wood, J. G. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front. Immunol.* **6**, 620–620 (2016).
  155. da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C. & Oliver, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **62**, 698–738 (2014).
  156. Supajatura, V. *et al.* Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* **109**, 1351–1359 (2002).
  157. Becker, I. *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* **130**, 65–74 (2003).
  158. Grimaldeston, M. A., Simpson, A., Finlay-Jones, J. J. & Hart, P. H. The effect of ultraviolet radiation exposure on the prevalence of mast cells in human skin. *Br. J. Dermatol.* **148**, 300–306 (2003).
  159. Kim, M.-S. *et al.* Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin in vivo. *Br. J. Dermatol.* **160**, 393–402 (2009).
  160. Weber, A., Knop, J. & Maurer, M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br. J. Dermatol.* **148**, 224–228 (2003).

161. Hart, P. H. *et al.* Dermal Mast Cells Determine Susceptibility to Ultraviolet B–induced Systemic Suppression of Contact Hypersensitivity Responses in Mice. *J. Exp. Med.* **187**, 2045 (1998).
162. Chacón-Salinas, R., Limón-Flores, A. Y., Chávez-Blanco, A. D., Gonzalez-Estrada, A. & Ullrich, S. E. Mast Cell-Derived IL-10 Suppresses Germinal Center Formation by Affecting T Follicular Helper Cell Function. *J. Immunol.* **186**, 25 (2011).
163. Guhl, S. *et al.* Bivalent Effect of UV Light on Human Skin Mast Cells—Low-Level Mediator Release at Baseline but Potent Suppression Upon Mast Cell Triggering. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 453–456 (2005).
164. Rodríguez, N. E. & Wilson, M. E. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol. Res.* **59**, 129–141 (2014).
165. Byrne, S. N. *et al.* The alternative complement component factor B regulates UV-induced oedema, systemic suppression of contact and delayed hypersensitivity, and mast cell infiltration into the skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 801–806 (2015).
166. Metz, M., Lammel, V., Gibbs, B. F. & Maurer, M. Inflammatory murine skin responses to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells. *Am. J. Pathol.* **169**, 815–822 (2006).
167. Wille, J. J., Kydonieus, A. F. & Murphy, G. F. cis-Urocanic Acid Induces Mast Cell Degranulation and Release of Preformed TNF-- $\alpha$ : A Possible Mechanism Linking UVB and cis-Urocanic Acid to Immunosuppression of Contact Hypersensitivity. *Skin Pharmacol. Physiol.* **12**, 18–27 (1999).
168. Grimaldeston, M. A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M. & Galli, S. J. Mast cell–derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat. Immunol.* **8**, 1095 (2007).
169. Walterscheid, J. P. *et al.* Cis-urocanic acid, a sunlight-induced immunosuppressive factor, activates immune suppression via the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17420 (2006).
170. Hart, P. H. *et al.* Histamine involvement in UVB- and cis-urocanic acid-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses. *Immunology* **91**, 601–608 (1997).
171. Chung, H. T., Burnham, D. K., Robertson, B., Roberts, L. K. & Daynes, R. A. Involvement of prostaglandins in the immune alterations caused by the exposure of mice to ultraviolet radiation. *J. Immunol.* **137**, 2478 (1986).
172. Holáň, V. *et al.* Urocanic Acid Enhances IL-10 Production in Activated CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* **161**, 3237 (1998).
173. Rivas, J. M. & Ullrich, S. E. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J. Immunol.* **149**, 3865 (1992).
174. Kang, K., Hammerberg, C., Meunier, L. & Cooper, K. D. CD11b<sup>+</sup> macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potently produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein. *J. Immunol.* **153**, 5256 (1994).
175. Walterscheid, J. P., Ullrich, S. E. & Nghiem, D. X. Platelet-activating factor, a molecular sensor for cellular damage, activates systemic immune suppression. *J. Exp. Med.* **195**, 171–179 (2002).
176. Pei, Y. *et al.* Activation of the Epidermal Platelet-Activating Factor Receptor Results in Cytokine and Cyclooxygenase-2 Biosynthesis. *J. Immunol.* **161**, 1954 (1998).
177. Shreedhar, V. K., Pride, M. W., Sun, Y., Kripke, M. L. & Strickland, F. M. Origin and Characteristics of

- Ultraviolet-B Radiation-Induced Suppressor T Lymphocytes. *J. Immunol.* **161**, 1327 (1998).
178. Anderson, C. F. *et al.* IL-10 and TGF- $\beta$  Control the Establishment of Persistent and Transmissible Infections Produced by *Leishmania tropica* in C57BL/6 Mice. *J. Immunol.* **180**, 4090 (2008).
179. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348 (1986).
180. Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V. W. & Ullrich, S. E. A Cytokine Cascade Including Prostaglandin E<sub>2</sub>, IL-4, and IL-10 Is Responsible for UV-Induced Systemic Immune Suppression. *J. Immunol.* **160**, 3783 (1998).
181. Simon, J. C., Hara, H., Denfeld, R. W. & Martin, S. UVB-Irradiated Dendritic Cells Induce Nonproliferating, Regulatory Type T Cells. *Skin Pharmacol. Physiol.* **15**, 330–334 (2002).
182. Mittal, A., Elmet, C. A. & Katiyar, S. K. CD11b<sup>+</sup> Cells are the Major Source of Oxidative Stress in UV Radiation-irradiated Skin: Possible Role in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* **77**, 259–264 (2007).
183. Meunier, L. In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD1-macrophage subset by infiltration and proliferation; CD1<sup>+</sup> Langerhans-like dendritic antigen-presenting cells are concomitantly depleted. *J Invest Dermatol.* (1995).

## **13. Anexos**

### **13.1 Preparación de Soluciones**

#### **13.1.1 PBS pH 7.2-7.4**

- 1- Pesar 8 gramos de NaCl.
- 2- Pesar 0.2 gramos de KCl.
- 3- Pesar 1.44 gramos de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- 4- Pesar 0.24 gramos de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- 5- Agregar 800 ml de agua destilada a un vaso de precipitado de 1 litro junto con los reactivos pesados anteriormente.
- 6- Ajustar pH a 7.2-7.4
- 7- Llevar la solución a 1 litro con agua destilada.

#### **13.1.2 Solución de lavado DWS 1.7%**

- 1- Agregar 1 litro de agua destilada a un vaso de precipitado de 1 litro.
- 2- Agregar 17 mL de detergente para platos.
- 3- Colocar el vaso de precipitado en la plancha magnética, agregar un agitador y disolver.

#### **13.1.3 Formaldehído al 1%**

- 1- En un tubo cónico para centrífuga agregar 270 µL de formaldehído al 37%.
- 2- Posteriormente agregar 9730 µL de agua destilada.

#### **13.1.4 Medio de cultivo suplementado**

- 1- En un sistema de filtrado de vacío de 150 mL agregar 130.5 mL de medio RPMI-1640.
- 2- Posteriormente 15 mL de suero fetal bovino.

3- 4.5 mL antibiótico penicilina-estreptomina.

4- 80  $\mu$ L de ácido clorhídrico fumante al 37%.

5- Filtrar.

### **13.1.5 Gelatina para tratar laminillas**

1- Agregar un litro de agua destilada en un vaso de precipitado de 1 litro.

2- Colocar sobre la plancha digital con magneto y calentar a 45 °C.

3- Agregar 5 gr de gelatina y disolver con la ayuda de un agitador magnético.

4- Una vez disuelta la gelatina, agregar 0.5 gr de  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .

5- Una vez disuelta, filtrar la solución y almacenar a 4 °C.

### **13.1.6 Solución de trabajo (Para dilución limitante)**

1- En un tubo Eppendorf de 5mL agregar 920  $\mu$ L de RPMI estéril.

2- Diluir 80  $\mu$ L de enzima “Liberase TL Research Grade”.

### **13.1.7 Buffer de dilución del anticuerpo primario (Para Inmunohistoquímica)**

1- En un tubo cónico de centrifuga de 50 mL agregar 10 mL de PBS pH 7.2-7.4 estéril.

2- Pesar 0.05 gramos de albúmina sérica bovina.

3- Pesar 0.025 gramos de azida de sodio.

4- Agregarlos al tubo cónico, diluir y almacenar a 4 °C.

### **13.1.8 Buffer de dilución del anticuerpo secundario (Para Inmunohistoquímica)**

1- Diluir un sobre de PBS en polvo en 1 litro de agua bidestilada y ajustar el pH a 7.2-7.4.

### **13.1.9 Buffer de Bloqueo peroxidasa (Para IHQ; anticuerpos: CD4, CD8)**

- 1- En un carril para tinción agregar 247.5 mL de PBS.
- 2- Posteriormente 2.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

### **13.1.10 Buffer de Bloqueo peroxidasa (Para IHQ; anticuerpos: IL-10, MOMA2, IFN- $\gamma$ )**

- 1- En un carril para tinción agregar 247.5 mL de Metanol.
- 2- Posteriormente 2.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

### **13.1.11 Buffer de Bloqueo suero humano (Para IHQ)**

- 1- En un tubo cónico de centrifuga de 15 mL agregar 9.5 mL de PBS pH 7.2-7.4
- 2- Pesar 0.1g de albúmina sérica bovina.
- 3- Pesar 0.01g de gelatina de pescado.
- 4- Pesar 0.005g de azida de sodio.
- 5- Agregar los reactivos al tubo cónico.
- 6- agregar 500  $\mu$ L de suero humano.
- 7- Posteriormente 5  $\mu$ L de Tween 20.
- 8- Almacenar a 4 °C.

### **13.1.12 Anticuerpo primario para inmunohistoquímica (IL-10 1:200, IFN 1:250, MOMA2 1:250, CD4 1:200 y CD8 1:200)**

- 1- Calcular el número de laminillas que se van a marcar con el anticuerpo y prepararlo en una dilución de 1:200 o 1:250 según sea el anticuerpo, utilizando el buffer de anticuerpo primario. Tomar en cuenta que se añadirán 150  $\mu$ L por corte.

### **13.1.13 Anticuerpo secundario (1:2000) – Biotin-SP-conjugateGoat Anti-Rat IgG**

1- Calcular el número de laminillas que se van a marcar con el anticuerpo y prepararlo en una dilución de 1:2000 utilizando el buffer de anticuerpo secundario. Tomar en cuenta que se añadirán 200  $\mu$ L por corte.

### **13.1.14 Strep-HRP (1 $\mu$ g/mL) – Peroxidase-conjugated Streptavidin**

1- Calcular el número de laminillas que se van a marcar y prepararlo en una dilución de 1:1000 utilizando PBS. Tomar en cuenta que se añadirán 200  $\mu$ L por corte. Proteger de la luz.

### **13.1.15 Solución Sustrato-Cromógeno – ImmPACT SG**

Dependiendo el número de laminillas (150  $\mu$ L por corte) se calcula para 5mL del diluyente:

- 1- 90  $\mu$ L del reactivo 1.
- 2- 120  $\mu$ L del reactivo 2.
- 3- Dar vortex.

## 13.2 Software para análisis de resultados de carga parasitaria por dilución limitante.

1. Abrir una plantilla de Excel llamada *Parasite Load Calculation*, que debe de lucir exactamente como se muestra en la imagen. Originalmente obsequiada por el Dr. Lawrence Buxbaum de la Universidad de Pensilvania (buxbaum17@hotmail.com) y actualmente ubicada en archivo: Google Drive/Mayra Alejandra Rodríguez Serrato/Protocolos.

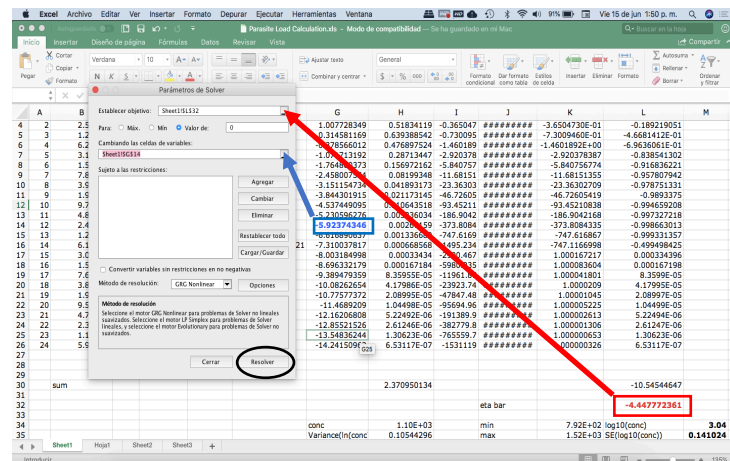
2. En la columna D se coloca el número de pocillos sin parásitos (marcados como negativo) correspondiente a cada dilución, recordar que cada dilución esta por cuadruplicado.
3. De acuerdo con la lectura del paso 22, la plantilla de Excel quedaría de la siguiente manera:

4. Seleccionar la pestaña de Herramientas y posteriormente “Solver...”

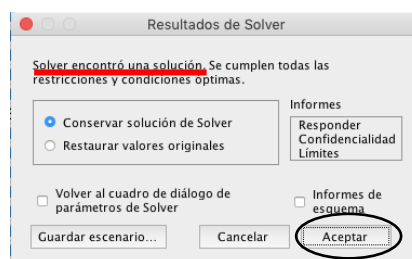


row #	dil	n	r(# sterile)	p (r/n)	w1	eta(0)	eta(1)	eta	w*eta	
1	1	5.00E-03	4	0	17553	0.135813884	-0.182524	43.540130043	-0.182236449	-0.022967313
2	2	2.50E-03	4	0	18349	0.51834119	-0.365047	#####	-3.6504730E-01	-0.189219051
3	3	1.25E-03	4	0	81169	0.639388542	-0.730095	#####	-7.3009460E-01	-4.6681412E-01
4	4	6.25E-04	4	0	3021	0.476897524	-1.460189	#####	-1.4601892E-00	-6.9630516E-01
5	5	3.12E-04	4	0	13192	0.28713447	-2.920378	#####	-2.920378387	-0.838541302
6	6	1.56E-04	4	0	30373	0.156972162	-5.840757	#####	-5.840756774	-0.916836221
7	7	7.81E-05	4	0	37554	0.08199348	-11.68151	#####	-11.68151355	-0.957807942
8	8	3.91E-05	4	0	14734	0.041893173	-23.36303	#####	-23.36302709	-0.978751331
9	9	1.95E-05	4	0	#####	#####	#####	#####	#####	#####
10	10	9.77E-06	4	0	#####	#####	#####	#####	#####	#####
11	11	4.88E-06	4	0	#####	#####	#####	#####	#####	#####
12	12	2.44E-06	4	0	#####	#####	#####	#####	#####	#####
13	13	1.22E-06	4	0	#####	#####	#####	#####	#####	#####
14	14	6.10E-07	4	2	0.5	-0.366512921	-7.310037817	0.000668568	-1495.234	-747.1166998
15	15	3.05E-07	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
16	16	1.52E-07	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
17	17	7.63E-08	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
18	18	3.81E-08	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
19	19	1.91E-08	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
20	20	9.54E-09	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
21	21	4.77E-09	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
22	22	2.38E-09	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
23	23	1.19E-09	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
24	24	5.96E-10	4	4	1	#####	#####	#####	#####	#####
sum						2.370950134				-10.54544647
eta bar										-4.447772361

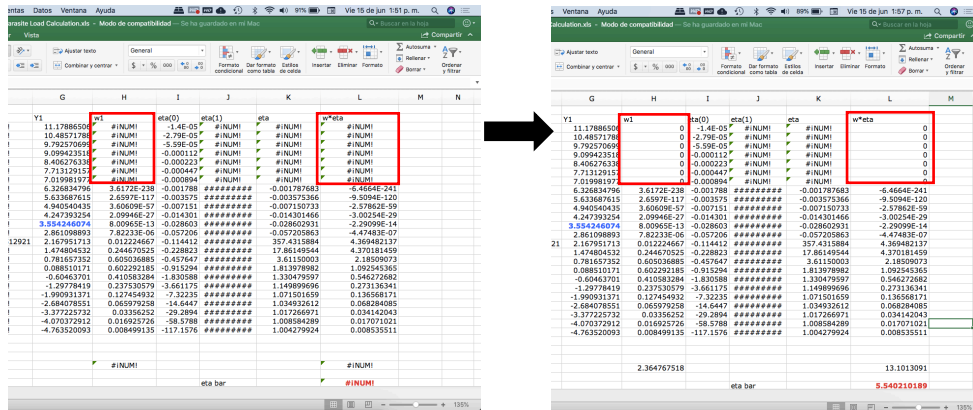
5. Aparecerá el recuadro: “Parámetros de Solver”. Se seleccionan las casillas correspondientes a cada recuadro, el número rojo en **Establecer objetivo**, y el numero azul en **Cambiando las celdas de variables**. Dar click en: Resolver.



6. Aparecerá el recuadro” “**Solver encontró una solución**”. Dar click en: Aceptar



7. Si en las columnas  $w1$  y  $w^*eta$  aparece  $\#;NUM!$  se deben cambiar esas casillas a cero



8. Finalmente se observan los resultados, la concentración total de parásitos, y el valor de  $\log_{10}$ , señalados se señalan en los recuadros rojos.

	2.364767518				13.1013091
			eta bar		5.540210189
conc	1.43E+07	min		1.03E+07	log10(conc)
Variance(ln(conc))	0.105718638	max		1.98E+07	SE(log10(conc))
SE(ln(conc))	0.325144026				7.16

9. Este procedimiento se realiza para cada lesión individualmente.

### 13.3 Tratamiento de laminillas

1. Preparar 1 litro de gelatina para tratar laminillas de la manera previamente descrita.
2. Asegurarse que la gelatina esté a temperatura ambiente.
3. Preparar 3 cubas de vidrio para tinción: en una cuba agregar 1 litro de gelatina para tratar laminillas, en otra 1 litro de agua destilada y en la tercera un 1 litro con solución DWS 1.7%.
4. Colocar las laminillas a tratar en una canastilla para 50 laminillas.
5. Lavar las laminillas en la cuba con solución DWS 1.7% durante 2 minutos.
6. Enjuagar las laminillas con abundante agua corriente hasta remover todo el jabón.
7. Enjuagar en la cuba con agua destilada.

8. Sumergir la canastilla en la solución de gelatina evitando la formación de burbujas. Sumergir 5 veces, 5 segundos cada vez.
9. Escurrir el exceso de líquido, guardar las laminillas en algún contenedor y cubrirlas del polvo. Se dejan secar 48 horas.

### 13.4 Formato para seguimiento de lesión

Día de evolución: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Grupo 1	Peso	Mitutoyo	Vernier			Elipsoide
			Eje x	Eje y	Eje z	XYZ * 0.5236
Ratón 1						
Ratón 2						
Ratón 3						
Ratón 4						
Ratón 5						

Grupo 2	Peso	Mitutoyo	Vernier			Elipsoide
			Eje x	Eje y	Eje z	XYZ * 0.5236
Ratón 1						
Ratón 2						
Ratón 3						
Ratón 4						
Ratón 5						

Grupo 3	Peso	Mitutoyo	Vernier			Elipsoide
			Eje x	Eje y	Eje z	XYZ * 0.5236
Ratón 1						
Ratón 2						
Ratón 3						
Ratón 4						
Ratón 5						

## 13.5 Cuestionario de antecedentes médicos para empleados/afiliados con exposición a animales de investigación.

Por favor complete este formulario, junto con el formulario A (Cuestionario de Evaluación del Riesgo en el Trabajo)

Para proteger su privacidad, ponga los formularios en un sobre sellado.

Cumpliendo con lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 Numeral 10.5.1-10.5.6 se solicita que todo el personal que esté en contacto con animales de investigación o que ingrese al bioterio, completar este cuestionario para identificar recomendaciones de salud y seguridad

### Cuestionario de Antecedentes Médicos para Empleados/Afiliados con Exposición a Animales de Investigación

**Propósito:** Los empleados que trabajan con animales de investigación o que ingresan al bioterio deben completar este cuestionario para identificar recomendaciones de salud y seguridad aplicables. Sus respuestas son confidenciales. Los investigadores con contacto indirecto con animales pueden optar por completar el cuestionario. El propósito de las siguientes preguntas es determinar si usted tiene alguna necesidad de salud especial para trabajar con seguridad con los animales. Un riesgo común para la salud incluye alergias o hipersensibilidades respiratorias que pueden ser causadas o agravadas por el trabajo alrededor de los animales. Las condiciones crónicas de salud, el embarazo o las deficiencias del sistema inmunológico pueden aumentar el riesgo de infección por los animales (enfermedad zoonótica) o agentes infecciosos utilizados en animales. La exposición química de los animales tratados también puede presentar riesgos adicionales durante el embarazo o para ciertos trastornos respiratorios o crónicos de la salud. Basado en sus respuestas, se proporcionarán recomendaciones médicas para reducir el riesgo de efectos indeseables para la salud y pueden incluir el uso de equipo de protección personal adicional o la modificación de los procedimientos de trabajo. En algunos casos, la evaluación médica adicional será indicada.

**Instrucciones:** Por favor complete este formulario y firme abajo. También debe llenar el formulario A. Para proteger su privacidad, por favor, coloque ambos formularios en un sobre sellado y entréguelo a la autoridad pertinente. Se requiere recibo de ambos formularios para obtener permiso médico para trabajar con o alrededor de animales de investigación.

Nombre:	Fecha de nacimiento:
Género: ___masculino ___femenino	

1. Enliste los animales con los que usted estará trabajando: \_\_\_\_\_
2. Fecha del último refuerzo de la vacuna contra el tétanos: \_\_\_\_\_
3. Si va a trabajar con sangre humana/tejidos/células/líneas celulares en animales, ¿Ha recibido un esquema de vacunación contra Hepatitis B? Sí \_\_\_ No \_\_\_ **En caso afirmativo:** a) Liste las fechas y adjunte el registro de vacunación: \_\_\_\_\_ b) Si se realizó el título de anticuerpos después de la vacunación, indique la fecha: \_\_\_\_\_ Resultado del título (adjuntar registro): \_\_\_\_\_ No realizado \_\_\_\_\_

#### 4. ¿Padece de alguna de las siguientes condiciones médicas?

Antecedentes Personales Patológicos y no Patológicos del Sistema Respiratorio y Alergias			
Sí	No	Sí	No
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Asma u otra enfermedad respiratoria crónica		Condiciones de la piel como eccema, psoriasis o dermatitis.	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Reacciones alérgicas de la piel tales como urticaria, ronchas o comezón. En caso afirmativo, explique:	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Alergias animales conocidas o sospechadas. <b>Círcule cualquier reacción(es) relacionada con los animales:</b> nariz congestionada, rinorrea, picazón en los ojos, estornudos, tos, sibilancias, opresión en el pecho, dificultad para respirar, urticaria, erupción cutánea, hinchazón de la garganta. <b>En caso afirmativo, enliste el/los animal(es):</b>	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Alergias conocidas o sospechadas a productos químicos, látex, alimentos o ambiente. En caso afirmativo, favor de enlistar:	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	¿Actualmente está usando protección respiratoria o máscara?	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	En caso afirmativo, ¿Ha sido sometido a prueba de ajuste? Indique el tipo de respirador/máscara que está usando:	
Antecedentes Personales Patológicos y no Patológicos del Sistema Inmunológico y Metabólicos			
Sí	No	Sí	No
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Condiciones crónicas de salud como diabetes		Enfermedad renal o hepática	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enfermedad cardíaca valvular		Antecedentes de problemas del bazo o ausencia de bazo.	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Embarazada o planeando quedar embarazada	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Deficiencias en el sistema inmunológico u otras limitaciones a su capacidad para combatir enfermedades o infecciones (por ejemplo: cáncer, lupus, trasplante de órganos, infección por VIH, infecciones crónicas). <b>En caso afirmativo, favor de enlistar:</b>	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Medicamentos o tratamientos actuales que pueden suprimir su sistema inmunológico (por ejemplo: uso de esteroides, prednisona, terapia contra el cáncer, radioterapia) <b>En caso afirmativo, favor de enlistar:</b>	

### **13.6 Instructivo para extracción de órganos linfoides.**

La obtención de órganos linfoides de un animal de experimentación, para su cultivo, aislamiento de poblaciones celulares o prueba directa es uno de los procedimientos más simples y más frecuentemente utilizados en inmunología.

La selección del método o forma de eutanasia y el agente que será utilizado necesita ser tomado en consideración de acuerdo con la naturaleza y requerimientos del estudio experimental. Es absolutamente necesario seleccionar un método que cause el menor sufrimiento a los animales.

La muerte se debe inducir de manera humanitaria con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo y durante el procedimiento; para lograrlo cualquier técnica aplicada debe causar en el animal: rápida inconsciencia, paro cardíaco y/o respiratorio y pérdida de la función cerebral. Además, debe reducir al mínimo la perturbación emocional, la incomodidad y/o el sufrimiento experimentado por la persona que lleve a cabo el procedimiento.

#### **Selección de método de eutanasia**

No existe un solo método de eutanasia que se aplique a todas las especies y a todas las circunstancias. Los criterios para seleccionarlo deberán incluir: la compatibilidad con los propósitos del protocolo experimental; la capacidad de producir inconsciencia y muerte rápidamente; su confiabilidad; y seguridad para el personal. La responsabilidad de la selección del método de eutanasia recae en el investigador y/o el Médico Veterinario responsable.

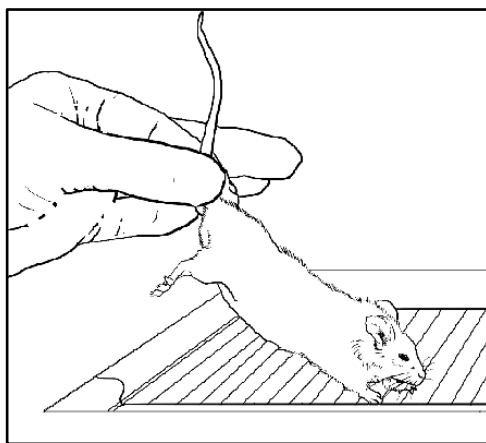
El método seleccionado para la eutanasia depende de varios factores, entre los que destacan la naturaleza del estudio, la especie animal involucrada y su número. Dependiendo de la especie, el procedimiento debe ser individual. Sin importar el tipo de grupo animal destinado para eutanasia se establece que el procedimiento seleccionado debe cumplir invariablemente con lo siguiente:

- Inducir la muerte sin producir signos de pánico o ansiedad en los sujetos.
- Inducir la inconsciencia de los animales en un tiempo mínimo.
- Ser un método confiable y reproducible.
- Ser seguro para el personal involucrado.
- Poseer compatibilidad con los requerimientos y el propósito del estudio.
- Tener un impacto ambiental mínimo.
- Ser a prueba de fallas.
- Localizarse en un sitio apartado de los cuartos de animales.

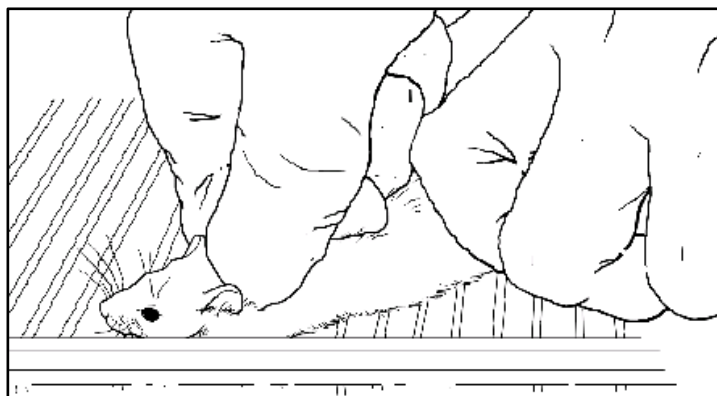
Cuando el forcejeo durante la captura o la inmovilización cause dolor, lesiones o ansiedad en el animal o peligro para el operador, debe considerarse el uso de tranquilizantes, analgésicos y/o fármacos inmovilizantes. Cuando se lleve a cabo la eutanasia no deben estar presentes otros animales, con excepción de grupos que mueran al mismo tiempo.

### **Dislocación cervical**

Según la NOM-062-ZOO-1999, la dislocación cervical manual ejecutada apropiadamente induce inconsciencia rápidamente, se aplica porque no contamina los tejidos con sustancias químicas. Se acepta su aplicación en: ratones y ratas que pesen menos de 200 gr y conejos que pesen menos de 1 kg. En la rata y ratón, se toma al animal por la base de la cola con una mano para su acomodo y se coloca sobre una superficie donde el animal se sostenga (**Imagen 1**). Traccionar con la mano que sujeta la base de la cola en dirección caudal y empujar con la mano que sujeta la base del cráneo en dirección craneal al mismo tiempo de manera firme y contundente para ocasionar la dislocación cervical (**Imagen 2**).



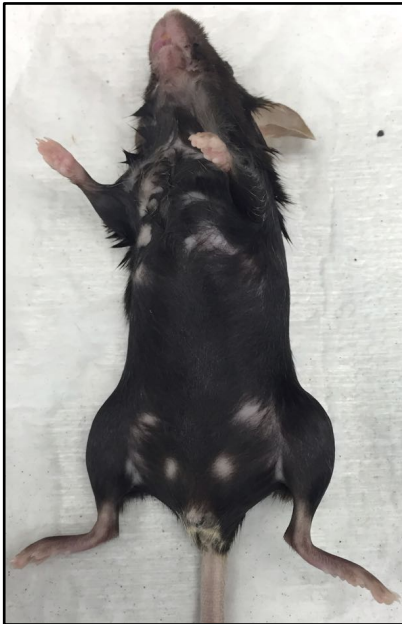
**Imagen 1**



**Imagen 2**

## Disección

Una vez sacrificado el animal, se coloca en posición de decúbito supino sobre la tabla de disección (**Imagen 3**) y se clavan sus cuatro extremidades extendidas con alfileres o agujas (**Imagen 4**).



**Imagen 3**



**Imagen 4**

Se localiza el orificio del prepucio en el macho o el orificio urinario en la hembra (**Imagen 5**). Con la ayuda de unas pinzas operadas con la mano no dominante, se realiza un corte con tijera a medio centímetro de distancia del prepucio/orificio urinario en dirección craneal (**Imagen 6**). El corte se realiza siguiendo la línea media del ratón en dirección craneal (**Imagen 7**).



**Imagen 5**



**Imagen 6**

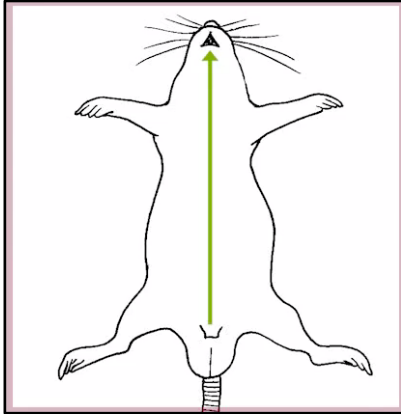


Imagen 7

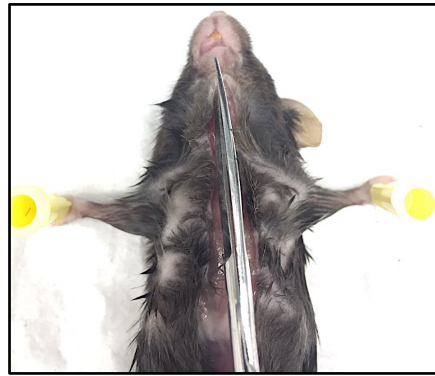


Imagen 8



Imagen 9

La incisión realizada con las tijeras debe continuar siguiendo la línea media hasta la barbilla del ratón (**Imagen 7, 8 y 9**). Partiendo de la incisión central a la altura de las extremidades, se realizan 4 cortes laterales (**Imagen 10**). Los cortes se realizan a la altura y en dirección de las patas delanteras y a la altura y dirección de las patas traseras comenzando a partir de la incisión central (**Imagen 10 y 11**).

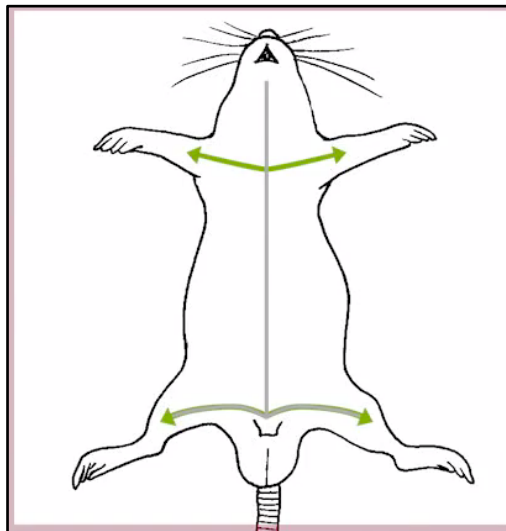


Imagen 10



Imagen 11

Una vez realizada la incisión central y los cortes periféricos, se separa o disecciona la piel de la capa muscular subyacente con la ayuda de un separador (en caso de no contar con uno, es válido utilizar el mango de un bisturí). Esto se realiza tomando la piel con unas pinzas operadas con la mano no dominante y tirando gentil pero firmemente en dirección opuesta a su adherencia muscular, mientras que con la mano dominante se utiliza el mango o separador para separar sin romper esta adherencia en sentido contrario (**Imagen 12**). Una vez separada la piel del músculo, se pincha la piel de sus bordes libres a la tabla de



dissección utilizando alfileres o agujas (**Imagen 13**). Esto también se puede realizar en la base de la cabeza en caso de que se desee visualizar u obtener las glándulas salivales, músculos de la masticación (masetero o digástrico), laringe, tráquea o glándula tiroides.

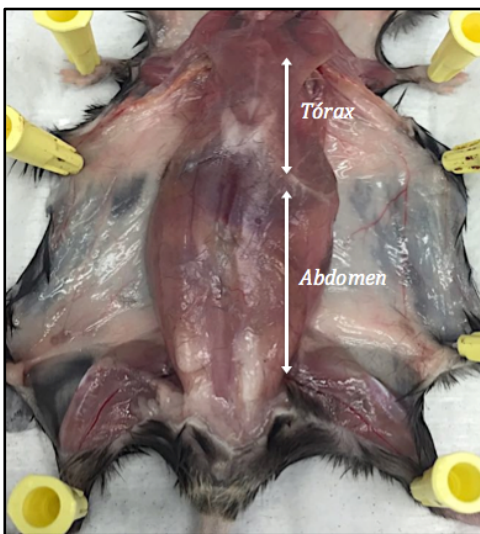


**Imagen 12**

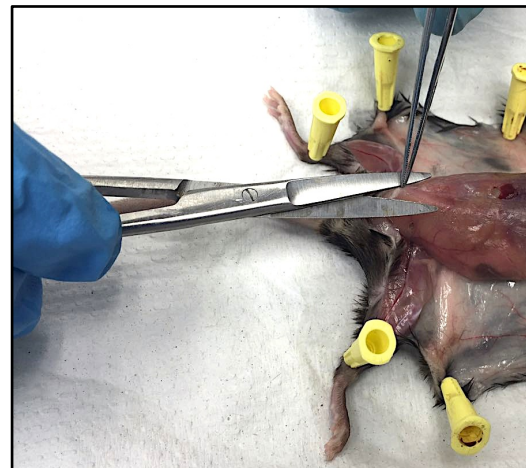


**Imagen 13**

A nivel del tronco identificamos 2 regiones, el tórax y el abdomen (**Imagen 14**). La cavidad abdominal debe abrirse para poder obtener los órganos deseados.



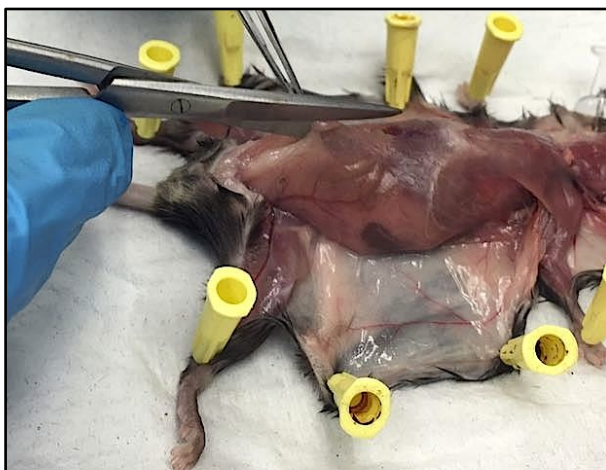
**Imagen 14**



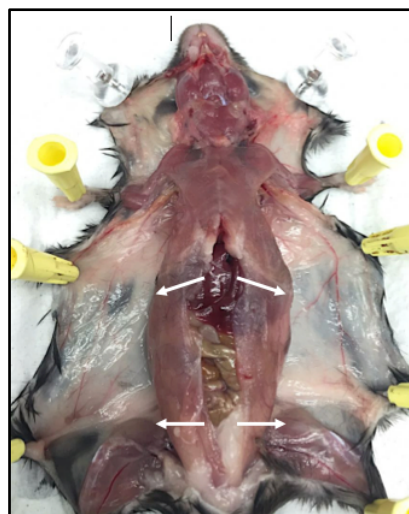
**Imagen 15**

Para esto, debemos levantar los músculos abdominales con una pinza operada con la mano no dominante y al mismo tiempo utilizando unas tijeras en una posición de corte horizontal, realizar un pequeño corte. (**Imagen 15**). Una vez realizado el corte, procedemos a cortar los músculos de la pared anterior del

abdomen siguiendo la línea media del ratón en dirección craneal hasta la base del tórax. Este corte se realiza con las tijeras en posición de corte vertical (**Imagen 16**).

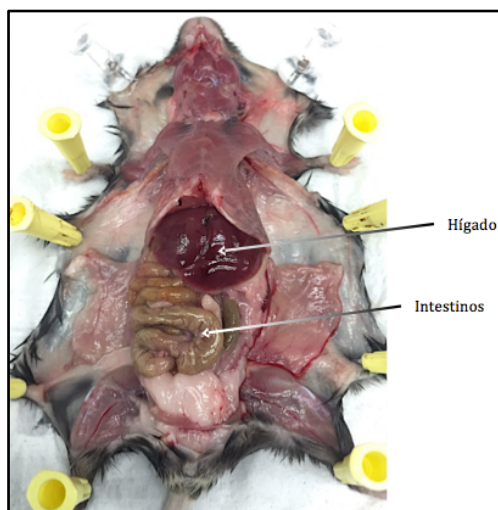


**Imagen 16**

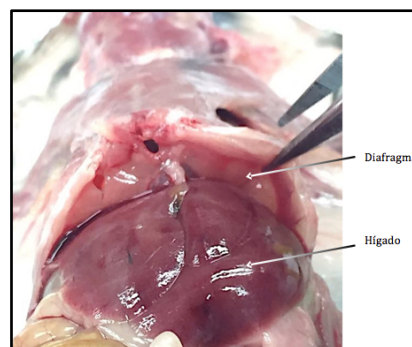


**Imagen 17**

A través del corte sagital podemos observar los órganos de la cavidad abdominal. Ahora debemos realizar cortes transversales de los músculos para poder ampliar nuestra área de acceso a dichos órganos. A partir de los extremos superior e inferior de la incisión, realizamos nuevamente y con mucho cuidado 4 cortes partiendo de la línea media hacia los lados (**Imagen 17**). Posterior a los cortes transversales de los músculos abdominales logramos el acceso y visualización casi total a la cavidad abdominal y órganos abdominales (**Imagen 18**). Es opcional fijar los músculos con agujas o jeringas para que la cavidad permanezca abierta.

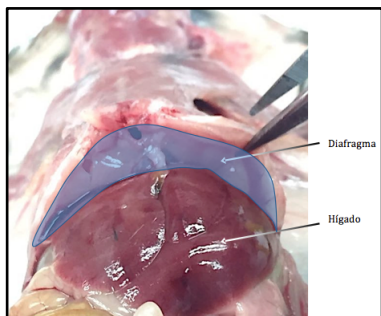


**Imagen 18**

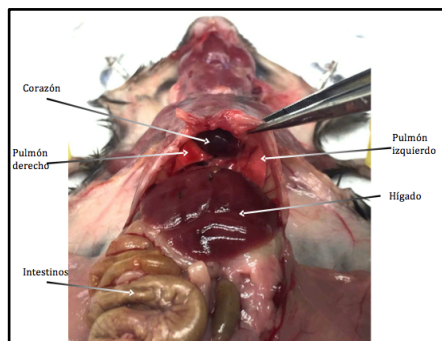


**Imagen 19**

Desde este momento el hígado y parte de los intestinos se encuentran visibles. En el límite superior de la cavidad abdominal se encuentra un músculo bien desarrollado que separa la cavidad abdominal de la cavidad torácica, el diafragma (**Imagen 19**). En la región anterior el diafragma se inserta en el arco costal y en la apófisis xifoides del esternón. Es necesario cortar el diafragma para acceder a la cavidad torácica, el corte se realiza siguiendo su inserción en el arco costal (**Imagen 20**).



**Imagen 20**

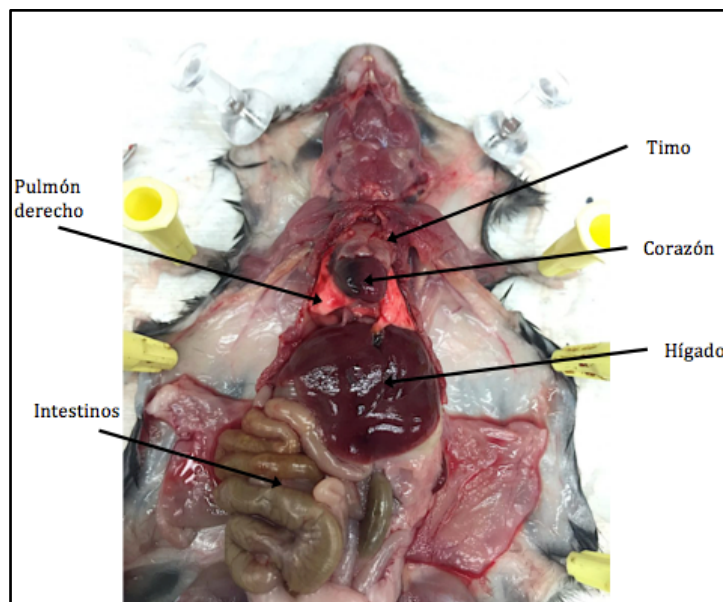


**Imagen 21**



**Imagen 22**

Una vez retirado el diafragma se puede observar el contenido de la cavidad torácica (**Imagen 21**). Para tener fácil acceso a los órganos de la cavidad torácica se debe remover el esternón y la parrilla costal. Esto se realiza haciendo un corte a través de la línea media en dirección craneal hasta la base de la cabeza (**Imagen 22**). Es muy importante introducir una guía metálica o tener cuidado de no dañar los órganos al cortar el esternón. Posterior a esto se retira la parrilla costal cortando las costillas lo más cercano a la columna vertebral posible. Tras removida la parrilla costal, se logra el acceso a los órganos de la cavidad torácica (**Imagen 23**).



**Imagen 23**