

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR  
LINFOCITOS B EN LA LEISHMANIOSIS CUTÁNEA CAUSADA POR  
*L. mexicana* EN UN MODELO MURINO DE INMUNOSUPRESIÓN CON LUZ UVB**

**Tesis presentada por:**

**MAYRA ALEJANDRA RODRÍGUEZ SERRATO**

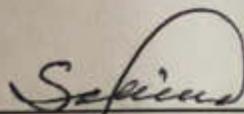
**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

**JULIO 2021**

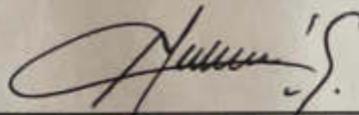
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR LINFOCITOS B EN LA  
LEISHMANIOSIS CUTÁNEA CAUSADA POR *L. mexicana* EN UN MODELO MURINO  
DE INMUNOSUPRESIÓN CON LUZ UVB

Aprobación de Tesis



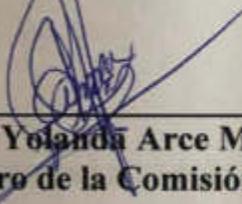
---

**Dr. C. Mario César Salinas Carmona**  
Director de Tesis



---

**Dr. med. Carlos Eduardo Medina de la Garza**  
Co-Director



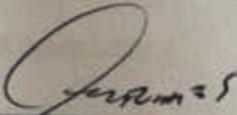
---

**Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza**  
Miembro de la Comisión



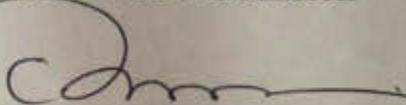
---

**Dra. C. Anna Velja Vázquez Marmolejo**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR LINFOCITOS B EN LA  
LEISHMANIOSIS CUTÁNEA CAUSADA POR *L. mexicana* EN UN MODELO MURINO  
DE INMUNOSUPRESIÓN CON LUZ UVB**

Presentado por:

**M.C. MAYRA ALEJANDRA RODRÍGUEZ SERRATO**

Este trabajo se realizó en el Servicio y Departamento de Inmunología, Facultad de  
Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del  
Dr. C. Mario César Salinas Carmona

---

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

## DEDICATORIA

*A ti te debo todo mamá, te debo la vida.  
Tuviste tanta paciencia conmigo, que me faltan momentos para agradecerte todo lo que has  
hecho conmigo y para mí. Te lo he dicho millones de veces pero quizá no tantas como lo  
mereces, si pudiese elegir siempre te escogería a ti, gracias por todos los valores que me  
aportaste y me sigues aportando en la vida, gracias por ser mi madre.  
Te amo mucho, te amo todo lo que puedo amarte y mucho más.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre que siempre me apoyo en mis decisiones y fue la primera en creer en mí, a pesar de las preocupaciones que le cause por estar en una ciudad extraña y lejos de la familia. Muchas gracias, mamá.

A mis hermanos que siempre estuvieron al pendiente de mí.

A mi pequeño pero incondicional grupo de amigas Kathy, Johana y en especial a Clarissa por escucharme, apoyarme, aconsejarme y estar para mí en los momentos mas difíciles.

A todos los miembros de mi comisión de tesis, en especial a la Dra. Aya que no solo me apoyo profesionalmente, si no también personalmente.

A todo el personal del Departamento de Inmunología que directa o indirectamente apoyaron a la realización de este trabajo.

Al Consejo nacional de ciencia y tecnología CONACYT por la beca que permitió la realización de mi Doctorado por cuatro años.

A mi personita especial L.A.R.R. por llegar y coincidir en el mejor momento, y devolverme las ganas de seguir adelante. Por cada momento que me regalas y la oportunidad de guardar infinidad de recuerdos a tu lado. Te amo.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1 Introducción	1
1.1 Leishmaniosis	1
1.1.1 Generalidades	2
1.1.2 Formas Clínicas de la Enfermedad	2
1.1.2.1 Leishmaniosis Visceral	2
1.1.2.2 Leishmaniosis Dérmica Post-kala-azar	2
1.1.2.3 Leishmaniosis Mucocutánea	2
1.1.2.4 Leishmaniosis Cutánea	3
1.1.3 Tratamiento	3
1.2 Radiación UV	4
1.2.1 Radiación UVA	5
1.2.2 Radiación UVB	5
1.2.3 Radiación UVC	5
1.3 IL-10	6
1.3.1 Leishmania e IL-10	6
1.3.2 Radiación UVB e IL-10	7
1.4 Linfocitos B	8
1.4.1 Linfocitos B y Leishmania	9
1.4.2 Linfocitos B y radiación UVB	12
1.5 Objetivos	13
1.5.1 Objetivo general	13
1.5.2 Objetivos específicos	13
1.6 Justificación	14
2 Materiales y métodos	15
2.1 Materiales	15
2.1.1 Reactivos	15
2.1.2 Equipos	16

2.1.3 Instrumental	17
2.1.3 Soluciones	17
2.2 Métodos	18
2.2.1 Ratones	18
2.2.1.1 Monitoreo	18
2.2.1.2 Eutanasia	18
2.2.1.3 Anestesia	18
2.2.1.3 Infección	19
2.2.2 Obtención del antígeno FTA <sub>g</sub>	19
2.2.3 Estandarización del ensayo de DTH (delayed type hypersensitive)	20
2.2.4 Estandarización de la dosis UVB	22
2.2.5 Infección con <i>L. mexicana</i> en ratones suprimidos con luz UVB	22
2.2.6 Determinación de la carga parasitaria	23
2.2.7 Determinación de anticuerpos séricos anti- <i>L. mexicana</i>	24
2.2.8 Análisis de los centros germinales en los ganglios linfáticos	24
2.2.9 Cuantificación de células CD19+ por citometría de flujo	25
2.2.10 Expresión relativa de T-bet, GATA3, IFN- $\gamma$ , IL12, IL10 e IL4	25
2.2.10.1 Extracción de ARN	25
2.2.10.2 Precipitación de ARN	26
2.2.10.3 Reacción de retro-transcripción	26
2.2.10.4 Reacción de qPCR	26
2.2.10.5 Determinación de los niveles de expresión	27
2.2.11 Procesamiento de los datos	28
3 Resultados	29
3.1 Parásitos de <i>L. mexicana</i>	29
3.1.1 Ambientación y extracción de parásitos de la pata de ratones infectados	29
3.2 Estandarización del ensayo de DTH	30
3.3 Estandarización de la tinción de H&E	31
3.4 Estandarización de inmunohistoquímica para IL10	33
3.5 Estandarización de azul de toluidina para mastocitos en ganglios linfáticos	36
3.6 Determinación de anticuerpos anti- <i>L. mexicana</i>	37

3.7 Lesión y carga de parásitos	41
3.8 Expresión de T-bet, GATA3, IFN- $\gamma$ , IL12, IL10 e IL4	45
3.9 Reacción de centro germinal	45
3.10 Cuantificación de linfocitos B	48
4 Discusión	49
Conclusión	53
Anexos	54
Referencias bibliográficas	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
Figura 1	Modelo de unión IgG-Fc $\gamma$ R	8
Figura 2	Imagen modificada	11
Figura 3	Diagrama DTH	21
Figura 4	Formato de registro para las mediciones del ensayo de DTH	21
Figura 5	Diseño experimental	23
Figura 6	Cultivo de parásitos extraídos de la pata de ratones C57BL/6	30
Figura 7	Tiempo de induración y concentración del antígeno en el ensayo de DTH	31
Figura 8	Corte histológico de oreja teñido con H&E	32
Figura 9	Dosis mínima necesaria para suprimir la respuesta de DTH	33
Figura 10	Corte de bazo y piel teñido con H&E	34
Figura 11	Inmunohistoquímica de IL10 en ganglio y piel	35
Figura 12	Identificación de mastocitos en ganglios linfáticos	36
Figura 13	Buffers de dilución	37
Figura 14	Concentración de antígeno en diferentes buffers	38
Figura 15	Titulación y punto de corte	39
Figura 16	Dilución de anticuerpo primario	40
Figura 17	Los ratones irradiados mostraron títulos más altos de IgG1	42
Figura 18	La radiación UVB aumenta la infección por <i>L. mexicana</i>	43
Figura 19	Correlación entre la carga de parásitos y el tamaño de la lesión	44
Figura 20	Expresión de factores asociados a la respuesta Th1 y Th2	46
Figura 21	Centros germinales	47
Figura 22	Cuantificación de linfocitos B	48

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Leishmaniosis

#### 1.1.1 Descripción General

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades causadas por parásitos protozoarios de más de 20 especies de *Leishmania*. Estos parásitos se transmiten a los seres humanos por la picadura de una mosca hembra infectada, un pequeño insecto vector de 2 a 3 mm de largo<sup>1</sup>. Hay tres formas principales de la enfermedad: leishmaniosis cutánea (CL) la forma más común de la enfermedad, leishmaniosis visceral (LV), también conocida como kala-azar la forma más grave, y leishmaniosis mucocutánea (MCL) la forma más deformante<sup>2</sup>. La mayoría de las personas que se infectan con el parásito no desarrollan ningún síntoma durante su vida. Por lo tanto, el término leishmaniosis se refiere a la condición de enfermarse debido a una infección por el protozoario *Leishmania*, no a estar infectado con el parásito. Hoy en día, más de mil millones de personas viven en áreas endémicas de leishmaniosis y están en riesgo de infección; se estima que se producen anualmente 30 000 casos nuevos de LV y más de 1 millón de CL<sup>3</sup>. La Leishmaniosis cutánea es la forma más común de la enfermedad; produce úlceras en las partes expuestas del cuerpo, como la cara, los brazos y las piernas, estas úlceras son autolimitadas y dejan cicatrices permanentes que a menudo son causa de prejuicios sociales. De acuerdo con el informe epidemiológico de las Américas publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en abril del 2019, se presentaron 479 nuevos casos de leishmaniosis en México, de los cuales 478 fueron cutáneos causados principalmente por *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*). La incidencia de acuerdo al grupo de edad

fue en varones de más de 10 años y la mayor densidad de casos por cada 100 km<sup>2</sup> ocurrió en los estados de Oaxaca, Tabasco y Quintana Roo<sup>4</sup>.

## **1.1.2 Formas clínicas de la enfermedad**

### **1.1.2.1 Leishmaniosis Visceral**

La LV se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida sustancial de peso, inflamación del bazo y del hígado y anemia grave. Si la enfermedad no se trata, la mortalidad puede llegar al 100% en 2 años<sup>5-7</sup>.

### **1.1.2.2 Leishmaniasis dérmica post-kala-azar**

La leishmaniasis dérmica post-kala-azar (PKDL), es una complicación de la LV y se observa principalmente en África Oriental y Asia Sudoriental. Se caracteriza por una erupción cutánea plana, decolorada, combinada con una erupción maculopapular o nodular, en pacientes que se han recuperado de LV. Suele aparecer de 6 meses a 1 ó más años después de la aparente curación de la LV, pero puede ocurrir antes o incluso al mismo tiempo que la LV, especialmente en Sudán. La PKDL se cura espontáneamente en la mayoría de los casos en África, pero rara vez en pacientes en la India<sup>6-8</sup>.

### **1.1.2.3 Leishmaniosis mucocutánea**

El MCL produce lesiones que pueden destruir parcial o totalmente las membranas mucosas de las cavidades de la nariz, boca y garganta y los tejidos circundantes. Esta forma incapacitante también puede conducir a la exclusión social. El sitio inicial y más frecuentemente afectado es la mucosa del tabique nasal, que puede progresar hasta perforarse. El proceso puede extenderse al paladar y

faringe; la úvula se infiltra, se hipertrofia y luego se amputa. Cuando afecta a la nariz se puede presentar obstrucción, sangrado, secreción nasal y la aparición de costras y heridas. El compromiso de la laringe y la faringe puede ocasionar dolor, ronquera, disfonía y disfagia<sup>6,7,9</sup>.

#### **1.1.2.4 Leishmaniosis Cutánea**

Las personas con LC tienen una o más lesiones en la piel y las úlceras pueden cambiar de tamaño y apariencia con el tiempo. El período de incubación en los seres humanos es de 2 a 3 meses en promedio, pero puede tener períodos de incubación más cortos (2 semanas) o más largos (dos años). Las lesiones pueden comenzar como una pápula que evoluciona a nódulo redondeado, indoloro, que aumenta progresivamente de tamaño y se ulcera. Inicialmente las úlceras están cubiertas por una costra y al desprenderse, se observa la lesión típica de fondo limpio, color rosado y tejido granuloso, redondeada, de bordes regulares y elevados, indolora y de base indurada. En ocasiones las úlceras pueden infectarse secundariamente con otros agentes microbianos. Cuando la enfermedad compromete el pabellón auricular se pueden producir mutilaciones del mismo. Este tipo de lesión fue descrito inicialmente como la "úlceras de los chicleros" y es muy frecuente en la península de Yucatán, México<sup>6,7,10</sup>.

#### **1.1.3 Tratamiento**

Los medicamentos más comúnmente utilizados en el tratamiento de las leishmaniasis cutánea y mucosa son los antimoniales pentavalentes, en dos diferentes formulaciones: antimoniato de N-metil glucamina y estibogluconato de sodio. Medicamentos como el isotionato de pentamidina, la miltefosina, la anfotericina B y la anfotericina B liposomal constituyen otras opciones terapéuticas. Sin embargo, ningún tratamiento erradica la infección y la gravedad de los eventos adversos asociados a drogas sistémicas, han motivado el uso de medicamentos locales (intralesionales o

termoterapia) para la leishmaniasis cutánea localizada con lesiones de hasta 900 mm cuadrados de área (diámetro de 3 cm), teniendo en cuenta la relación riesgo/beneficio<sup>7,11,12</sup>. Para establecer las prioridades de uso de las alternativas terapéuticas, deben considerarse los siguientes aspectos:

1. Evidencias de eficacia y seguridad de los tratamientos locales y sistémicos en cada uno de los países de la Región.
2. Condiciones operacionales para garantizar la distribución y administración eficiente del producto.
3. Registro y oferta de los productos en el país.
4. Capacidad de seguimiento para la detección de complicaciones a largo plazo.
5. Aspectos culturales sobre la aceptabilidad de las modalidades terapéuticas específicas.

## **1.2 Radiación UV**

La exposición a la radiación ultravioleta (UV) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma el cual se asocia a la capacidad de la luz UVB de alterar el sistema inmune suprimiendo su función<sup>13</sup>. La radiación UV ambiental se divide en dos regiones principales: UVB, que comprende menos del 5% del UV que alcanza la biósfera y UVA, que comprende el 95% de la radiación UV restante<sup>14</sup>. La región completa de UV cubre el rango de longitud de onda de 100-400 nm y se divide en tres bandas: UVA (315 - 400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm)<sup>14,15</sup>. La OMS define una escala para el Índice UV (UVA 95%/UVB 5%) que va de 1 a 11+, el número más grande representa un riesgo mayor de presentar quemaduras, envejecimiento prematuro, cáncer en la piel, así como alteraciones localizadas y sistémicas del sistema inmune<sup>16</sup>.

### **1.2.1 Radiación UVA**

La radiación UVA es la UV de menor energía, puede penetrar hasta la dermis y es capaz de provocar eritema, el cual se caracteriza por un enrojecimiento condicionado por una inflamación debido a la dilatación de los vasos sanguíneos<sup>17</sup>.

### **1.2.2 Radiación UVB**

La radiación UVB es de longitud de onda media y biológicamente activa. No puede penetrar más allá de las capas superficiales de la piel, es decir la epidermis. Es capaz de dañar directamente el ADN de estas células. La mayoría de los rayos UVB son filtrados por la atmósfera. Sin embargo, la sobre exposición a la luz UVB provoca la isomerización del ácido *trans*-uracánico a su forma *cis*, el cual se encuentra en el estrato córneo de la epidermis. Esta isoforma es un potente inmunosupresor que desencadena eventos inmunológicos por los cuales los mastocitos migran a los ganglios linfáticos y producen una supresión sistémica a través de la producción de IL-10 y la aparición de células B reguladoras, productoras de IL-10<sup>18</sup>.

### **1.2.1 Radiación UVC**

La radiación UVC, por otro lado, posee la longitud de onda más corta y por lo tanto es la más dañina, la mayoría de las moléculas orgánicas absorben la radiación UVC, incluyendo el ADN lo cual conduce a un daño severo en los procesos reproductivos causando la muerte celular. Esta es la razón por la cual las fuentes comunes de radiación UVC se han vuelto populares para aplicaciones germicidas/desinfectantes. Sin embargo, la UVC es completamente filtrada por la atmósfera y no llega a la superficie de la tierra<sup>19,20</sup>.

### 1.3 Interleucina 10

La interleucina-10 (IL-10) ejerce múltiples funciones inmunoregulatoras: es un potente antiinflamatorio e inmunosupresor, disminuye la presentación de antígenos a las células T, la producción de IL-12 e inhibe la expresión de iNOS (enzima necesaria para la formación de óxido nítrico y muerte de microorganismos intracelulares)<sup>21</sup>. Las cuatro fuentes principales de IL-10 son las células T auxiliares tipo 2 (Th2), subconjuntos de células T denominadas células Tr1, Th1 y Th17<sup>22</sup>; las células T CD8 también producen IL-10. Otros productores importantes de IL-10 incluyen monocitos y macrófagos estimulados apropiadamente, así como algunos subconjuntos de células dendríticas (DC). Las células B humanas también son una fuente potencialmente importante de IL-10<sup>23</sup>; al igual que algunos granulocitos, incluidos los eosinófilos y los mastocitos<sup>24</sup>. Las fuentes de células no inmunes de IL-10 incluyen queratinocitos, células epiteliales e incluso células tumorales<sup>25</sup>.

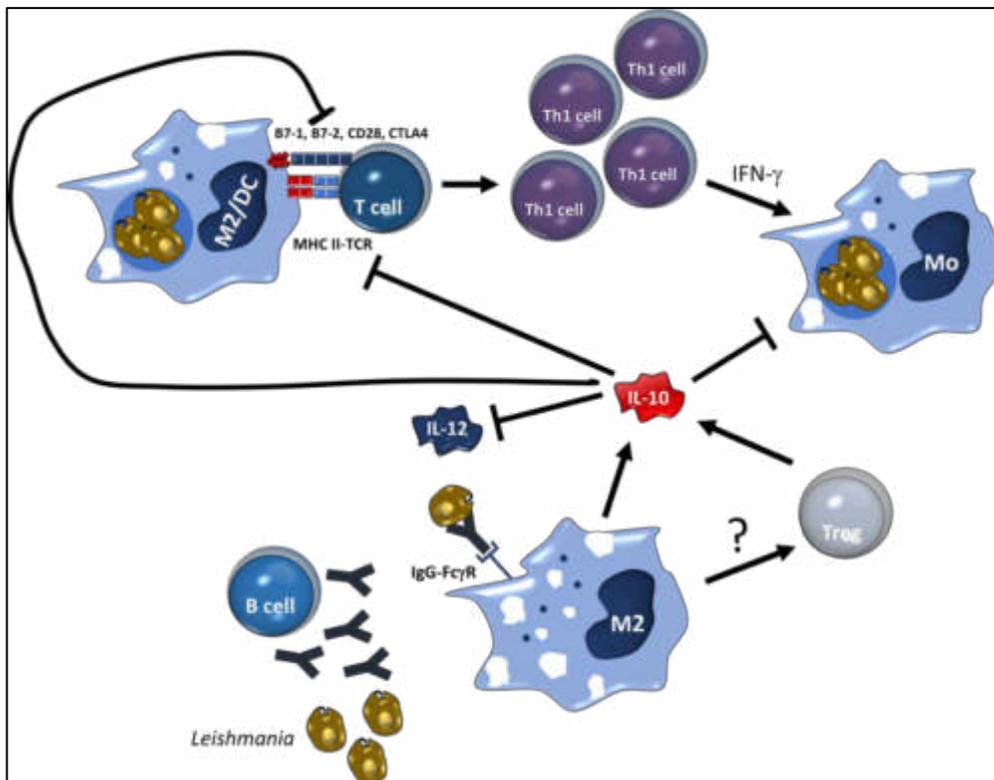
#### 1.3.1 *Leishmania* e IL-10

Se ha descrito el papel de IL-10 en la susceptibilidad a la infección por *L. mexicana*; ratones deficientes exhiben un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  y óxido nítrico, perfil de moléculas características de una respuesta Th1 y son capaces de resolver las lesiones. Sin embargo, la elevada producción de IL-10 en ratones wild type se ha relacionado con la unión IgG-*L. mexicana* al Fc $\gamma$ R sobre los macrófagos, debido a que los ratones infectados producen una fuerte respuesta de anticuerpos IgG opsonizantes del subisotipo IgG1. Otra de las evidencias que apoya la hipótesis donde la unión IgG-*L. mexicana* al Fc $\gamma$ R, en específico al tipo III, promueve la secreción de IL-10, es que los ratones KO para el Fc $\gamma$ RIII, los cuales son resistentes a la

infección, resuelven las lesiones en asociación con una fuerte respuesta de IFN- $\gamma$ , similar a los ratones KO de IL-10 (Fig. 1)<sup>26,27</sup>. Toda esta evidencia científica soporta el modelo donde la producción de IL-10 permite el desarrollo de la enfermedad crónica. Se pensaba que la principal fuente de IL-10 era el macrófago<sup>28</sup>, y que esto desencadenaba el establecimiento crónico del parásito (Fig.1), pero estudios recientes sugieren que la IL-10 secretada por linfocitos T y no por macrófagos, es indispensable para establecer la lesión cutánea crónica; así que es probable que haya una vía indirecta donde la unión del inmunocomplejo IgG1-amastigote al Fc $\gamma$ RIII en otra célula, induzca la producción de IL-10 por los linfocitos T<sup>29</sup>.

### **1.3.2. Radiación UVB e IL-10**

Se ha comprobado que 6 horas después de la exposición a la radiación UVB hay un reclutamiento de mastocitos a la piel y dentro de las 24 horas siguientes el número de mastocitos en los ganglios linfáticos regionales aumenta dramáticamente, debido a la migración de estas células a través de CXCR4 y al factor activador de plaquetas (PAF). Esta migración ocasiona una inmunosupresión local mediada por la secreción de IL-10<sup>30,31</sup>. Esto trae como consecuencia la supresión de la función de las células Th foliculares, la formación de centros germinales y la producción de anticuerpos *in vivo*<sup>32</sup>, contribuyendo a la supresión sistémica desencadenada por la radiación UVB y mediada por IL-10.



**Figura 1. Modelo de unión IgG-Fc $\gamma$ R para la inducción de la enfermedad crónica causada por *Leishmania mexicana* a través de IL-10.** Las células B secretan anti-*Leishmania* IgG, que se une a los amastigotes formando inmunocomplejos. Los complejos IgG-*Leishmania* se unen al Fc $\gamma$ R en los macrófagos (M $\Phi$ ) e inducen IL-10, la cual tiene muchos efectos, incluyendo la regulación negativa directa de iNOS, con la disminución de la muerte mediada por NO de *Leishmania* y la disminución de la secreción de IL-12 por células presentadoras de antígenos (APCs). Además disminuye la presentación de antígenos mediante el complejo mayor histocompatibilidad de clase II (MHC II) y la expresión de B7, que se combinan para disminuir el desarrollo células Th1 y la producción de IFN- $\gamma$ , el cual también conduce a la disminución de iNOS y con ello una menor eliminación de parásitos mediada por NO. Las células Treg también pueden ser estimuladas por IL-10 secretada por macrófagos u otros factores para contribuir a la producción de su propia IL-10.

## 1.4 Linfocitos B

Los linfocitos B son células de linaje linfoide, componentes esenciales de la respuesta inmune humoral, parte del sistema inmune adaptativo y responsables de la generación de anticuerpos contra antígenos específicos, los cuales protegen de infecciones y participan en la lesión tisular en la

autoinmunidad y el trasplante. Las células B también participan en la activación de las células T a través de la presentación de antígenos, coestimulación, producción de citocinas e importantemente, sirven como células reguladoras que modulan tanto las respuestas celulares como las humorales<sup>33</sup>. Existen tres clases principales de linfocitos B en ratones y humanos, clasificadas en base a su ontogenia y localización anatómica: Linfocitos B2 o foliculares, linfocitos B1 y linfocitos B de la zona marginal. La activación de células B se da a través de dos señales, la primera involucra la unión del BCR al antígeno<sup>34,35</sup>. A partir de la segunda señal se definen dos grandes categorías de respuestas humorales (timo-dependientes y timo-independientes)<sup>36</sup>. En las respuestas timo-dependientes (TD) la segunda señal se da cuando las células B internalizan, procesan y presentan antígenos proteicos a las células T CD4+, lo que permite la entrada en la reacción de centro germinal. Por el contrario, en las respuestas timo-independientes (TI) la segunda señal se da a través de receptores tipo Toll (TLR) o a través del fuerte entrecruzamiento del BCR<sup>37</sup>. Cada una de estas respuestas está mediada por un subtipo diferente de células B (B1 o B2).

#### **1.4.1 Linfocitos B y *Leishmania***

Se han identificado dos subconjuntos de células B (B1 y B2) que producen patrones distintos de citocinas dependiendo del entorno en el que las células fueron estimuladas durante su encuentro primario con el antígeno y las células T. Estos subconjuntos de células B efectoras regulan posteriormente la diferenciación de células TCD4+ vírgenes a células Th1 y Th2 mediante la producción de citocinas polarizadoras tales como IL-4 e IL12/IFN- $\gamma$ <sup>38</sup>. Por lo tanto, los linfocitos B podrían tener un papel clave en la resistencia o susceptibilidad a la infección por *L. mexicana*.

Recientemente se ha descrito una población de linfocitos B reguladores productores de IL-10, los cuales secretan esta interleucina tras la estimulación con antígenos de *Leishmania infantum* in vitro

o la infección con *Leishmania major* in vivo, siendo este mecanismo el que regula la polarización de los linfocitos T CD4+ a células Th2<sup>39,40</sup>. Adicionalmente estudios *in vitro* demuestran que el eje IL-10/PGE<sub>2</sub> donde la principal fuente son los linfocitos B1, juega un papel importante en favorecer el crecimiento de los parásitos dentro de los macrófagos peritoneales y contribuye también al ambiente inmunosupresor característico de la Leishmaniosis cutánea crónica<sup>41,42</sup>. Sin embargo, en modelos de resistencia, ratones C57BL/6 deficientes en células B, muestran una activación deteriorada de células T y reducen drásticamente la producción de IFN- $\gamma$ . Estos déficits se normalizan mediante la infección con parásitos opsonizados con IgG, por lo que esta vía es esencial para que las células dendríticas puedan fagocitar eficientemente a los amastigotes a través del Fc $\gamma$ RI y III. Estos datos indican que las células B productoras de IgG específica son esenciales para el óptimo desarrollo de inmunidad protectora<sup>43</sup>.

Por otro lado, estudios realizados en modelos de Leishmaniosis visceral (la forma más grave de la infección) evidenciaron que la producción de anticuerpos específicos IgG1, se acomplejaban con los amastigotes, y eran estos inmunocomplejos los que permitían la entrada del parásito al macrófago; propiciando así la exacerbación de la enfermedad, debido a la producción de IL-10 en lugar de IL-12<sup>44</sup>. También se ha descrito que la activación directa del linfocito B (*activación innata*) por los amastigotes de *Leishmania*, desencadena la estimulación de los TLRs endosomales. Esta activación, cuyo mecanismo no está completamente dilucidado, permite la inducción de varias citocinas como IFN-I, lo cual exagera la enfermedad a través de la IL-10 e IFN-I. También se requirió una vía de TLR endosómica funcional para generar anticuerpos no específicos y específicos de *Leishmania* (Fig. 2)<sup>45</sup>. Los linfocitos B no internalizan al parásito, pero forman clústeres y expresan la molécula de coestimulación CD86 e IgM en su superficie y mueren 48 horas después<sup>46</sup>.

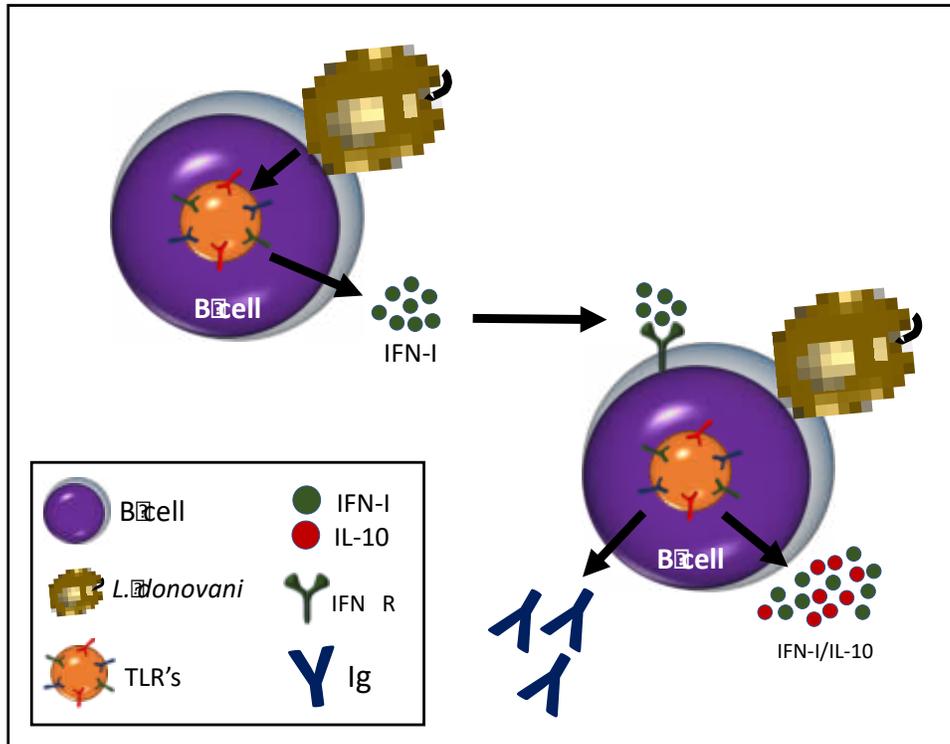


Figura 2. Imagen modificada de: “*Innate Immune B Cell Activation by Leishmania donovani Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia*”

Algunos antígenos o microorganismos, llamados activadores policlonales, pueden inducir directamente la proliferación y diferenciación de linfocitos B a células secretoras de anticuerpos, independientemente de su especificidad antigénica. Este fenómeno se conoce como activación policlonal de linfocitos B. Los activadores policlonales tienen la capacidad de inducir la proliferación de múltiples clonas de células B y regular positivamente la expresión de moléculas como MHC-II, CD69, CD25 y moléculas de coestimulación tales como CD80 y CD86, en la superficie de las células B<sup>47,48</sup>. Los anticuerpos secretados son inespecíficos y reconocen preferentemente antígenos heterólogos u homólogos como actina, mioglobina, miosina, tiroglobulina y ADN<sup>49,50</sup>. Esta activación policlonal de linfocitos B ya había sido reportada años atrás en modelos de Leishmaniosis<sup>51</sup>. La transferencia pasiva y reconstitución de ratones Balb/c

J<sub>H</sub>D (deficientes de linfocitos B) con inmunoglobulinas (IgM o IgG) resulta en una mayor susceptibilidad a la infección por *L. infantum*. Además, los ratones Balb/c J<sub>H</sub>D reconstituidos transgénicamente para secretar IgM demostraron que la enfermedad se exacerba en los primeros días de la infección, en comparación con los ratones *Wild Type*. Esto sugiere que la activación del complemento (generación de C5a) y la señalización a través del C5aR (CD88) está relacionada con la exacerbación de la enfermedad causada por IgM, en lugar de los niveles de citocinas (IL-10 o IFN- $\gamma$ ). En general, estos estudios indican que la activación policlonal de células B, que se sabe está asociada con la Leishmaniosis visceral humana, es una característica temprana e intrínseca de la enfermedad y puede representar un objetivo para la intervención terapéutica<sup>52</sup>.

#### **1.4.2 Linfocitos B y Radiación UVB**

Los mastocitos que migran de la piel irradiada al ganglio linfático regional suprimen la respuesta inmune humoral, dirigiéndose a las áreas de células B donde secretan IL-10 impidiendo la formación de centro germinal y la producción de anticuerpos. También se ha descrito que los ganglios linfáticos que drenan la piel irradiada contienen una población de células B capaces de suprimir la función de las células dendríticas foliculares (FDC) a través de la producción de IL-10, sugiriéndose un papel inmunosupresor de los linfocitos B<sup>53</sup>.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general:

Evaluar la respuesta inmune mediada por linfocitos B en la leishmaniosis cutánea causada por *L. mexicana* un modelo murino de inmunosupresión con luz UVB.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- 1.5.2.1 Establecer el modelo de supresión y su efecto en la lesión causada por *L. mexicana*.
- 1.5.2.2 Analizar la expresión de factores asociados a la respuesta polarizada Th1/Th2.
- 1.5.2.3 Determinar la cinética del perfil de anticuerpos.
- 1.5.2.4 Caracterizar la respuesta inmune de los linfocitos B en ganglios linfáticos y correlacionarla con las lesiones cutáneas.

## 1.6 JUSTIFICACIÓN

La leishmaniosis es un problema de salud pública mundial debido a su magnitud y complejidad clínica, biológica y epidemiológica. Se conocen algunos factores de riesgo para la infección por *Leishmania sp.*, y en México las zonas endémicas de leishmaniosis se relacionan con la exposición a la radiación solar. El interés de nuestro grupo de trabajo es estudiar los efectos de la inmunosupresión y el papel de los linfocitos B después de la exposición a la radiación con luz UVB y su relación con las lesiones cutáneas causada por *L. mexicana* en un modelo de ratón.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Materiales

##### 2.1.1 Reactivos

Nombre	No. de Catálogo	Marca
Rat anti-mouse CD19	MCA1439/STAR21B	Bio-Rad
Medio RPMI-1640	11875093	Gibco
Suero fetal bovino	63310972	ATCC 30-2020
Penicilina-Estreptomicina	15140-122	Gibco
Ácido clorhídrico fumante 37%	1003172500	Merck
Formaldehido	F8775	SIGMA
LIberase TL Research Grade	05401020001	Roche
Eosina	N/A	N/A
Ciclofosfamida	317CT244	Lab. Sanfer
Goat anti-mouse IgM:HRP	102005	Bio-Rad
Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)	315035045	JacksonImmunoResearch
Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgM, $\mu$ Chain Specific	315035020	JacksonImmunoResearch
Biotin-SP-conjugate AffnitiPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	112-065-003	JacksonImmunoResearch
Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	23236	Thermo Scientific
Carbo-Free Blocking Solution	SP-5040	VectorLabs
Biotinylated Peanut Agglutinin	B-1075	VectorLabs
Nuclear Fast Red Counterstain	H-3403	VectorLabs
ImmPACT DAB	SK-4105	VectorLabs
ImmPACT Nova Red	SK-4805	VectorLabs
ImmPACT SG	SK-4705	VectorLabs
HRP-Avidin	PK-6100	VectorLabs
Vectamount	H-5000	VectorLabs
Tissue Tek O.C.T. SAKURA	162550-01	SAKURA
Gelatina	0143-01	DIFCO

Tween 20	P-1379	SIGMA
Albúmina Sérica Bovina	A9647	SIGMA
Gelatina de pescado	N/A	N/A
Suero de cabra	PK	Vector Labs
Suero de conejo	N/A	N/A
Azida de sodio	S-2002	SIGMA
CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	243361	SIGMA
Carbonato de sodio, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Lote: 980304-01	DOQ
Bicarbonato de sodio, NaHCO <sub>3</sub>	S-4019	SIGMA
Cloruro de sodio, NaCl	S5886	SIGMA
Cloruro de potasio, KCl	P5405	SIGMA
Fosfato dibásico de sodio, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	S5136	SIGMA
Fosfato monobásico de potasio, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P5655	SIGMA
Tween 20	P-1379	SIGMA
Leche descremada	LP0031	OXOID
SIGMAFAST OPD	P-9187	SIGMA
Ácido sulfúrico, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2186-01	J.T. Baker
Acetona	00416	CTR
Buffer PBS pH 7.2-7.4	P-5368	SIGMA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	07764	CTR
Sigma Marker	M3913	SIGMA
Glicerol	58-81-5	JALMEK
metanol	CTR20108	CTR
Ácido acético glacial	ARK2183	SAFC
Azul brillante G	B0770	SIGMA
Xilol	1330-20-7/CTR05120	JALMEK/CTR
Etanol absoluto	CTR01160	CTR
Trizma Hydrochloride	T5941	SIGMA

### 2.1.2 Equipos

Nombre	Marca
Centrífuga SL-40R	Thermo Scientific
Microscopio Axio Scope A1 equipado con AxioCam ERc 5s	Carl Zeiss
Bomba Extractora a Vacío	N/A
Baño de agua	PolyScience
Pipeteador automatico Fastpette PRO	N/A
Micrometro digital	Mitutoyo
Campana de Flujo laminar	ESCO
Balanza Analítica	AND
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Ultracongeldor	SANYO
Refrigerador	Daewoo

Tren de Tinción	Tissue-Tek
Criostato microtomo	Roudfin
Pipetas automáticas	eppendorf
Pipeta multicanal	N/A
Lector de microplacas	Bio-Rad
Potenciómetro	CONDUCTRONIC
Incubadora	Ecoshel
Lámpara UV	Philips UVL
Radiometro digital	Company seven
Citómetro de flujo	Accuri
Cámara de neubauer	N/A
Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader	BioTek Instruments, Inc.
Invertoscopio	Bio-Rad
Vortex	Thermolyne

### 2.1.3 Instrumental

Nombre	Marca
Puntillas	N/A
Tubos cónicos (15 y 50 ml)	Corning
Tubos de (0.2, 0.5 y 1.5 mL)	Eppendorf
Gradilla para tubos	N/A
Portaobjetos	N/A
Cubreobjetos	N/A
Microplaca Immulon	Dynex
Tubo de citometría	N/A
Microtainer para suero	BD biosciences
Cyto-laminillas	N/A
Caja p/laminillas	N/A
Plástico adherente	N/A
Aluminio	N/A

### 2.1.4 Soluciones

Ver anexo 1

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Ratones**

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad obtenidos de *Charles River Laboratories* y que han sido mantenidos en el laboratorio de experimentación animal (ABSL-2) y bioterio del Departamento de Inmunología bajo lo establecido en la *NOM-062-ZOO-1999*. El área cuenta con presión negativa para evitar cualquier tipo de riesgo biológico. El uso de ratones en este proyecto de investigación fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) con número de registro IN18-0002.

#### **2.2.1.1 Monitoreo**

Los ratones fueron observados durante el día, para monitorear su peso, pelo erizado y comportamiento durante la duración de los experimentos.

#### **2.2.1.2 Eutanasia**

Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de Xilacina/Ketamina via intraperitoneal, y como metodo fisico se realizó dislocación cervical en los tiempos designados por el protocolo de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

#### **2.2.1.3 Anestesia**

Los ratones fueron gentil, pero firmemente sujetos de la piel de la espalda, exponiendo el área inguinal. Se hizo asepsia con una torunda en alcohol al 70% y se inocularon 100 µl de

Xilazina/Ketamina a una dosis de 10 mg/kg y 100 mg/kg respectivamente. El tiempo que duró el efecto de la anestesia fue alrededor de 20-30 minutos.

#### **2.2.1.4 Infección**

Los promastigotes de *L. mexicana* se cultivaron a 27 °C en medio RPMI complementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor y 100 mg/ml de penicilina-estreptomicina. Se recolectaron los promastigotes en fase estacionaria después de siete días de cultivo. Los parásitos se lavaron tres veces en PBS y se inyectaron en la piel del dorso de ratones experimentales a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/20  $\mu$ l por vía intradérmica. Los ratones fueron expuestos a la radiación UVB 4 días antes de la infección y se repitió 15 y 30 días después de la infección. Las lesiones cutáneas se midieron utilizando un vernier cada cinco días durante 45 días.

#### **2.2.2 Obtención del antígeno (FTAg)**

Los parásitos se centrifugaron a 1500 RPM/10 min, se lavaron con PBS y se contaron en una cámara Neubauer. Se ajustaron a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  parásitos/ml y se incubaron nuevamente a 27 °C durante cuatro días; este procedimiento se repitió dos veces más. Los parásitos se recuperaron por centrifugación, se lavaron con PBS y se dividieron en dos lotes. Ambos se concentraron a  $2.5 \times 10^8$  parásitos/ml. El lote No. 1 se utilizó para el ensayo de DTH. Los parásitos se congelaron una vez para inactivarlos y preservar la morfología. El lote No. 2 se utilizó para obtener el antígeno (FTAg), el cual se preparó congelando-descongelando (-80°C a 37°C) el parásito durante cinco ciclos. La cuantificación de proteínas se determinó mediante un ensayo de Bradford obteniendo una concentración de 169.11  $\mu$ g/ml.

### 2.2.3 Estandarización del ensayo de DTH

Para las dos fases que comprende la DTH (sensibilización y reto) se utilizó un stock de antígeno previamente generado por el método de *freeze and thaw*. Dicho stock está compuesto por promastigotes muertos de *L. mexicana*. Se formaron 5 grupos de 4 ratones cada uno; en la fase de sensibilización 4 de los 5 grupos fueron inoculados en el área inguinal vía subcutánea con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. mexicana* en 100  $\mu$ l; el quinto grupo (control negativo) se inoculó con solución salina estéril. Siete días después de la sensibilización, se inicio la fase de reto. Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con 100  $\mu$ l de Xilacina/Ketamina, se midió el grosor de cada una de las orejas de los ratones con un micrómetro digital marca mitutoyo y se documentó como “0 horas”. Posteriormente cada uno de los 5 grupos fue retado en la oreja derecha con distintas dosis de antígeno:  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  de promastigotes muertos en 20  $\mu$ l. El grupo control fue retado con la dosis más alta, es decir,  $5 \times 10^6$ . La oreja contralateral del mismo ratón fue utilizada como control interno ya que sólo se inoculó 20  $\mu$ l de solución salina estéril (Fig. 3). 24 horas después del reto antigénico se midió el grosor de cada una de las orejas para comprobar el infiltrado celular. Dichas mediciones fueron documentadas como “48 horas” en el formato 1 (Fig. 4). Para finalizar, las mediciones fueron graficadas y se determinó la dosis mínima de reto, capaz de inducir una respuesta de hipersensibilidad retardada medible con diferencia estadísticamente significativa. En este experimento se utilizaron un total de 20 ratones ya que se formaron 5 grupos de 4 ratones cada uno.

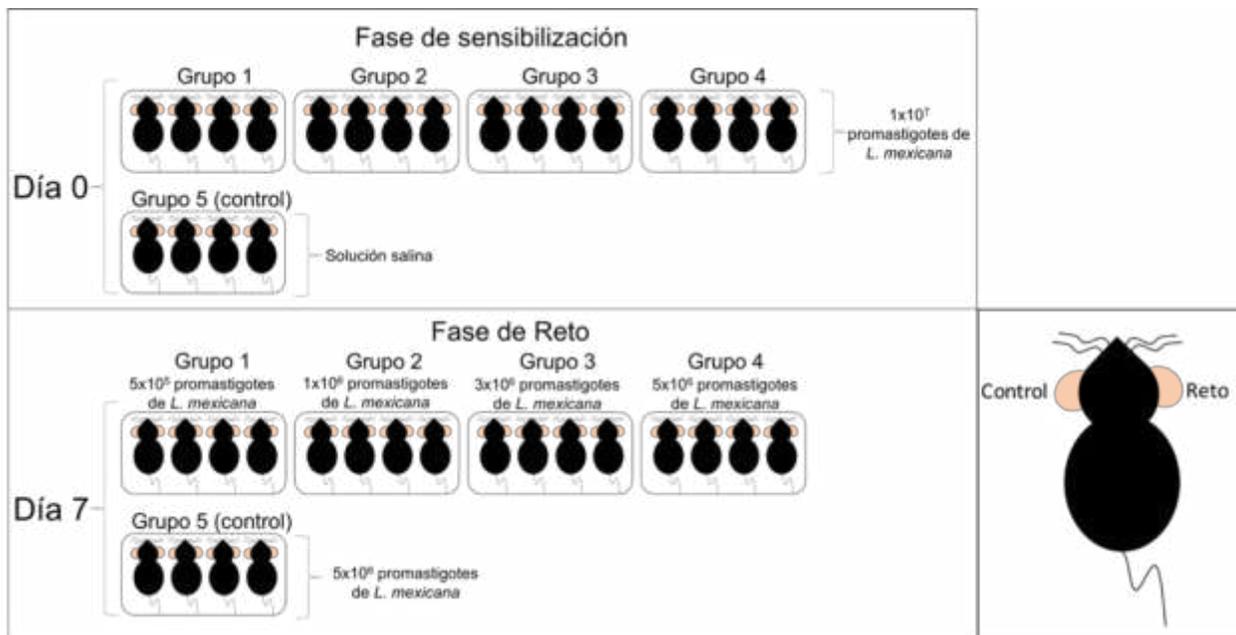


Figura 3. Diagrama DTH

Formato de registro para las mediciones de la prueba de DTH

Nombre: \_\_\_\_\_

Raton	0hrs		48hrs	
	orejaIZQ	orejaDER	orejaIZQ	orejaDER
1				
2				
3				
4				

Código de la caja: \_\_\_\_\_

Raton	0hrs		48hrs	
	orejaIZQ	orejaDER	orejaIZQ	orejaDER
1				
2				
3				
4				

Código de la caja: \_\_\_\_\_

Raton	0hrs		48hrs	
	orejaIZQ	orejaDER	orejaIZQ	orejaDER
1				
2				
3				
4				

Código de la caja: \_\_\_\_\_

Raton	0hrs		48hrs	
	orejaIZQ	orejaDER	orejaIZQ	orejaDER
1				
2				
3				
4				

Código de la caja: \_\_\_\_\_

Raton	0hrs		48hrs	
	orejaIZQ	orejaDER	orejaIZQ	orejaDER
1				
2				
3				
4				

Código de la caja: \_\_\_\_\_

Fecha de medicion:    /    /    /                    /    /    /

Fecha de sensibilización:    /    /    /

Fecha de Reto:    /    /    /

Figura 4. Formato de registro para las mediciones del ensayo de DTH

#### **2.2.4 Estandarización de la dosis de radiación UVB**

Se formaron 5 grupos de 4 ratones cada uno y se anestesiaron como previamente se describió. Posteriormente se rasuró el dorso y se depiló completamente. Cada grupo se colocó debajo de la lámpara de UVB y se irradiaron a distintos tiempos: 1, 5, 10, 15 y 20 minutos. La lámpara emite una radiación de aproximadamente 40 KJ/cm<sup>2</sup> y la dosis depende del tiempo de exposición. La dosis inmunosupresora está en el rango de 10-15 KJ/m<sup>2</sup>.

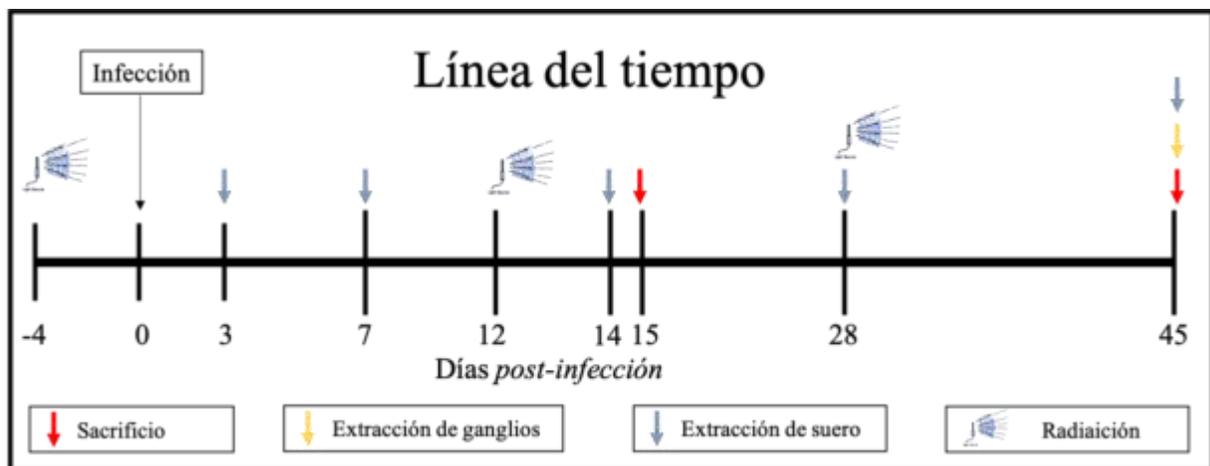
Una vez irradiados, los ratones fueron colocados nuevamente en sus cajas. Se monitorearon durante 3 días para evaluar quemaduras por el efecto de la radiación. Posteriormente se realizó el ensayo de DTH, que previamente fue estandarizado. Esto con el fin de determinar a qué tiempo de exposición la luz UVB es capaz de suprimir esta respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV. En este experimento se utilizaron un total de 20 ratones.

#### **2.2.5 Infección con *L. mexicana* en ratones suprimidos con radiación UVB**

Se formaron 4 grupos de 6 ratones infectados para cada tiempo de sacrificio (día 15 y 45), con un total de 2 sacrificios durante el desarrollo de la lesión. Se utilizaron un total de 48 ratones (Fig. 5). Los ratones fueron anestesiados, rasurados y depilados. Posteriormente se colocaron debajo de la lámpara de UVB y se irradiaron durante 2 min a una distancia de 10 cm de las lámparas. Dos grupos no fueron expuestos a la luz UVB. Cuatro días después se infectaron a dos grupos de ratones, uno que fue irradiado y otro que no fue irradiado, las infecciones se llevaron a cabo en el dorso vía intradérmica 1x10<sup>6</sup>/20 µl de promastigotes de *L. mexicana*. Los grupos control se inocularon únicamente con solución salina estéril.

Durante la infección en intervalos de 16 días se expuso a los ratones de nuevo a la luz UVB y cada 5 días se realizaron las mediciones donde los ratones fueron anestesiados para obtener un resultado más exacto. El tamaño de la lesión se estimó con un vernier ya que este instrumento es capaz de medir el exterior, interior y profundidad de la misma.

Durante el desarrollo de la infección no se utilizaron analgésicos debido a que la lesión es indolora. Este protocolo no se llevó más allá de los 45 días, por lo que una vez que concluyó este periodo todos los animales fueron sacrificados.



**Figura 5. Diseño experimental**

### **2.2.6 Determinación de la carga parasitaria**

La carga de parásitos se realizó a través de dilución limitante, como se describió anteriormente para cinco ratones por grupo<sup>54</sup>. Los datos de cuatro muestras de la misma lesión de todos los ratones infectados se analizaron utilizando un método desarrollado por Finney<sup>55</sup>. La lesión completa se disgregó con un bisturí y posteriormente se incubó con Liberase TL Research Grade a 37° durante una hora. La reacción se detuvo añadiendo RPMI estéril. Se usó 100 µl de la muestra y se realizó una dilución seriada 1 a 2, en una placa de 96 pocillos. Las microplacas se incubaron a 27°C durante

siete días. Los parásitos se contaron usando un invertoscopio y la carga por lesión se estimó usando una herramienta de Excel y el complemento Solver.

### **2.2.7 Determinación de anticuerpos anti-*Leishmania mexicana* en suero**

Se extrajo sangre de la vena mandibular de los cuatro grupos de ratones a los días indicados (Fig. 5). La sangre se centrifugó a 3500 RPM/5 min y los sueros se utilizaron para el análisis de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a/c, IgG3 e IgM específicos para *Leishmania mexicana* mediante ELISA. Se utilizaron placas con FTA<sub>g</sub> para capturar anticuerpos anti-*L. mexicana* y se detectó la reacción mediante un anticuerpo secundario unido a estreptavidina conjugada con peroxidasa. La lectura de las placas se realizó en el equipo Cytation 3 ubicado en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario. Los resultados se graficaron como la media y la SD de los valores de absorbancia (OD) de ratones experimentales restando el fondo (OD) de los ratones no infectados.

### **2.2.8 Análisis de los centros germinales en los ganglios linfáticos**

Se obtuvieron los ganglios linfáticos de los cuatro grupos de ratones a los días 15 y 45 de la infección; y se incluyeron en medio Tissue Tek para su congelación. Se realizaron cortes de 4-6 µm, y se montaron sobre portaobjetos cargados con poli-L-lisina. Para la inmunotinción con aglutinina de maní (PNA), se bloqueó la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 9% en PBS durante 30 min a 37 ° C. Las secciones se incubaron con PNA durante la noche a 4 °C. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario conjugado a la enzima (HRP) y se utilizó un kit de Vectorlabs sustrato-cromógeno ImmPACT NovaRED durante 10 minutos a temperatura ambiente, para detectar los centros germinales (GC). Para la contra-tinción se utilizó Vector Nuclear Fast Red.

Una vez revelada la reacción el tejido fue deshidratado e incluido en medio de montaje no acuoso Vectamount. Las células teñidas de rojo se consideraron inmunorreactivas, las fotografías se capturaron con un microscopio y las imágenes se analizaron por ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, NIH, EE. UU.).

### **2.2.9 Cuantificación de células CD19+ por citometría de flujo**

Los ganglios linfáticos del área inguinal (DLN) se extrajeron 45 días después de la infección, se colocaron en PBS con albúmina al 0.1% y se homogeneizaron. La viabilidad celular se determinó mediante exclusión con azul tripán y se utilizó el anticuerpo primario anti-CD19-APC y control de isotipo anti-CD19-APC. Las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se analizaron en el citómetro de flujo BD Accuri™ C6 Plus utilizando el software BD Accuri™ C6 Plus. Los resultados se analizaron con el software FlowJo v7.6.5.

### **2.2.10 Expresión relativa de T-bet, GATA-3, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 e IL-4 por RTqPCR**

#### **2.2.10.1 Extracción de ARN**

Se obtuvo el ARN de los ganglios linfáticos empleando trizol. Se tomaron aproximadamente  $2 \times 10^6$  cel/ml y se adicionaron 400  $\mu$ l de trizol. Los tubos se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y posteriormente a cada uno se le adicionaron 100  $\mu$ l de cloroformo y fueron sometidos a agitación durante 1 min utilizando un vortex. Los tubos se incubaron a TA de 2 a 3 min, luego fueron centrifugados a 12,250g en una microcentrífuga refrigerada (HEMLE) durante 15 min. Al término de la centrifugación se separó la fase acuosa (transparente) la cual contiene el ARN y fue transferido a un tubo eppendorf estéril.

### **2.2.10.2 Precipitación del ARN**

A los tubos con la fase acuosa se les agregó 250  $\mu$ l de isopropanol (Baker) y se incubaron durante 10 min a TA; posteriormente, se centrifugaron a 12,250g durante 10 min. La pastilla de ARN se lavó adicionando 500  $\mu$ l de etanol al 70% (Baker), los tubos se centrifugaron a 7,075g durante 10 min para separar el ARN. Finalmente la pastilla fue re-suspendida en 5 $\mu$ l de agua tratada con DEPC (Dietil-pirocarbonato); una vez re-suspendida, los tubos se incubaron por 10 min a 55°C en un baño maría con recirculación (Cole- Palmer).

### **2.2.10.3 Reacción de retro-transcripción**

A un tubo de PCR estéril se le adicionó 1  $\mu$ l de oligonucleótido dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen) y aproximadamente 1 $\mu$ g (3 $\mu$ l) de ARN total; todas las muestras se llevaron a un volumen final con 12 $\mu$ l de agua DEPC estéril. Los tubos se calentaron durante 10 minutos a 70°C y se colocaron en hielo rápidamente durante 2 minutos junto con el amortiguador, después se adicionaron 2  $\mu$ l de ditioneitol (DTT) 0.1 M y 1 $\mu$ l (2.5mM) de la mezcla de dinucleótidos trifosfatados (dNTP's) Perkin Elmer. Los tubos se incubaron durante 2 min a 42°C y finalmente se adicionó 1  $\mu$ l de la enzima (SuperScript II) y se incubó durante 50 min a 42°C. La reacción se inactivó por calor a 70°C durante 15 min.

### **2.2.10.4 Reacción de qPCR**

La reacción de amplificación (PCR) se preparó con 1 $\mu$ l (5% de la reacción total de RT) del producto de la reacción anterior y con 20 *pmol* de cada uno de los oligonucleótidos específicos para las diferentes moléculas a determinar, re-suspendidos en Buffer de PCR 1X (Invitrogen) utilizando la enzima Taq polimerasa en una dilución 1:10 "Gold" (Perkin Elmer) con MgCl<sub>2</sub> 1.5mM (Invitrogen), como cofactor de la enzima y una concentración 2.5mM de dNTP's (Sigma). El

volumen total de reacción se completó con agua desionizada c.b.p. 25µl; cada programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización a 94°C, seguido de un paso de alineamiento a 55°C por 30 segundos y un paso de extensión a 72°C durante 1 minuto por 30 ciclos. Como control interno de reacción se amplificó el gen GAPDH. Los productos de la reacción de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.8% y fueron visualizados mediante la tinción con 0.5µg/ml de Bromuro de Etidio (EtBr). La intensidad de las bandas fue cuantificada usando el programa Image J.

#### **2.2.10.5 Determinación de los niveles de expresión**

Se utilizaron 2 oligonucleótidos específicos. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, la cual contiene una mezcla de reactivos a diferentes concentraciones: Buffer de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, d’NTP’s 2.5 mM, para cada primer 20 pmol/µl, DNA 5 a 10 ng/µl, enzima Taq Pol (5 U/ µl) y H<sub>2</sub>O Milli-Q. Se incluyeron controles positivos y negativos en todas las reacciones de PCR. El control negativo se sometió a las mismas condiciones de la mezcla de amplificación por PCR sin agregar el DNA blanco. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador de gradiente de marca eppendorf. Cada ciclo de PCR consistió en un paso de desnaturalización (94 °C durante 1 minuto), un paso de alineamiento (66. 5 °C durante 1 minuto) y un paso de extensión (72 °C durante 1 minuto), estos pasos se repitieron durante 35 ciclos. Se utilizó el método de  $2^{-\Delta\text{CT}}$  para estimar la expresión relativa de los genes.

#### **2.2.11 Procesamiento de los datos**

La captura de las imágenes de inmunohistoquímica y tinción de HyE se realizó con el microscopio óptico Axio Lab A1, cámara AxioCam ERc5s y el procesamiento de las

imágenes se llevó a cabo con el editor de imágenes GIMP 2.8.16 e ImageJ 1.47v. NIH. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software GraphPad Prism 6 y se utilizó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* para diferenciar los datos de distribución normal y no normal, aquellos datos de distribución normal fueron analizados por la prueba estadística *t-student* y *two-way ANOVA with Bonferroni post-test* y aquellos datos de distribución no normal se analizaron por la prueba estadística *U de Mann-Withney* y *Kruskal Wallis*. Para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos problema y los grupos control, se consideraron significativos aquellos resultados con una  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO 3

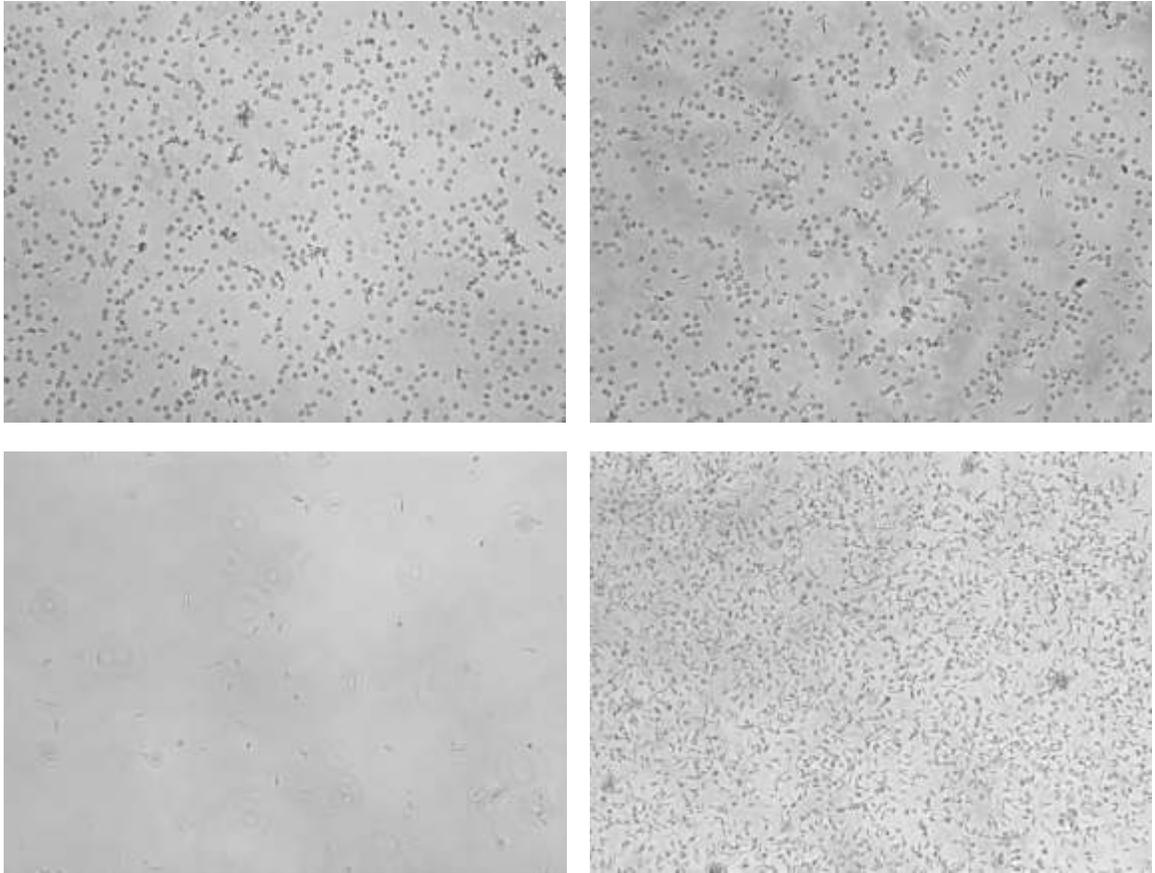
### RESULTADOS

#### 3.1 Parásitos de *L. mexicana*

##### 3.1.1 Ambientación y extracción de parásitos de la pata de ratones infectados

Para dar inicio a todos los experimentos de este proyecto de investigación, primero se obtuvo el parásito comercialmente a través de ATCC. Una vez que llegó a nuestro laboratorio se ambientó en ratones C57BL/6. Esto con el fin de mantener la viabilidad y virulencia del parásito antes de realizar el lote semilla y congelarlo. Una vez que infectamos la pata de los ratones, extrajimos los parásitos inoculando 50  $\mu$ l de solución salina estéril con una jeringa calibre 27G. Se realizó inoculación y succión con la jeringa sin perder el vacío para recuperar la mayor cantidad de parásitos. Una vez realizado este procedimiento se colocó el contenido de la jeringa en una caja de cultivo estéril con medio RPMI suplementado con SFB y antibiótico. La caja se incubó por 4 días a 27 °C y una vez transcurrido este tiempo, los parásitos fueron observados con un invertoscopio para estimar la confluencia y realizar el conteo para un primer reajuste de concentración (Fig. 6).

Una vez expandidos, los parásitos fueron contados en una cámara de Neubauer inmovilizando a los promastigotes con formaldehído al 1%. Posteriormente se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^7$ /ml con DMSO, se colocaron cuidadosamente en un crio-vial y se crio-preservaron en vapores de nitrógeno líquido.



**Figura 6. Cultivo de parásitos extraídos de la pata de ratones C57BL/6. Se observa como al principio del cultivo sólo había eritrocitos (A, B), y conforme pasan los días se desarrollan los promastigotes meta-cíclicos (C) hasta alcanzar una confluencia de casi el 100% (D).**

### **3.2 Estandarización del ensayo de DTH**

Para la estandarización de ensayo de DTH se utilizó el FTAg descrito en el capítulo 2. En un primer ensayo se utilizaron cuatro grupos de ratones para establecer si la induración se mediría a las 24 ó 48 horas tras el reto antigénico (Fig. 7A). Después de obtener estos resultados decidimos medir la induración a las 48 horas. Posteriormente se trabajó con otros cuatro grupos de ratones, pero esta vez un grupo fue irradiado con luz UVB para establecer la concentración de antígeno que se

utilizaría para el reto (Fig. 7B), donde se decidió utilizar  $3 \times 10^6$  parásitos. Posteriormente los ratones fueron sacrificados y las orejas se incluyeron en OCT y se realizaron cortes histológicos los cuales fueron teñidos con H&E para observar la inflamación en el control positivo, con un claro infiltrado celular propio de la respuesta de DTH (Fig. 8). Finalmente se estableció la dosis mínima inmunosupresora,  $24.2 \text{ mJ/cm}^2$  (Fig. 9), la cual se utilizó para todos los experimentos posteriores.

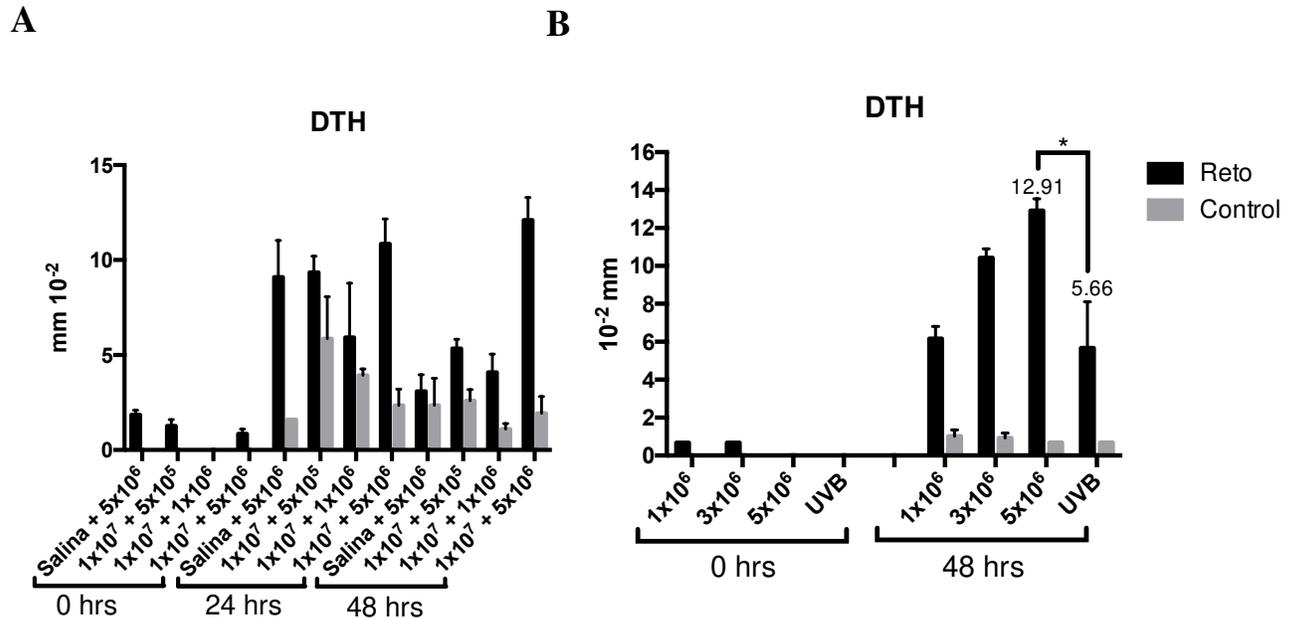
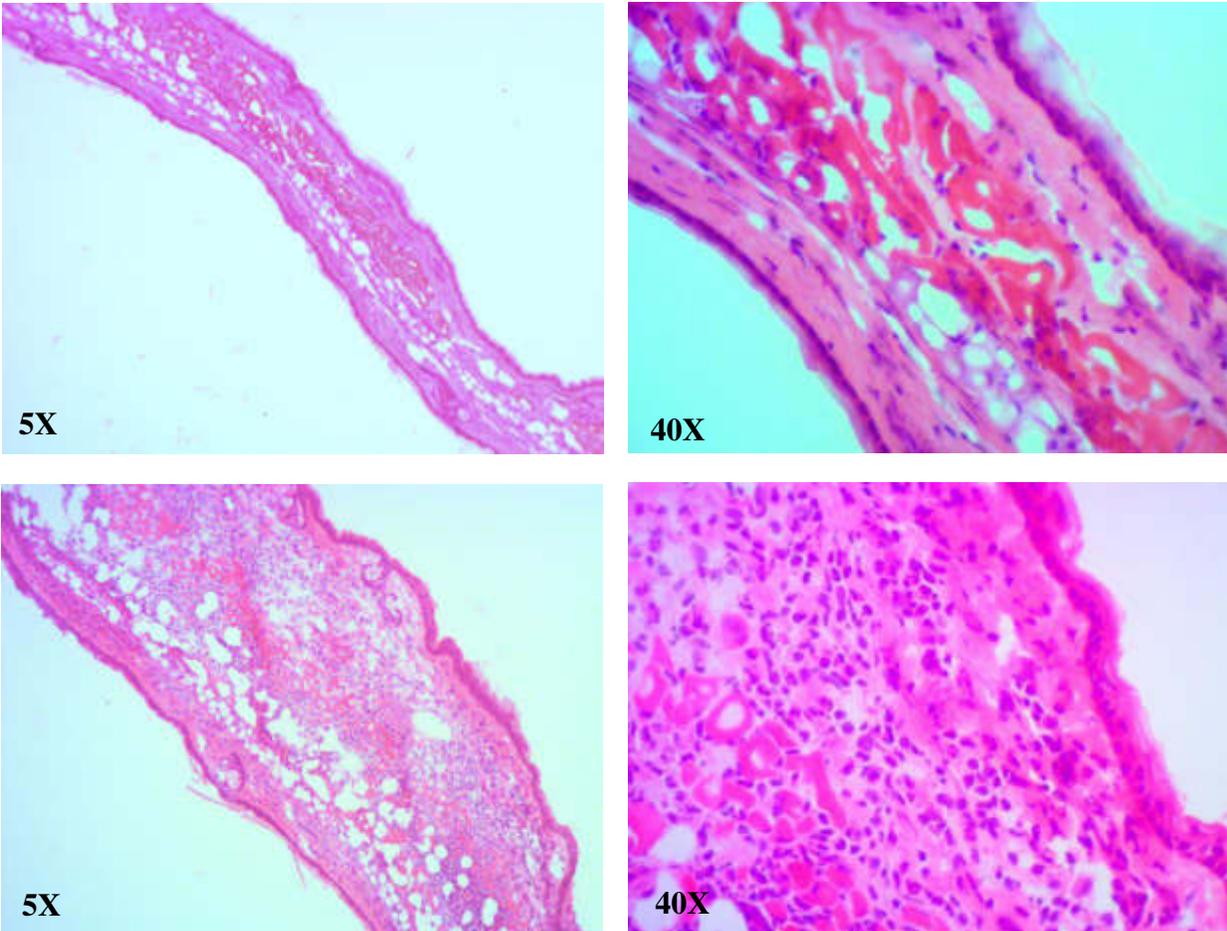


Figura 7. Tiempo de induración y concentración del antígeno en el ensayo de DTH. Se formaron cuatro grupos de ratones y a cada uno se reto inoculo distintas dosis de antígeno, posteriormente se midió la induración a dos diferentes tiempos (A). Una vez establecido el tiempo se determino la concentración (B).  $n = 7$ , barras de error: SD, *t-Student*,  $*p < 0.05$ .

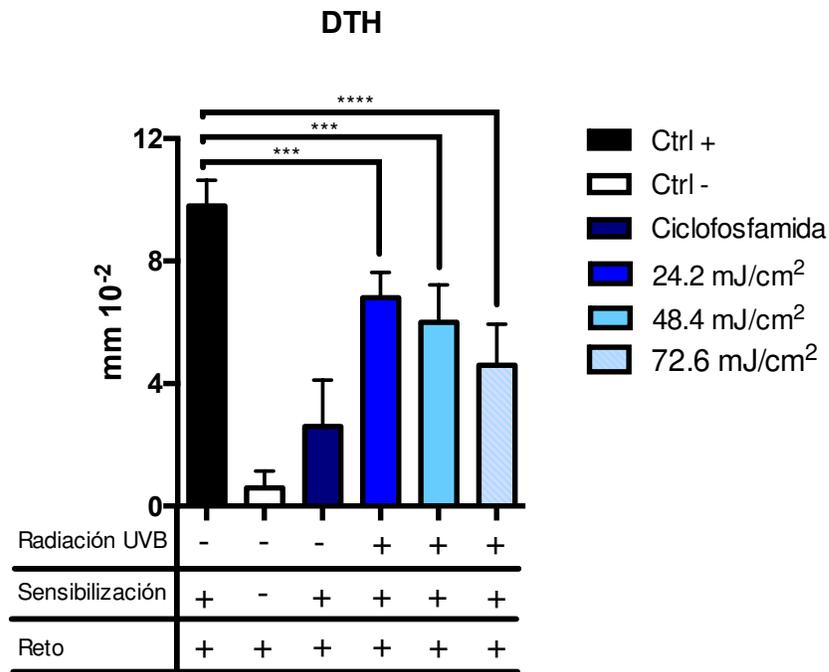
### 3.3 Estandarización de la tinción de H&E

Se realizaron cortes de tejido congelado de bazo y piel de ratón sano para la estandarización de la tinción con H&E. Se probaron distintos tiempos, tanto en hematoxilina como en eosina, estableciendo 15 segundos en eosina y 1 minuto en hematoxilina (Fig. 10). Posteriormente los

tejidos fueron deshidratados e incluidos en medio de montaje no acuoso para su observación al microscopio.



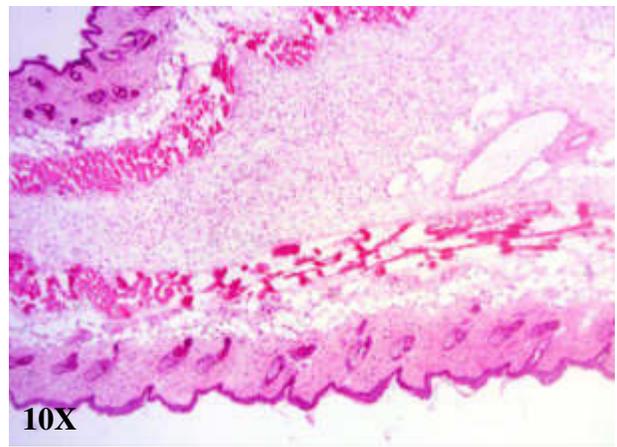
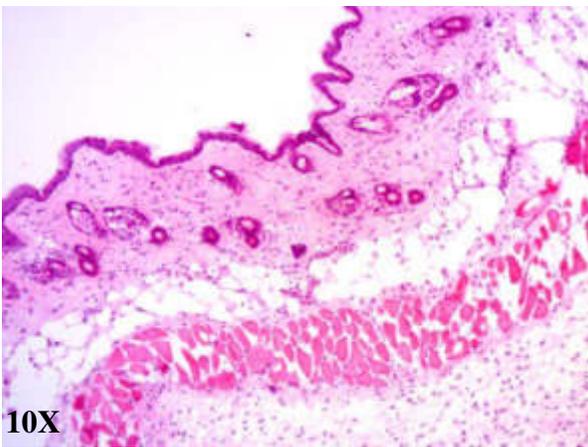
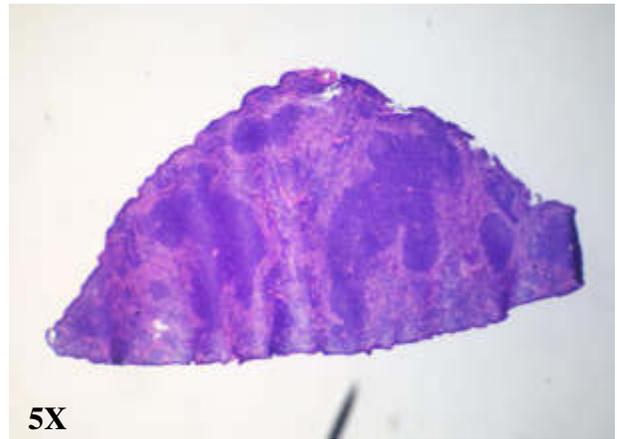
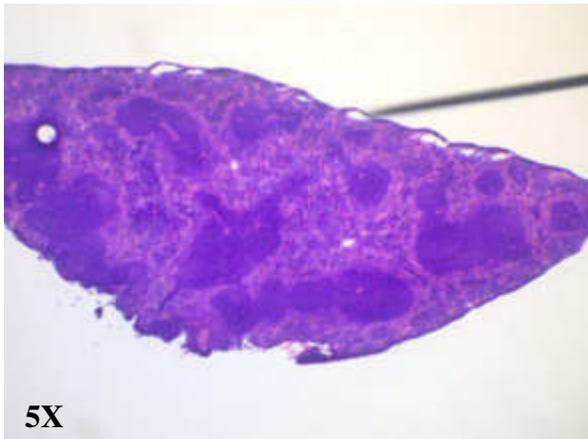
**Figura 8. Corte histológico de oreja teñido con H&E. En el control negativo se puede observar la estructura normal del tejido de la oreja del ratón, sin embargo, al someter al ratón al ensayo de DTH, observamos un gran infiltrado al sitio de reto antigénico, control positivo.**



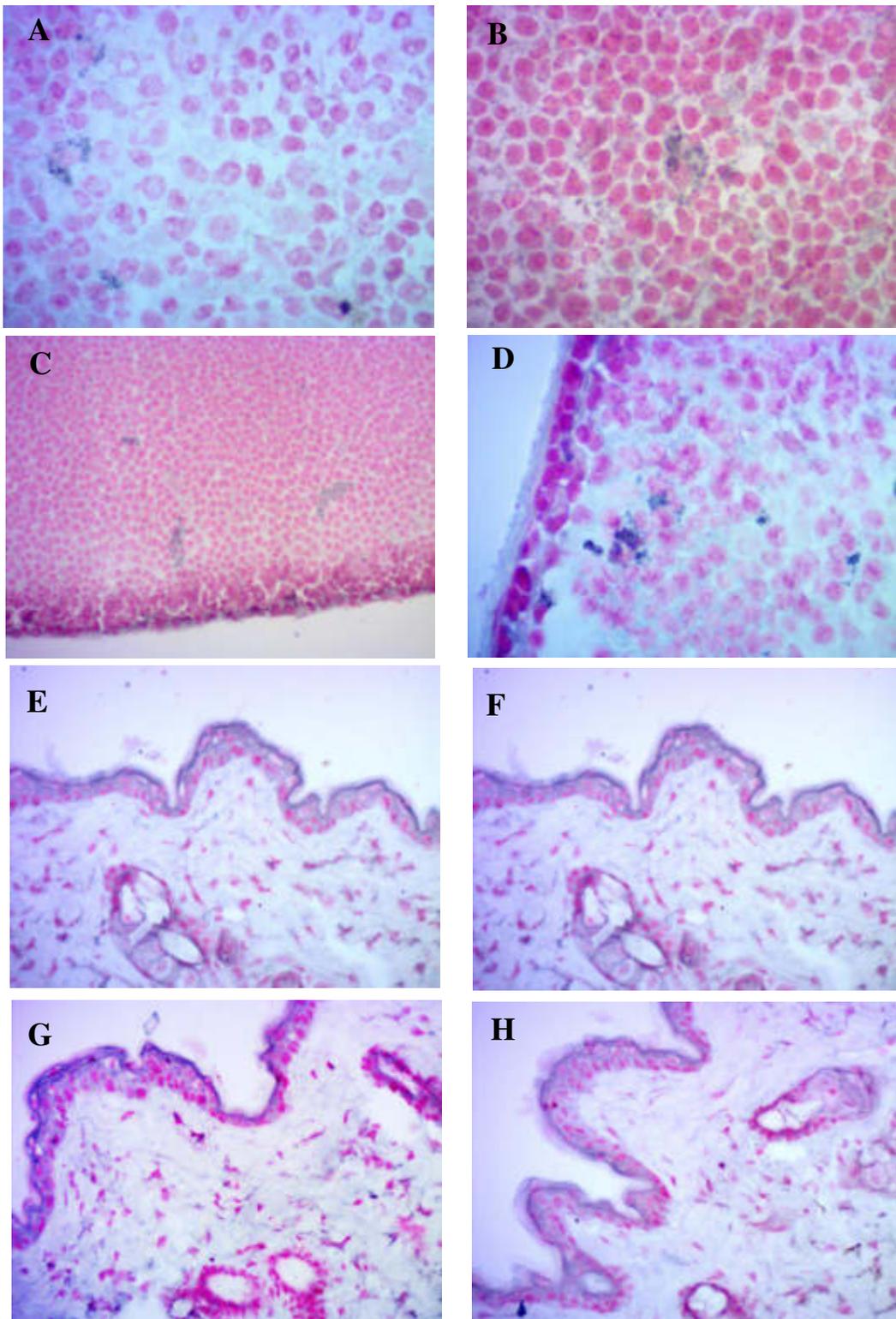
**Figura 9.** Dosis mínima necesaria para suprimir la respuesta de DTH. Se probaron distintas dosis de radiación UVB las cuales equivalen a 5, 3 y 2 minutos respectivamente. Se estableció 24.2 mJ/cm<sup>2</sup> como la dosis mínima.

### 3.4 Estandarización de inmunohistoquímica para IL10

Se realizaron cortes de tejido congelado de ganglio y piel de ratones que fueron irradiados con luz UVB para detectar células IL10+. Se probaron distintas diluciones del anticuerpo primario hasta la dilución 1:200, así como distintas soluciones de lavado, en este caso quitamos el Tween20 del PBS, debido a que generaba mucho fondo. Observamos que las células IL10+ son escasas en los ganglios linfáticos, teniendo que hacer búsquedas campo por campo, hasta encontrarlas (Fig. 11A-D). Por el contrario, en la piel encontramos toda la epidermis reactiva a IL10, lo que indica que posiblemente son células de Langerhans o queratinocitos (Fig. 11E-H).



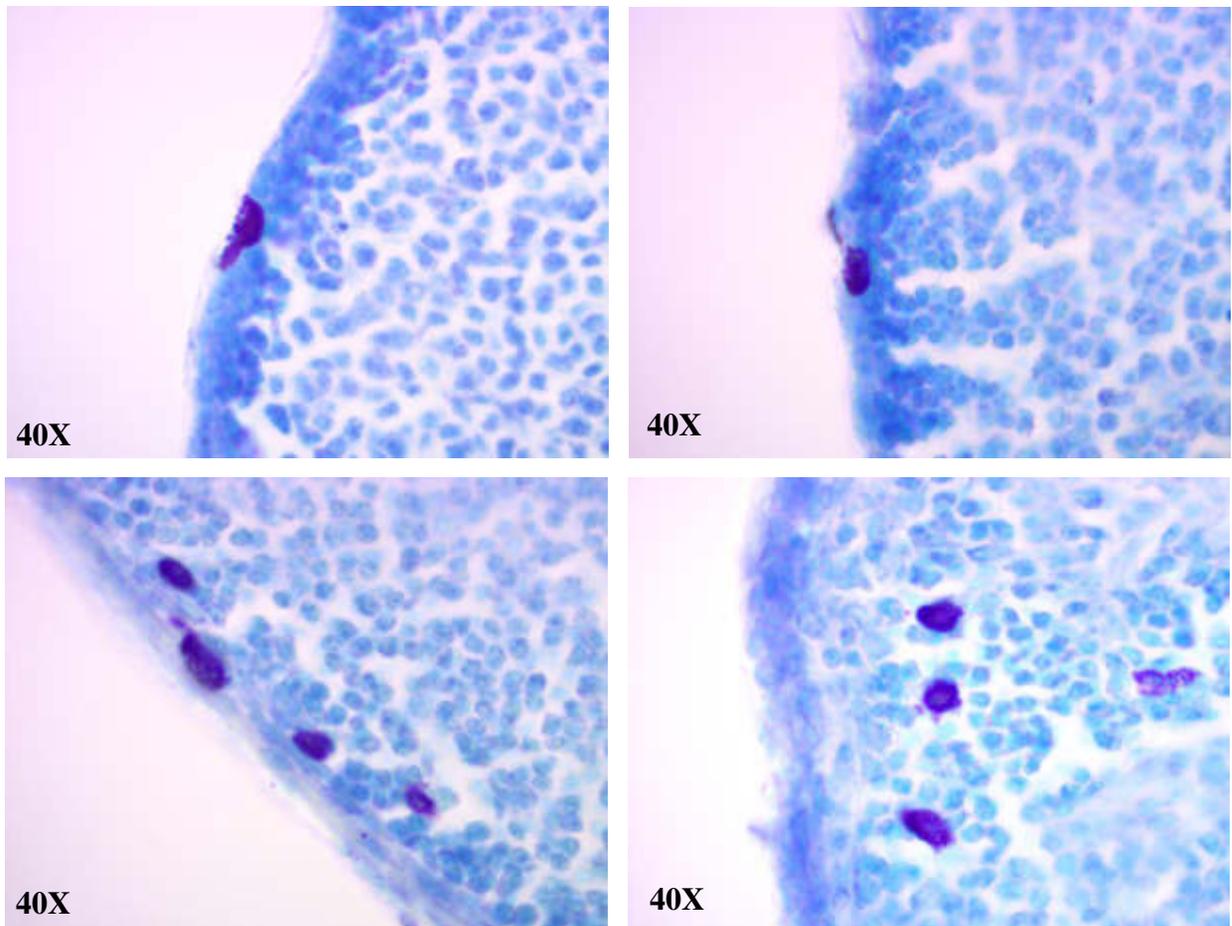
**Figura 10.** Corte de bazo y piel teñido con H&E. Cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$ , teñido con hematoxilina y eosina, en el bazo que esta sobre-teñido se pueden observar las regiones características del bazo como la pulpa roja y blanca, así como los folículos donde se encuentran cúmulos de linfocitos B. en el caso de la piel se utilizaron los tiempos establecidos y podemos notar una tinción mas limpia resaltando todas las áreas de la epidermis, dermis, hipodermis y células infiltrantes.



**Figura 11. Inmunohistoquímica de IL-10 en ganglio y piel. Podemos observar en el ganglio la escasa presencia de células IL10+ en color grisáceo, a diferencia de la piel donde toda la epidermis está llena de IL10. Contra-tinción Nuclear Fast red.**

### 3.5 Determinación de mastocitos en ganglios linfáticos

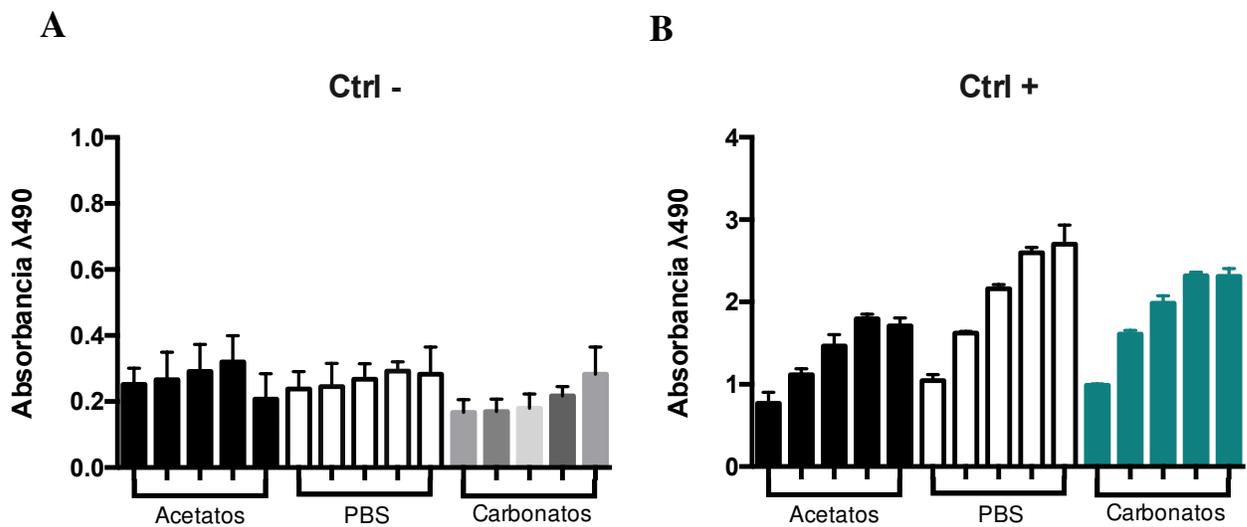
Se realizaron cortes histológicos de ganglios de ratones que fueron irradiados y se tiñeron con azul de toluidina para el rastreo de mastocitos, los cuales han sido reportados como fuente de IL-10 en la supresión por radiación UVB. Se observó un número irregular y elevado de mastocitos en la periferia del ganglio linfático en comparación con los ratones que no fueron irradiados; en contraste con los que ocurre en piel, los mastocitos en ganglio no están degranulados (Fig. 12).



**Figura 12. Identificación de mastocitos en ganglios linfáticos. Se observan los mastocitos sin degranular en color morado, en la periferia del ganglio al borde de la corteza.**

### 3.6 Determinación de anticuerpos anti-*L. mexicana*

Se estandarizó una prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos específicos IgG, IgG1, IgG2a/c, IgG3 IgM anti-*L. mexicana*. Para ello se probaron tres distintos buffers de dilución: acetatos, fosfatos o carbonatos (Fig. 13). Se observó que cuando se diluye el antígeno en buffer de fosfatos y se une a la placa, hay una mejor captura de anticuerpos primarios (suero) lo que se traduce en una mayor absorbancia (Fig. 13B).



**Figura 13. Buffers de dilución.** Se muestran las absorbancias cuando se prueba suero de ratones sanos (A) y suero de ratones infectados con *L. mexicana* (B). la mejor señal es cuando el antígeno se diluye en buffer de fosfatos. Las barras de error muestran la SD.

Posteriormente se probaron distintas concentraciones de antígeno diluido en los diferentes buffers, esto con el fin de determinar la mejor señal con la concentración mínima de antígeno. Como podemos observar el buffer de fosfatos nos dio la mejor señal con una concentración de antígeno de 1.5  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 14). Estos dos parámetros fueron los que utilizaron para las ELISAS de los experimentos posteriores.

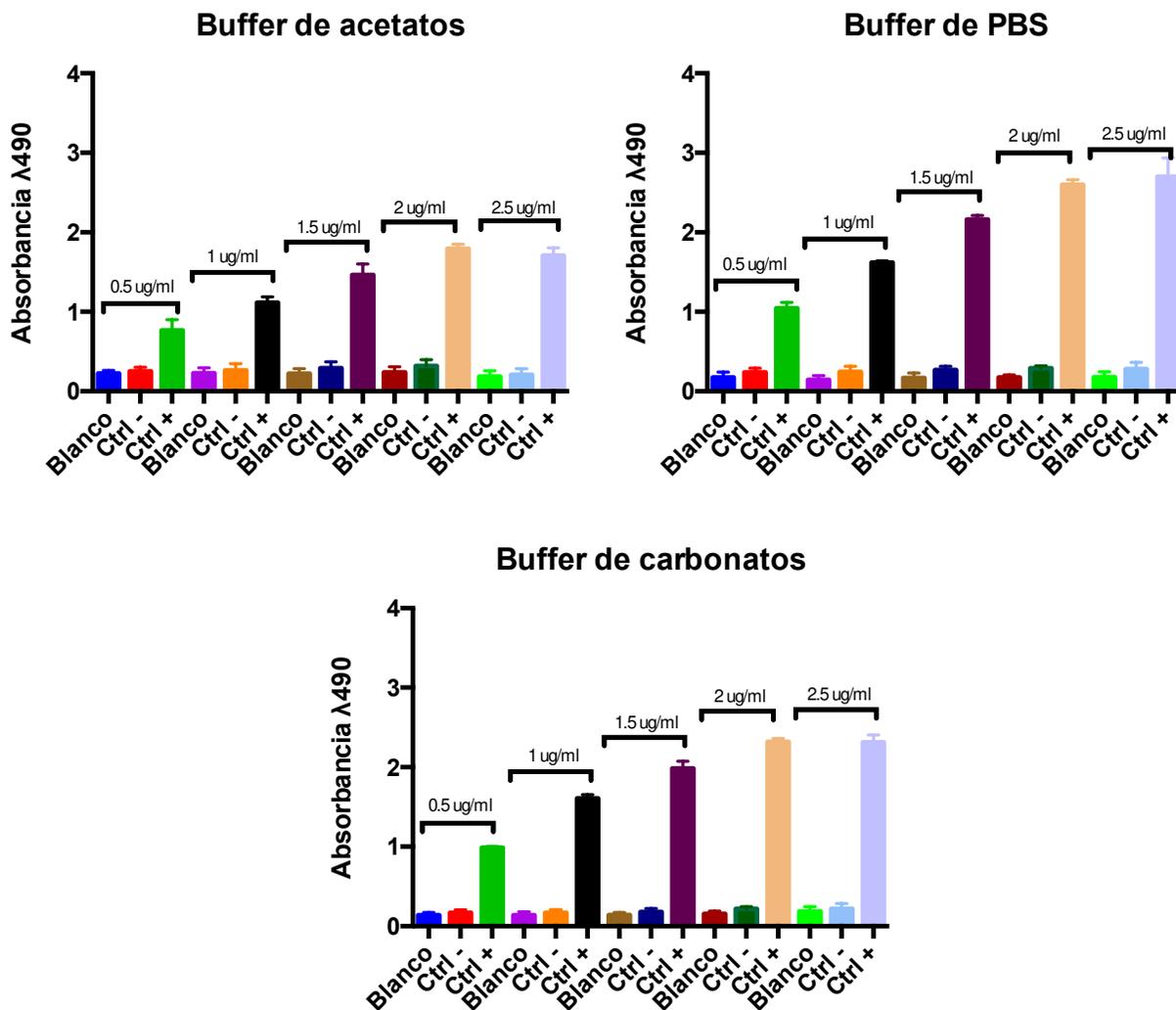
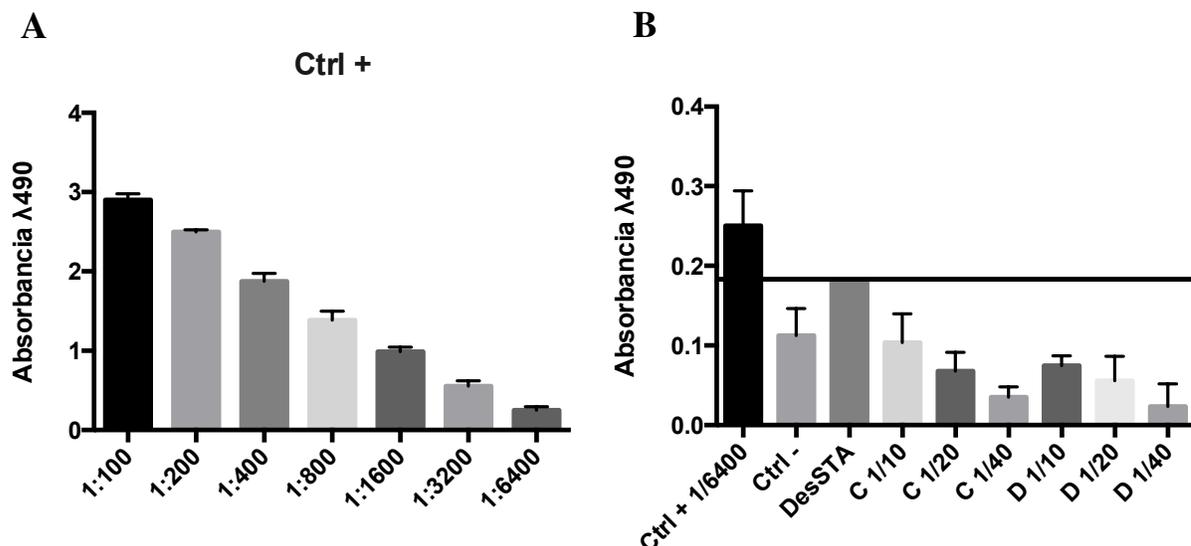


Figura 14. Concentración de antígeno en diferentes buffers. Se observan las absorbancias del antígeno a diferentes concentraciones diluido en tres buffers con distintos pH. Se eligió el buffer de fosfatos a una concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$ . Las barras de error muestran la SD.

Lo siguiente fue la titulación del suero de los ratones infectados. Para ello se hicieron siete diluciones consecutivas 1:2, donde observamos que incluso en la dilución más alta que empleamos (1:6,400) aún había señal positiva. Posteriormente se estableció el punto de corte de la positividad y negatividad de los títulos de anticuerpos, el cual se estableció en 0.18 (Fig. 15A). Se calculó el

promedio de 7 pozos del blanco y se le restó a todas las absorbancias, se graficó el control negativo y posteriormente se le sumó dos veces la desviación estándar para fijarse como el punto de corte. Como podemos observar ninguno de nuestros grupos control pasaron ese punto de corte, que no fue sobrepasado por ninguno de los sueros del grupo control negativo (Fig. 15B).



**Figura 15. Titulación y punto de corte.** Se tituló el control positivo para demostrar la positividad aun con diluciones altas. Se estableció el punto de corte dos desviaciones estándar por encima del control negativo (0.18). Todos los grupos negativos caen por debajo del punto de corte. Las barras de error muestran la SD.

El paso siguiente fue establecer la dilución del anticuerpo primario, es decir, el suero de los ratones infectados e irradiados/infectados. Primero se inició con una dilución 1:100 en base a la literatura; sin embargo, no se detectaron absorbancia positiva para esta dilución, así que se realizaron diluciones menores en relación 1:2 hasta 1:10. Como podemos observar hasta la dilución 1:10 logramos que todos los sueros de los ratones cayeran por encima del punto de corte (Fig. 16). No se utilizó el suero directamente porque se recuperó una cantidad muy pequeña de cada ratón.

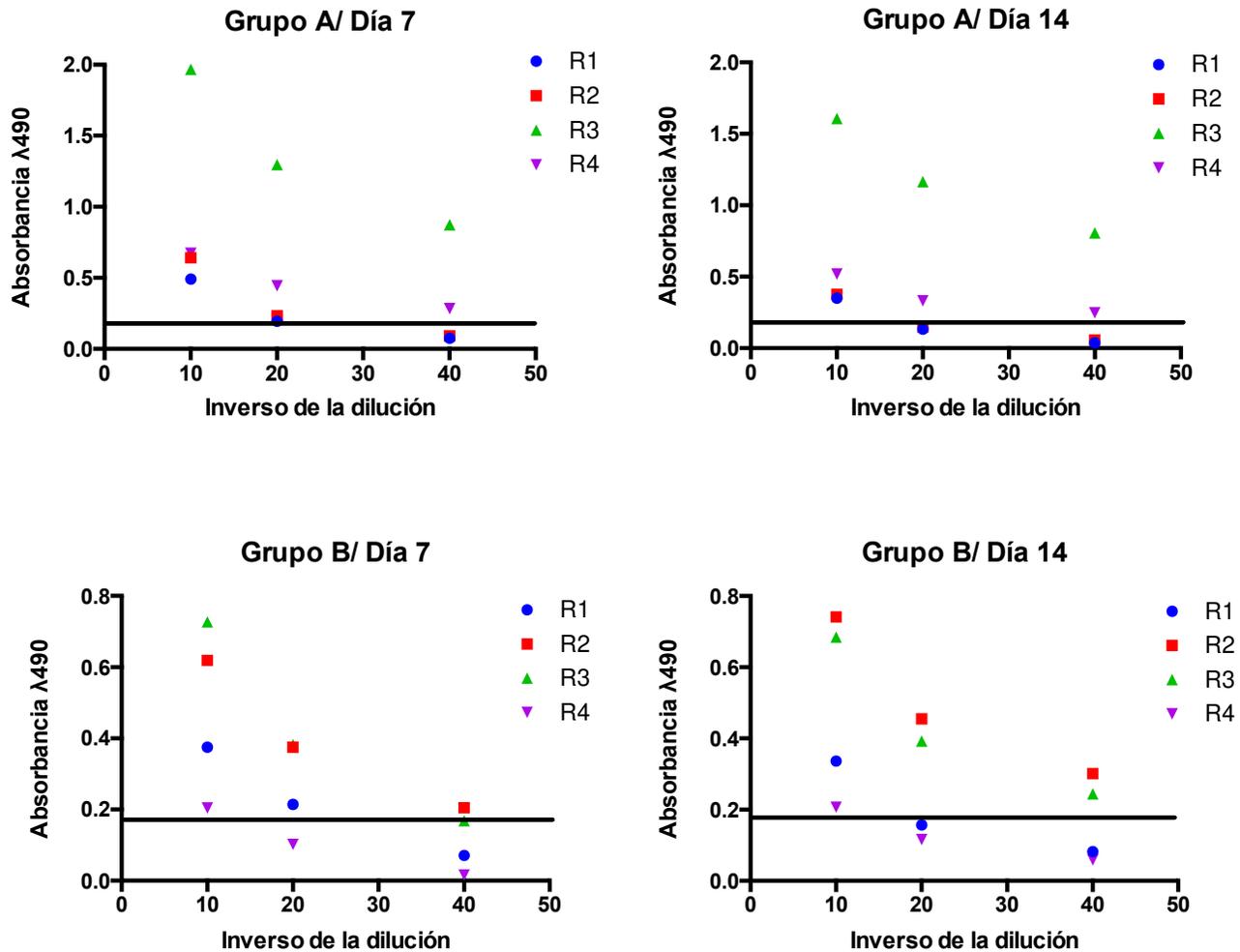


Figura 16. Dilución del anticuerpo primario. Se realizaron diluciones 1:2 hasta observar que todos los sueros de los ratones del mismo grupo estuvieran por encima del punto de corte. Con la dilución 1:10 se logró obtener señal positiva para anticuerpos anti-Leishmania.

Finalmente se estimó la producción de anticuerpos IgG, sus subisotipos y los anticuerpos IgM. Se obtuvo el suero de los ratones infectados e irradiados/infectados a los días 3, 14, 21, 28 y 45 de la infección y se graficó la cinética de los anticuerpos IgG e IgM anti-*L. mexicana*. Se observó que para los anticuerpos IgM, no había diferencias entre el grupo irradiado y no irradiado, sin embargo, sí podemos apreciar que la cantidad relativa de anticuerpos IgM se mantiene alta durante todo el

desarrollo de la lesión incluso hasta el día 45 de la infección (Fig. 17A). Esto se podría explicar por el fondo genético de la cepa de raton utilizada, ya que la elevada producción de IgM se ha asociado a la resolución de microorganismos intracelulares. En cuanto a la cinética de IgG, observamos que al día 14 hay una alza transitoria estadísticamente significativa en los ratones que fueron irradiados (Fig 17B), y al realizar un análisis de los subisotipos de IgG, que se asocian con respuesta del perfil Th1 y Th2, observamos que al día 15 aún no hay producción de anticuerpos IgG2a e IgG3 que se asocian con respuestas de IFN- $\gamma$ ; sin embargo, observamos que hay una producción elevada de IgG1 (Fig. 17C) en los ratones que fueron irradiados, lo que correlaciona con el pobre control del tamaño de la lesión y la carga de parásitos al día 15 (Fig 18A). Al día 45 de la infección esta alza en la producción de IgG1 había desaparecido, posiblemente por la etapa final de la infección, donde el ratón comienza a resolver la lesión.

### **3.7 Lesión y carga de parásitos**

Los ratones se separaron en dos grupos, los que fueron irradiados y luego infectados y los que sólo estaban infectados. El tamaño de la lesión se midió cada cinco días durante 45 días. Los animales se sacrificaron los días 15 ó 45 después de la infección, para cuantificar la carga de parásitos. En la figura 18 se muestra que las lesiones de los ratones irradiados/infectados fueron más grandes que las de los animales que únicamente fueron infectados los días 15 y 45. En la figura 18B,C se muestran dos imágenes representativas del desarrollo de la lesión cutánea al día 45. Se estimó la carga de parásitos a través de la técnica de dilución limitante y se observó que las lesiones cutáneas de los ratones irradiados/infectados ésta fue dos veces mayor que la de los ratones que sólo fueron infectados (Fig. 19). Incluso la carga de parásitos de los ratones irradiados/infectados al día 45 días fue mayor que la del mismo grupo a los 15 días de infección (figura 19B), lo que sugiere que el

efecto de la radiación UVB favorece la replicación del parásito. La carga de parásitos de los ratones infectados fue similar los días 15 y 45 como lo demuestra el análisis estadístico. Por otro lado, el análisis de correlación mostró el efecto directo de la radiación UV con un crecimiento significativo de la lesión debido a una mayor carga parasitaria (Fig. 19). Esto es muy importante porque una lesión más grande no siempre significa una mayor carga de parásitos.

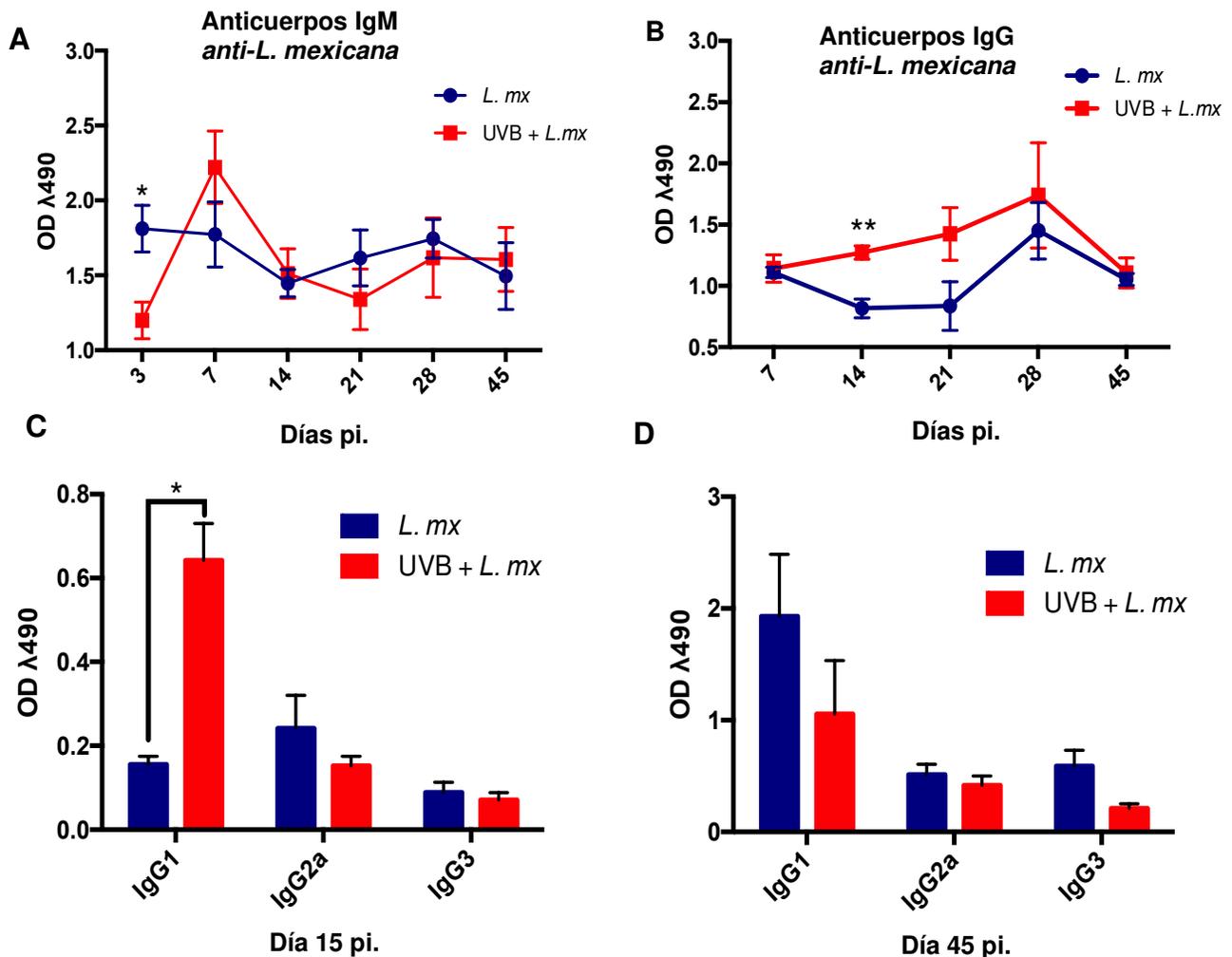


Figura 17. Los ratones irradiados mostraron títulos de IgG1 más altos y una producción de IgM más baja en la infección temprana. Se irradiaron ratones C57BL/6 y luego se infectaron. Los sueros fueron evaluados para IgM (A), IgG (B) y subisotipos IgG1, IgG2a /c e IgG3 específicos de *L. mexicana* los días

15 y 45 p.i. (C) (D) por ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ . Se utilizó una prueba de *t-Student*.

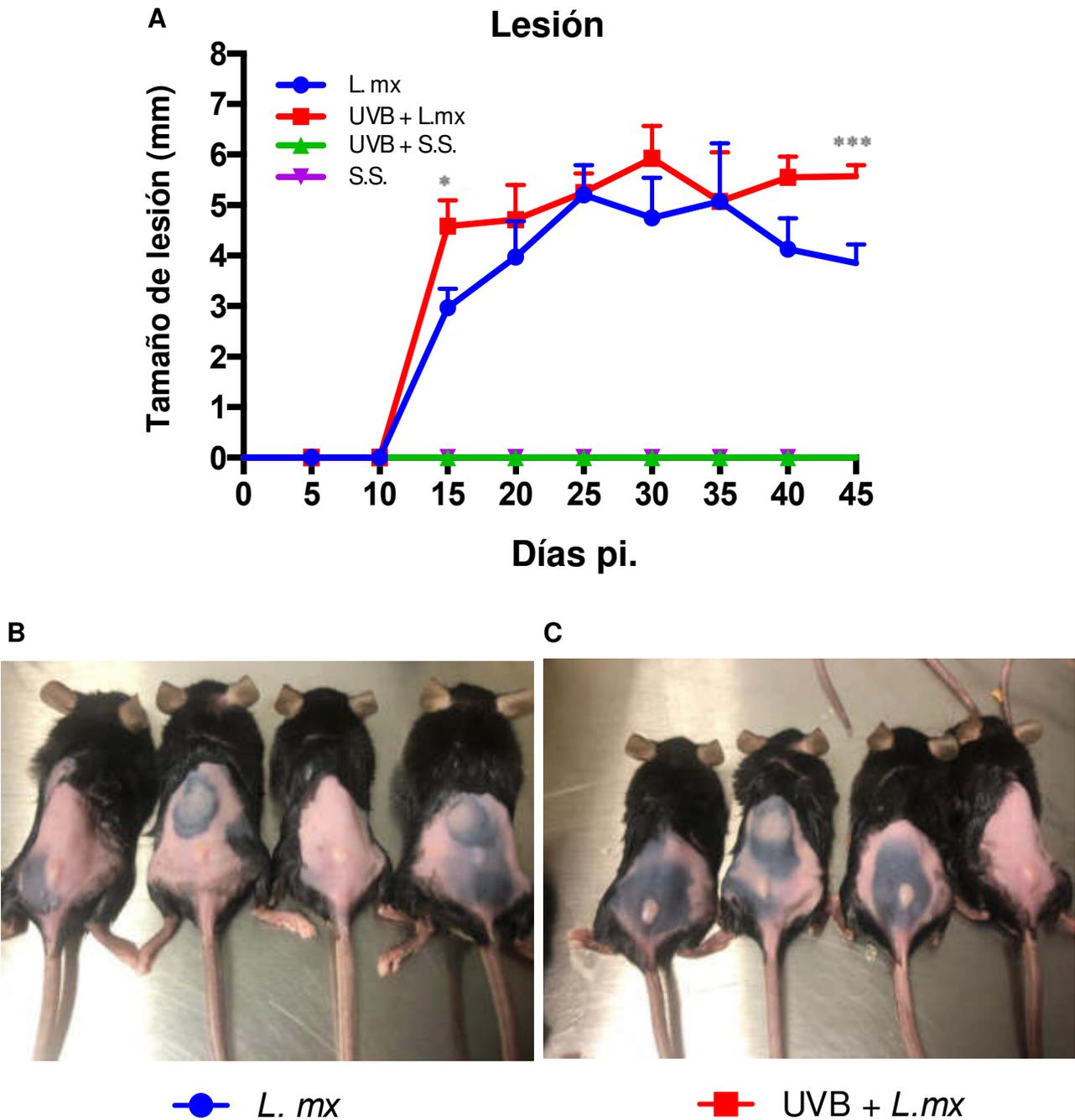


Figura 18. La radiación UVB aumenta la infección por *Leishmania mexicana*. Los ratones se irradiaron sobre piel rasurada y depilada, luego se infectaron con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana* en fase estacionaria. (A) El tamaño de la lesión se monitoreó cada cinco días. (B, C) Imagen representativa de

ratones infectados y ratones irradiados/infectados el día 45 después de la infección. Los datos son representativos de dos experimentos independientes y se expresan como la media  $\pm$  SE. \* P <0.05.

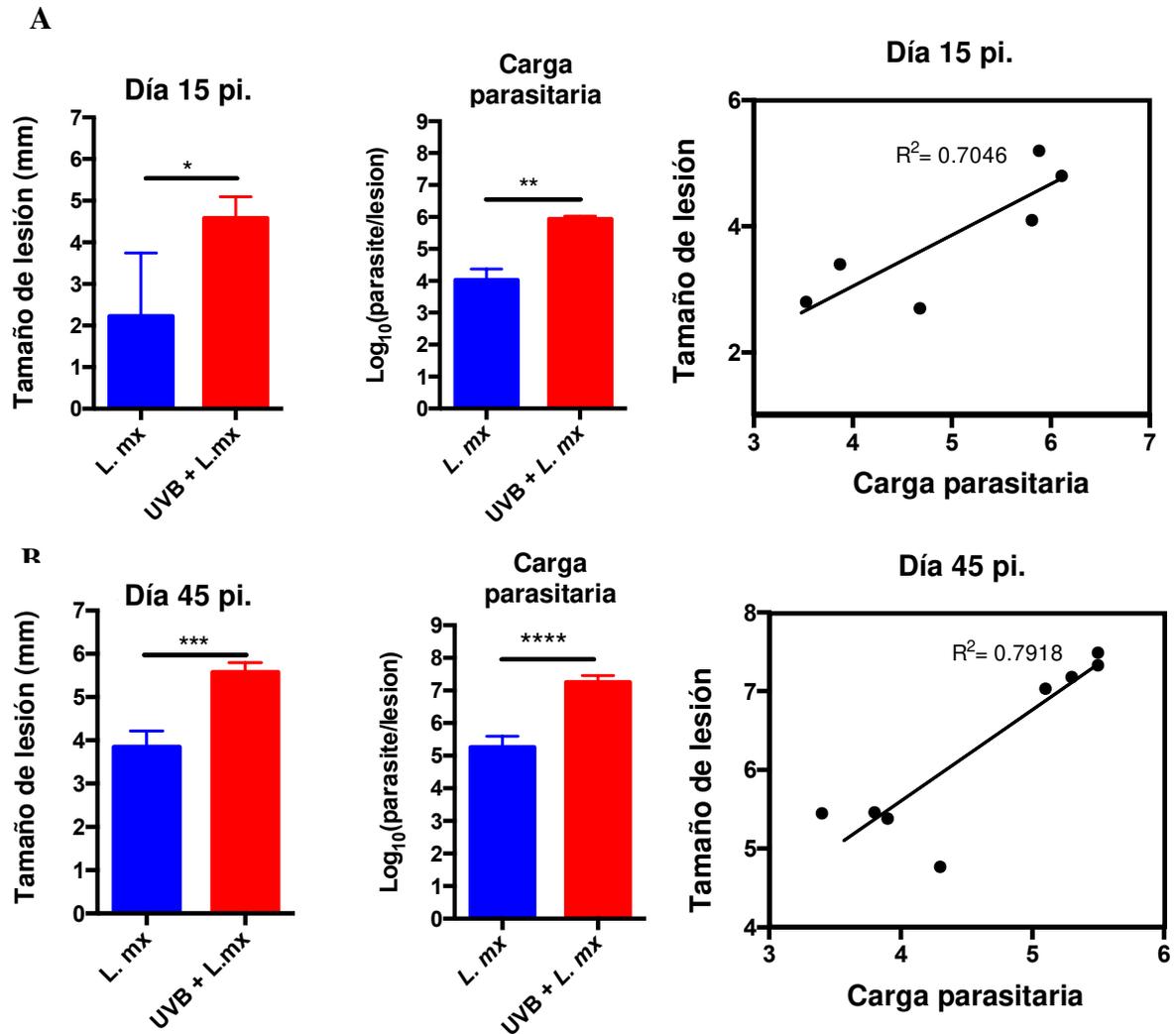


Figura 19. Correlación entre la carga de parásitos y el tamaño de la lesión. El tamaño y la carga de parásitos se estimó a los días 15 y 45 de la infección. Se realizó un análisis de correlación, 15 dpi \* p 0.0366, Pearson r 0.8394; 45 pdp \*\*p 0,0031, Pearson r 0,8898. Los datos son representativos de dos experimentos independientes y se expresan como la media  $\pm$  SE. \* P <0.05.

### **3.8 Expresión de T-bet, GATA3, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 e IL-4**

Se estimó la expresión relativa de los factores asociados a la respuesta polarizada Th1 y Th2 en el ganglio regional de los ratones irradiados/infectados y los que sólo fueron infectados a través de PCR en tiempo real. Esto se realizó durante una estancia de investigación en la Universidad Veracruzana, en el laboratorio de biotecnología ubicado en la ciudad de Orizaba. Como podemos observar únicamente el grupo de ratones irradiado presentó niveles de expresión mayores de T-bet con respecto al control, pero no hay diferencia entre los grupos irradiados/infectados y únicamente infectados (Fig. 20A). Cuando se analizó la expresión de citocinas a nivel global en el ganglio, observamos que ambos grupos presentan niveles elevados de expresión de IL-12, y no sólo eso, sino que los ratones irradiados presentaron niveles de expresión significativamente más altos que los ratones únicamente infectados, impactando directamente también en la expresión elevada de IFN- $\gamma$  (Fig. 20B). Sin embargo, ya se conoce que el control de la leishmaniosis cutánea en América es independiente de IL-12, por lo cual en nuestro modelo, aunque hubo expresión de IL-12 en ganglio, aún podemos ver el desarrollo de la lesión en el dorso del ratón.

### **3.9 Reacción de centro germinal**

Realizamos cortes histológicos y detectamos a las células B activadas utilizando PNA. Podemos observar una imagen representativa de cada grupo donde vemos los cúmulos de células B en proliferación en la zona de la corteza del ganglio en color rojo (Fig. 21A), este análisis de inmunohistoquímica nos permitió contar las reacciones de centros germinales por ganglio. Como podemos observar al día 15 no hay diferencia en la cantidad de estos centros, lo que correlaciona

con la producción global de IgG, donde al existir la misma cantidad de centros germinales, podemos observar de manera sistémica la misma cantidad relativa de anticuerpos IgG. Sin embargo, al día 45 observamos un aumento significativo en el score de los centros germinales en los ratones que fueron irradiados (Fig 21B).

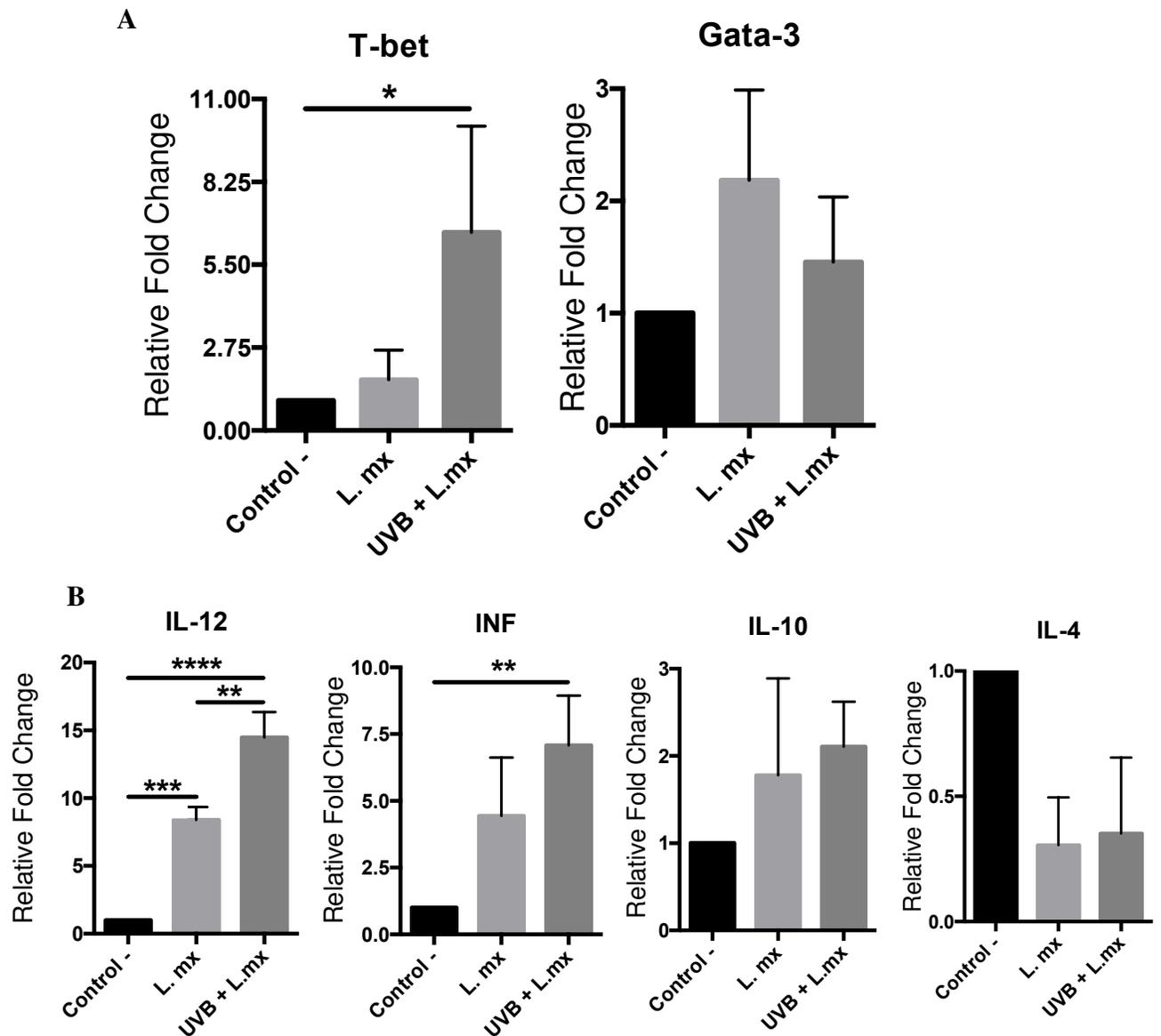


Figura 20. Expresión de factores asociados a la respuesta Th1 y Th2. Se cuantificó la expresión de T-bet, Gata3 y las principales citocinas por RTqPCR. Se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para calcular la expresión relativa. Como gen endógeno se utilizó GAPDH. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SE. \* P < 0.05.

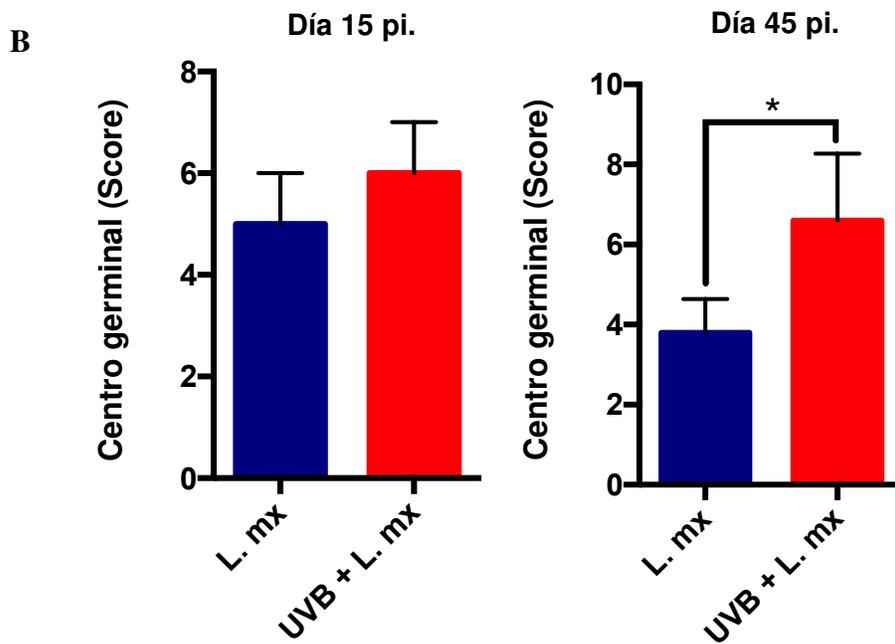
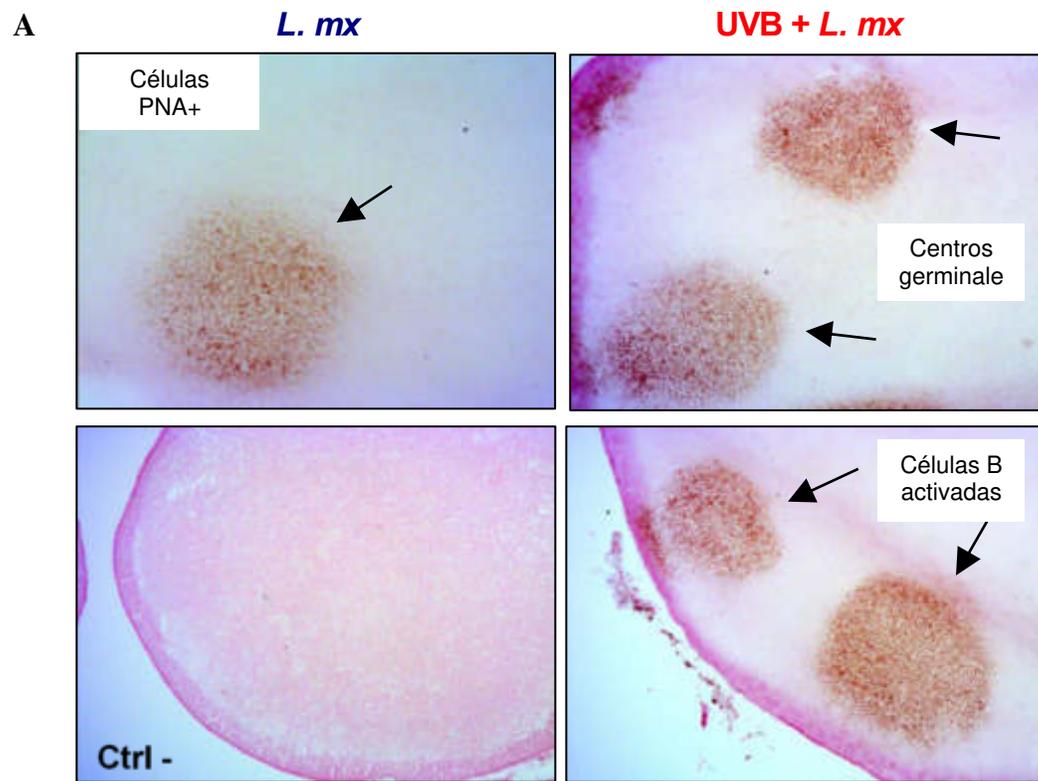


Figura 21. Centros germinales. (A) Se muestran las células PNA+ de los dos grupos de estudios. (B) Score de centros germinales por ganglio. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$ .

### 3.10 Cuantificación de linfocitos B

Se cuantificaron las células CD19+ a través de citometría de flujo y las dobles positivas para CD19+TLR2+ y CD19+IL10+ en el ganglio linfáticos de los ratones irradiados/infectados así como en aquellos que únicamente fueron infectados. Como podemos observar en la figura 22, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos de células analizadas.

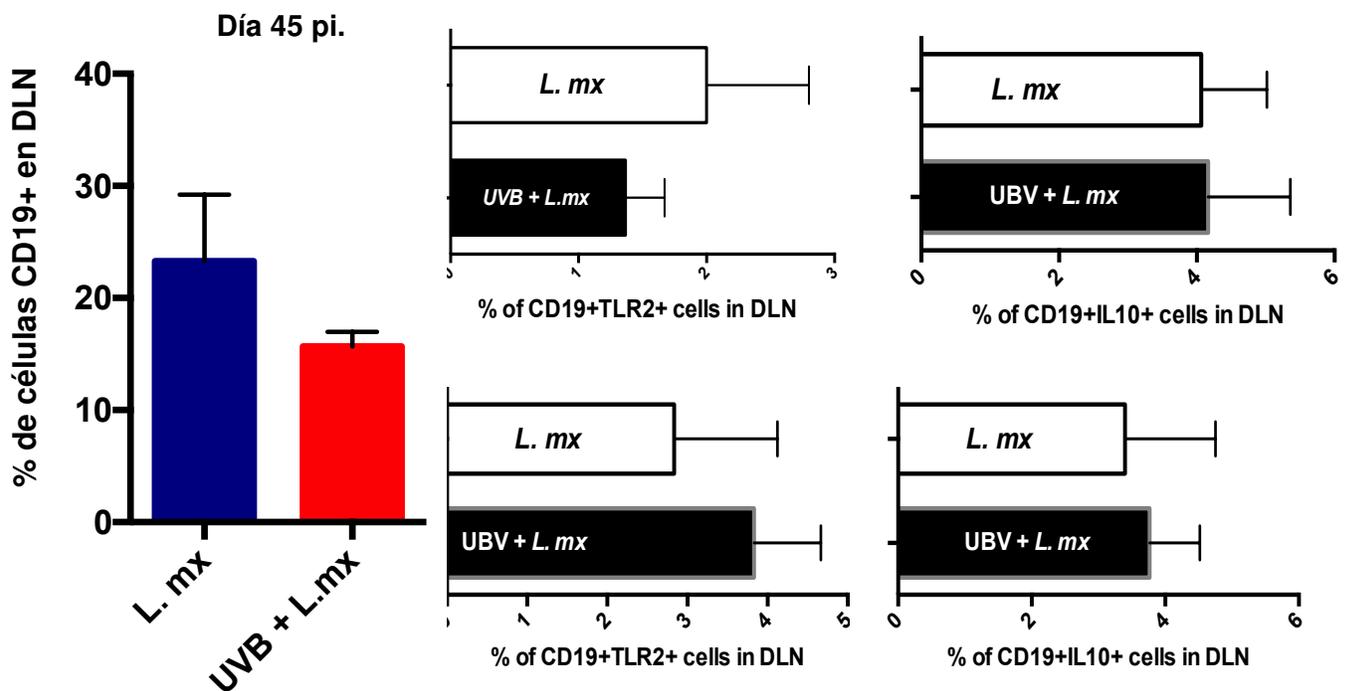


Figura 22. Cuantificación de linfocitos B. Porcentajes de células CD19+, CD19+TLR2+ y CD19+IL10+ en el ganglio linfático regional. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SE. \* P < 0.05.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

Aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la radiación ultravioleta como un factor de riesgo para la reactivación del virus del herpes y recomienda el uso de protector solar para evitarlo; diferentes estudios han evidenciado que algunos tipos específicos de VPH, incluidos VPH-5, VPH-8, VPH-20 y VPH-77 son activados por radiación UV. Además estudios epidemiológicos en individuos sanos han sugerido que la sobreexposición al sol conduce a la eventual transformación del virus del papiloma en cáncer de piel del tipo no melanoma.<sup>46,56-59</sup>. Estudios recientes en modelos animales demuestran que la radiación UVB favorece el desarrollo de papilomas y carcinoma de células escamosas, en ratones inmunocompetentes infectados con el virus del papiloma murino (MmuPV1)<sup>57</sup>. Además, la radiación UVB aumenta la morbilidad y la mortalidad en ratones infectados con el virus de la influenza, lo que sugiere que la radiación UV contribuye a la patogenia de la infección viral primaria<sup>60</sup>. Asimismo, los ratones irradiados con UVB y sensibilizados con *Borrelia burgdorferi* mostraron una respuesta de DTH inhibida y afecto la respuesta de anticuerpos, con exacerbación de la artritis en ratones<sup>61</sup>. La DTH es una reacción inmune caracterizada por una respuesta inflamatoria que macroscópicamente comienza 6-12 horas después de la administración del antígeno en individuos sensibilizados. El pico de reactividad se da entre 24-72 horas del contacto con el antígeno<sup>62</sup>. Cuando realizamos el ensayo de DTH en ratones C57BL/6 wild-type, demostramos de manera visual el infiltrado celular al sitio de inoculación del antígeno, donde a través de la tinción H&E se podía apreciar infiltrado leucocitario (Fig. 8). Este ensayo ha sido ampliamente utilizado para estimar el grado de supresión de la radiación UVB cuando se ensayan otros microorganismos<sup>63-66</sup>. En nuestro estudio con *Leishmania*

*mexicana*, después de la radiación UVB, la producción de anticuerpos IgG1 aumentó. Estos resultados opuestos se pueden explicar debido a que los patógenos son diferentes. Sin embargo, nuestros hallazgos concuerdan con el papel patogénico de los anticuerpos IgG1 descritos previamente por Buxbaum *et al.*, en la leishmaniasis cutánea experimental<sup>27,67-69</sup>. Al contrario del papel patogénico de los anticuerpos IgG1, los anticuerpos IgM anti-*L. mexicana* parecen jugar un papel protector. Proponemos que los anticuerpos IgM inducen protección en el grupo de ratones infectados debido a una menor carga de parásitos, una lesión cutánea más pequeña y una menor cantidad de anticuerpos IgG1 anti-*L. mexicana*. El papel preciso de los anticuerpos IgM anti-*L. mexicana* en la protección merece una mayor investigación. La protección de los anticuerpos IgM anti-*L. mexicana* sugerida en nuestros hallazgos está en concordancia con lo reportado previamente por Salinas *et al.*, utilizando un modelo de ratón actinomicetoma<sup>70</sup>.

La presencia de anticuerpos IgG específicos en ratones infectados sugiere que éstos se originan en una reacción del centro germinal en los DLN. La GC es fundamental para la inmunidad humoral dependiente de T contra patógenos extraños y la máxima expresión de la respuesta inmune adaptativa<sup>71</sup>. La activación de las células B en modelos de radiación UVB ya ha sido demostrada<sup>53</sup>. Aunque la respuesta deteriorada del centro germinal después de la radiación UVB se ha reportado en modelos de inmunización<sup>72,73</sup>, en nuestro modelo, la combinación de radiación UVB/*L. mexicana* da como resultado un perfil de respuesta inmune único, donde se observó la sobreestimulación de linfocitos B, lo que explica la correlación positiva entre el número de centros germinales en DLN y la respuesta de anticuerpos IgG. En apoyo a esta noción, Silva-Barrios *et al.* demostraron que la activación de las células B por *L. donovani* es responsable de la exacerbación de la enfermedad a través de la hipergammaglobulinemia y la producción de IL-10<sup>45</sup>.

Nosotros encontramos un elevado número de células IL-10+ en la epidermis de ratones infectados/irradiados por UVB en concordancia con resultados publicados anteriormente, donde la

IL-10 juega un papel crucial en la inmunosupresión por radiación UVB<sup>74,32,53,83,84</sup>. En los años 80 se evidenció la eficacia del tratamiento con dosis bajas de radiación UVB para tratar la leishmaniasis cutánea, pero en nuestros experimentos utilizamos una dosis inmunosupresora (dosis alta) de radiación UVB, lo que explica los hallazgos<sup>75-77</sup>. Además, hay que considerar que en la mayoría de los estudios sobre leishmaniasis cutánea, los ratones están infectados con *Leishmania major* y es evidente que *L. major* y *L. mexicana* tienen profundas diferencias en las respuestas inmunitarias, con una clara dicotomía Th1/Th2 en la infección por *L. major*, pero no en la infección por *L. mexicana*<sup>78</sup>. Si bien los ratones C57BL/6 no resuelven las infecciones por *L. mexicana*, controlan la lesión, a diferencia de la infección por *L. major*, donde los ratones son resistentes<sup>79</sup>. Por otro lado, los macrófagos parasitados predominan en las lesiones de los ratones infectados o irradiados por UVB, y la importancia de la IgG1 unida a la superficie de amastigotes para infectar macrófagos, a través del FcγRIII, ya ha sido demostrada in vivo<sup>69,80</sup>. Aunque en otros estudios ya se ha demostrado el efecto adverso de la radiación UVB sobre la leishmaniasis cutánea, este es el primer estudio donde se utilizó la especie *L. mexicana*<sup>81</sup>.

Estos hallazgos juntos demuestran que la activación de linfocitos B en DLN puede desencadenar una alta producción de IgG1, y la presencia de células IL10+ en la epidermis, permite la parasitosis de macrófagos, que se correlaciona con la exacerbación de la infección. Estos hallazgos sugieren que la radiación UVB puede activar algún mecanismo que conduce a la sobreactivación de la respuesta del centro germinal, después de la activación de los linfocitos B en los folículos de los ganglios linfáticos, como describieron previamente Scott *et al.*;<sup>53</sup> lo que predispone al ratón a desarrollar una infección menos controlada después de estar expuesto a la luz UVB.

Hasta la fecha, no existe evidencia científica que sugiera susceptibilidad a desarrollar leishmaniasis cutánea por *L. mexicana* con exposición a radiación ultravioleta<sup>56,82</sup>. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la radiación UVB es un agente inmunosupresor que facilita el

establecimiento y la exacerbación de la leishmaniasis cutánea experimental. Este trabajo abre un nuevo campo de investigación científica que puede conducir a dilucidar el grado de supresión de la radiación UV en la susceptibilidad humana a la infección por *Leishmania mexicana*.

## CONCLUUSIÓN

La radiación UVB exagera la lesión en la infección causada por *Leishmania mexicana*, mediante un mecanismo dependiente de los niveles elevados de IL-10 *in situ* y de los anticuerpos IgG1 sistémicos.

## ANEXOS

### Anexo I

**Buffer de dilución anticuerpo primario** (albumina sérica bovina 0.1%, azida de sodio 0.05%)

Para preparar 10 ml

- Se pesaron 0.01 gramos de albumina sérica bovina
- Se pesaron 0.005 gramos de azida de sodio (conservador)

Se diluyeron en 10 ml de PBS y se guardó a 4 °C

**Buffer de dilución anticuerpo secundario** (Tween<sup>20</sup> 0.05%)

Para preparar 10 ml

- Se diluyeron 5 µl de Tween<sup>20</sup> en 10 ml de PBS y se guardó a 4 °C

**Buffer de bloqueo** (cuando el anticuerpo secundario este hecho en cabra)

Suero de cabra 2%, albumina sérica bovina 1%, gelatina de pescado 0.1%, Tween<sup>20</sup> 0.05%, azida de sodio 0.05%

Para preparar 10 ml

- Para preparar 10 ml
- 200 µl de suero de cabra (también se pueden añadir 20 µl de suero de cabra y 180 µl de suero bovino fetal)
- 5 µl de Tween<sup>20</sup>
- 0.1 g de albumina sérica bovina
- 0.01 g de gelatina de pescado
- 0.005 g de azida de sodio

Se diluyeron en 9.8 ml de PBS y se guardó a 4 °C

**Buffer de bloqueo** (cuando el anticuerpo secundario este hecho en conejo)

Suero de conejo 2%, albumina sérica bovina 1%, gelatina de pescado 0.1%, Tween<sup>20</sup> 0.05%, azida de sodio 0.05%

Para preparar 10 ml

- Para preparar 10 ml
- 200 µl de suero de conejo (también se pueden añadir 20 µl de suero de conejo y 180 µl de suero bovino fetal)
- 5 µl de Tween<sup>20</sup>
- 0.1 g de albumina sérica bovina
- 0.01 g de gelatina de pescado
- 0.005 g de azida de sodio

Se diluyeron en 9.8 ml de PBS y se guardó a 4 °C

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 %**

Para preparar 10 ml

- 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%
- 0.01 g de azida de sodio (1%)

Se diluyeron en 10 ml de PBS y se guardaron a 4 °C

#### **Streptavidin-HRP (PK-6101)**

- Diluir 20 µl del reactivo A en 1 ml de PBS, inmediatamente añadir 20 µl del reactivo B, agitar vigorosamente en un vortex y dejar reposar 30 min antes de su uso a temperatura ambiente.

#### **ImmPACT Nova Red (SK-4805)**

Añadir a 5 ml del diluyente

- 80 µl del reactivo 1
- 50 µl del reactivo 2
- 50 µl del reactivo 3
- 80 µl del reactivo 4

Mezclar bien antes de su uso. Estable por 14 días a 4 °C.

#### **ImmPACT SG (SK-4705)**

Añadir a 5 ml del diluyente

90 µl del reactivo 1

120 µl del reactivo 2

#### **DAB Brown (SK-4105)**

Diluir 30 µl de DAB en 1 ml de diluyente

#### **PNA-Biotin (B-1075)**

Concentración de 5 mg/ml

Para una concentración final de 10 µg/ml

Se diluyeron 2 µl de PNA (Stock) en 1 ml de PBS

#### **Solución de bloqueo ELISA (Skim Milk 3%)**

- Disolver 0.6 g de leche descremada en 20 ml de agua bidestilada

#### **Solución de lavado ELISA**

Añadir 1 ml de Tween<sup>20</sup> en 999 ml de PBS

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO | Leishmaniasis. *WHO* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
2. WHO | Clinical forms of the leishmaniasis. *WHO* [http://www.who.int/leishmaniasis/clinical\\_forms\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/).
3. Killick-Kendrick, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* **17**, 279–289 (1999).
4. Salud, O. P. de la S. Informe Epidemiológico de las Américas. Leishmaniasis 2019. 8 (2019).
5. Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 873–882 (2007).
6. Leishmaniasis symptoms. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/leishmaniasis>.
7. Leishmaniasis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>.
8. Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. a. G., el-Hassan, I. M. & el-Hassan, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 87–98 (2003).
9. Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M. & Gilaberte, Y. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Actas Dermo-Sifiliográficas Engl. Ed.* doi:10.1016/j.adengl.2021.05.011.
10. Salud, S. de. LEISHMANIASIS. *gob.mx* <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/leishmaniasis>.
11. Leishmaniasis: Causes, Diagnosis, & Treatment. *Healthline* <https://www.healthline.com/health/leishmaniasis> (2012).
12. Salud, S. de. MANUAL PARA EL DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL DE

LAS LEISHMANIASIS. *gob.mx* <http://www.gob.mx/salud/documentos/manual-para-el-diagnostico-tratamiento-y-control-de-las-leishmaniasis>.

13. Schmitt, D. A., Owen-Schaub, L. & Ullrich, S. E. Effect of IL-12 on immune suppression and suppressor cell induction by ultraviolet radiation. *J. Immunol.* **154**, 5114–5120 (1995).
14. What Is Ultraviolet (UV) Radiation? <https://www.cancer.org/cancer/skin-cancer/prevention-and-early-detection/what-is-uv-radiation.html>.
15. WHO | UV radiation. *WHO* <http://www.who.int/uv/faq/whatisuv/en/>.
16. WHO | UV Index. *WHO* [http://www.who.int/uv/intersunprogramme/activities/uv\\_index/en/](http://www.who.int/uv/intersunprogramme/activities/uv_index/en/).
17. Clydesdale, G. J., Dandie, G. W. & Muller, H. K. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* **79**, 547–568 (2001).
18. Ullrich, S. E. & Byrne, S. N. The Immunologic Revolution: Photoimmunology. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 896–905 (2012).
19. WHO | Ultraviolet radiation. *WHO* [http://www.who.int/gho/phe/ultraviolet\\_radiation/en/](http://www.who.int/gho/phe/ultraviolet_radiation/en/).
20. Baes, F. *hps.org. Health Physics Society* <http://hps.org/>.
21. Mosser, D. M. & Zhang, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* **226**, 205–218 (2008).
22. O’Garra, A. & Vieira, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 425–428 (2007).
23. Fillatreau, S., Gray, D. & Anderton, S. M. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 391–397 (2008).
24. Ryan, J. J. *et al.* Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease. *Crit. Rev. Immunol.* **27**, 15–32 (2007).
25. Williams, L. M., Ricchetti, G., Sarma, U., Smallie, T. & Foxwell, B. M. J. Interleukin-10

- suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* **113**, 281–292 (2004).
26. Buxbaum, L. U. & Scott, P. Interleukin 10- and Fc $\gamma$  Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. *Infect. Immun.* **73**, 2101–2108 (2005).
  27. Thomas, B. N. & Buxbaum, L. U. Fc $\gamma$ RIII Mediates Immunoglobulin G-Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions. *Infect. Immun.* **76**, 623–631 (2008).
  28. Rodríguez-Serrato, M. A., Salinas-Carmona, M. C. & Limón-Flores, A. Y. Immune response to *Leishmania mexicana*: the host–parasite relationship. *Pathog. Dis.* **78**, (2020).
  29. 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).
  30. Byrne, S. N., Limón-Flores, A. Y. & Ullrich, S. E. Mast cell migration from the skin to the draining lymph nodes upon UV-irradiation represents a key step in the induction of immune suppression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 4648–4655 (2008).
  31. Chacón-Salinas, R. *et al.* An essential role for platelet-activating factor in activating mast cell migration following ultraviolet irradiation. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 139–148 (2014).
  32. 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. Baltim. Md 1950* **186**, 25–31 (2011).
  33. Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* CJN.09430915 (2015) doi:10.2215/CJN.09430915.
  34. Harwood, N. E. & Batista, F. D. Early events in B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 185–210 (2010).
  35. Kläsener, K., Maity, P. C., Hobeika, E., Yang, J. & Reth, M. B cell activation involves

nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk. *eLife* **3**, e02069 (2014).

36. Lewis, G. K., Goodman, J. W. & Ranken, R. Activation of B cell subsets by T-dependent and T-independent antigens. *Adv. Exp. Med. Biol.* **98**, 339–356 (1978).
37. Naradikian, M. S., Scholz, J. L., Oropallo, M. A. & Cancro, M. P. Understanding B Cell Biology. in *Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases* (eds. Bosch, X., Ramos-Casals, M. & Khamashta, M. A.) 11–35 (Springer Basel, 2014). doi:10.1007/978-3-0348-0706-7\_2.
38. Harris, D. P. *et al.* Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* **1**, 475–482 (2000).
39. Menezes Cabral, S. *et al.* A *Leishmania infantum* cytosolic trypanothione synthase activates B cells to secrete interleukin-10 and specific immunoglobulin. *Immunology* **123**, 555–565 (2008).
40. Ronet, C. *et al.* Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 886–894 (2010).
41. Arcanjo, A. F. *et al.* The PGE2/IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* Infection. *PLoS ONE* **10**, (2015).
42. Arcanjo, A. F. *et al.* B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. *World J. Biol. Chem.* **8**, 151–162 (2017).
43. 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**, 177–188 (2006).
44. Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. B. & Mosser, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J. Exp. Med.* **201**, 747–754 (2005).
45. Silva-Barrios, S. *et al.* Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. *Cell Rep.* **15**, 2427–2437 (2016).

46. Bankoti, R., Gupta, K., Levchenko, A. & Stäger, S. Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 3961–3971 (2012).
47. Montes, C. L., Zuñiga, E. I., Vazquez, J., Arce, C. & Gruppi, A. Trypanosoma cruzi mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 27–36 (2002).
48. Montes, C. L., Vottero-Cima, E. & Gruppi, A. Trypanosoma cruzi cytosolic alkaline antigens (FI) induce polyclonal activation in murine normal B cells. *Scand. J. Immunol.* **44**, 93–100 (1996).
49. Hunziker, L. *et al.* Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat. Immunol.* **4**, 343–349 (2003).
50. Montes, C. L., Acosta-Rodríguez, E. V., Merino, M. C., Bermejo, D. A. & Gruppi, A. Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? *J. Leukoc. Biol.* **82**, 1027–1032 (2007).
51. Lohoff, M., Matzner, C. & Röllinghoff, M. Polyclonal B-cell stimulation by L3T4+ T cells in experimental leishmaniasis. *Infect. Immun.* **56**, 2120–2124 (1988).
52. Deak, E. *et al.* Murine Visceral Leishmaniasis: IgM and Polyclonal B-Cell Activation Lead to Disease Exacerbation. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1355–1368 (2010).
53. Byrne, S. N. & Halliday, G. M. B cells activated in lymph nodes in response to ultraviolet irradiation or by interleukin-10 inhibit dendritic cell induction of immunity. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 570–578 (2005).
54. Alexander, J., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. Leishmania mexicana Cysteine Proteinase-Deficient Mutants Have Attenuated Virulence for Mice and Potentiate a Th1 Response. *J. Immunol.* **161**, 6794–6801 (1998).
55. Statistical Method in Biological Assay. By D. J. Finney. Hafner Publishing Co., New York,

1952. Illustrated. xix + 661 pp. 22 × 15 cm. Price \$11. *J. Am. Pharm. Assoc.* **42**, 325–325 (1953).
56. WHO | The known health effects of UV. *WHO* <http://www.who.int/uv/faq/uvhealthfac/en/>.
57. Michel, A., Kopp-Schneider, A., Zentgraf, H., Gruber, A. D. & de Villiers, E.-M. E6/E7 Expression of Human Papillomavirus Type 20 (HPV-20) and HPV-27 Influences Proliferation and Differentiation of the Skin in UV-Irradiated SKH-hr1 Transgenic Mice. *J. Virol.* **80**, 11153–11164 (2006).
58. Akgül, B., Lemme, W., García-Escudero, R., Storey, A. & Pfister, H. J. UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *Arch. Virol.* **150**, 145–151 (2005).
59. Purdie, K. J. *et al.* The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J.* **18**, 5359–5369 (1999).
60. Ryan, L. K., Copeland, L. R., Daniels, M. J., Costa, E. R. & Selgrade, M. J. K. Proinflammatory and Th1 cytokine alterations following ultraviolet radiation enhancement of disease due to influenza infection in mice. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **67**, 88–97 (2002).
61. Brown, E. L. *et al.* Modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* by ultraviolet irradiation: Differential effect on Th1 and Th2 immune responses. *Eur. J. Immunol.* **25**, 3017–3022.
62. Vohr, H.-W. Delayed-Type Hypersensitivity. in *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology* (eds. Assenmacher, M. *et al.*) 192–194 (Springer, 2005). doi:10.1007/3-540-27806-0\_366.
63. Brown, E. L., Ullrich, S. E., Pride, M. & Kripke, M. L. The Effect of UV Irradiation on Infection of Mice with *Borrelia burgdorferi*. *Photochem. Photobiol.* **73**, 537–544 (2001).
64. Denkins, Y., Fidler, I. J. & Kripke, M. L. Exposure of mice to UV-B radiation suppresses

- delayed hypersensitivity to *Candida albicans*. *Photochem. Photobiol.* **49**, 615–619 (1989).
65. Kim, T. H., Ullrich, S. E., Ananthaswamy, H. N., Zimmerman, S. & Kripke, M. L. Suppression of delayed and contact hypersensitivity responses in mice have different UV dose responses. *Photochem. Photobiol.* **68**, 738–744 (1998).
66. 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**, 3865–3871 (1992).
67. 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).
68. Buxbaum, L. U. & Thomas, B. N. IgG1, but not IgG2a/c, is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection (133.18). *J. Immunol.* **182**, 133.18-133.18 (2009).
69. Buxbaum, L. U. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection. *Immunol. Res.* **42**, 197–209 (2008).
70. Gonzalez-Suarez, M. L., Salinas-Carmona, M. C. & Pérez-Rivera, I. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **57**, 17–24 (2009).
71. Gatto, D. & Brink, R. The germinal center reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 898–907 (2010).
72. Racine, R. *et al.* Impaired Germinal Center Responses and Suppression of Local IgG Production during Intracellular Bacterial Infection. *J. Immunol.* **184**, 5085–5093 (2010).
73. 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. Baltim. Md 1950* **186**, 25–31 (2011).

74. Beissert, S. *et al.* Impaired Immunosuppressive Response to Ultraviolet Radiation in Interleukin-10–Deficient Mice. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 553–557 (1996).
75. Giannini, M. S. Suppression of pathogenesis in cutaneous leishmaniasis by UV irradiation. *Infect. Immun.* **51**, 838–843 (1986).
76. Giannini, S. H. & De Fabo, E. C. Abrogation of Skin Lesions in Cutaneous Leishmaniasis by Ultraviolet B Irradiation. in *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control* (ed. Hart, D. T.) 677–684 (Springer US, 1989). doi:10.1007/978-1-4613-1575-9\_83.
77. Hoseinipoor, F. *et al.* The Effect of Sun Radiation on the Course of Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **14**, 145–150 (2011).
78. Fischer, M. R. *et al.* Animal Model for Cutaneous Leishmaniasis. in *Molecular Dermatology* 389–402 (Humana Press, Totowa, NJ, 2013). doi:10.1007/978-1-62703-227-8\_26.
79. Alexander, J. & Kaye, P. M. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin. Exp. Immunol.* **61**, 674–682 (1985).
80. Chu, N., Thomas, B. N., Patel, S. R. & Buxbaum, L. U. IgG1 Is Pathogenic in *Leishmania mexicana* Infection. *J. Immunol.* **185**, 6939–6946 (2010).
81. Giannini, S. H. Effects of ultraviolet B irradiation on cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today Pers. Ed* **8**, 44–48 (1992).
82. WHO | Ultraviolet radiation and health. *WHO* [http://www.who.int/uv/uv\\_and\\_health/en/](http://www.who.int/uv/uv_and_health/en/).
83. Nishigori, C. *et al.* Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10354–10359 (1996).
84. Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V. W. & Ullrich, S. E. A Cytokine Cascade Including Prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 Is Responsible for UV-Induced Systemic Immune Suppression. *J. Immunol.* **160**, 3783–3789 (1998).

