



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización de un modelo celular diseñado para el tamizaje genético mediante RNA de interferencia en el complejo macrófago – infectado por *Leishmania braziliensis*

Clemencia Ovalle Bracho

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bogotá, Colombia

2015

**CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO CELULAR DISEÑADO PARA EL
TAMIZAJE GENÉTICO MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA EN EL
COMPLEJO MACRÓFAGO – INFECTADO POR *Leishmania (Viannia)*
*braziliensis***

Clemencia Ovalle Bracho

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: PhD en
Ciencias Biomédicas**

Director: Carlos Clavijo Ramírez PhD

Grupos de Investigación:

**Modelamiento y Control de Sistemas Biológicos. Universidad Nacional
Dermatología Tropical, Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta**

Miembros del Comité Tutorial:

**Orlando Chaparro, Ph.D
Universidad Nacional de Colombia**

**Martha Quiñones, Ph.D
Universidad Nacional de Colombia**

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de medicina
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Bogotá, Colombia
2015**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - DCBM

Caracterización de un modelo celular diseñado para el tamizaje genético mediante RNA de interferencia en el complejo macrófago – infectado por *Leishmania braziliensis*

Clemencia Ovalle Bracho

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Ciencias Biomédicas

Marcela Camacho, Ph.D.
Jurado

Omar Triana, Ph.D.
Jurado

Vladimir Corredor, Ph.D.
Jurado

Carlos Clavijo Ramírez, Ph.D.
Director

*A quienes inspiran mi pasión
por la investigación: los pacientes.*

Caracterización de un modelo celular diseñado para el tamizaje genético mediante RNA de interferencia en el complejo macrófago – infectado por *Leishmania braziliensis*

Palabras clave: Interferencia de ARN, Macrófagos, *Leishmania braziliensis*, Línea celular U937

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por diferentes especies de parásitos del género *Leishmania*. En el desarrollo de la enfermedad el establecimiento de la infección es obligatorio y se da en parte, por la supervivencia y replicación del parásito en el macrófago. Por lo anterior es importante estudiar los mecanismos moleculares implicados en la interacción macrófago-*Leishmania*. La mayoría de los trabajos realizados sobre el efecto de la infección de *Leishmania* en la expresión de genes del macrófago se ha desarrollado con especies del subgénero *Leishmania* y en momentos iniciales de la infección. El objetivo de este trabajo fue identificar en la etapa del establecimiento de la infección, los genes y los procesos biológicos del macrófago potencialmente importantes en la interacción macrófago - *L. braziliensis* y caracterizar un modelo celular que permita la evaluación funcional de los genes identificados. El perfil de expresión de genes diferencialmente expresados entre macrófagos no infectados e infectados, se determinó por ensayos de microarreglos y los procesos biológicos por análisis de enriquecimiento funcional.

Se evaluó el modelo celular: macrófagos derivados de la línea celular U937, en términos de su capacidad para ser modificado genéticamente, permitir el silenciamiento de genes por RNA de interferencia (shRNA) y permitir la identificación de cambios fenotípicos de infección, causados por dicho silenciamiento genético.

Para lo anterior se expresó y silenció el gen gfp y se silenciaron los genes *lmna* y *gro-β*. El silenciamiento de los genes fue evaluado midiendo los niveles de expresión de la proteína por western blot y el efecto del silenciamiento, evaluando el fenotipo de infección de los macrófagos en términos de carga parasitaria y porcentaje de macrófagos infectados en las líneas silenciadas y en las líneas control. El proceso de silenciamiento fue exitoso para los tres genes estudiados obteniendo reducción del 88.9% en los niveles de GFP, del 87,5% en los niveles de LMNA y del 74,4% para Gro-β. El modelo celular permitió evidenciar cambios en la susceptibilidad de la infección de los macrófagos infectados por *L. braziliensis*, como consecuencia del silenciamiento genético. Los ensayos de microarreglos permitieron identificar 218 genes diferencialmente expresados entre macrófagos no infectados e infectados con *L. (V.) braziliensis*, y con base en los ensayos de enriquecimiento funcional se determinó que la biosíntesis de esteroides, específicamente la del colesterol era el principal proceso asociado. Los genes asociados a la biosíntesis del colesterol estaban regulados negativamente. Este es el primer estudio que reporta el perfil de expresión génica de macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis* y el proceso biológico principalmente asociado durante el establecimiento de la infección.

Characterization of a cell model designed for genetic screening by RNA interference in macrophage infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Key Words: Gene silencing, RNA interference, *Leishmania braziliensis*, Macrophages, U937 cells

The leishmaniasis are a group of diseases caused by different species of parasites of the genus *Leishmania*. In the development of the disease the establishment of infection is mandatory and is given partially by the survival and replication of the parasite in the macrophage. Therefore, it is important to study the molecular mechanisms involved in the interaction of macrophage-*Leishmania*. Most of the work carried out on the effect of *Leishmania* infection in macrophage gene expression has been developed with species of the subgenus *Leishmania* and early moments of infection. The objective of this study was to identify, in the time of the establishment of infection, the macrophage's genes and biological processes potentially important in the interaction macrophage - *L. (V.) braziliensis*; and characterize a cellular model that allows the functional evaluation of the genes identified. The expression profile of genes differentially expressed between macrophages uninfected and infected was determined by microarrays assays and biological processes by performance of functional enrichment analysis. The cellular model was assessed in terms of its ability to be genetically modified, if it allows gene silencing by RNA interference (shRNA) and if it allows the identification of phenotypic changes of infection, caused by gene silencing.

In order to evaluate the parameters mentioned above, expression and silencing of *gfp* gene was performed as well as silencing of *Imna* and *gro-β* genes. The silencing of these genes was assessed by measuring the levels of protein expression by western blot and the effect of silencing process was evaluated identifying the phenotype of infection of macrophages in terms of parasite load and percentage of macrophages infected in silenced lines and control lines. The silencing process was successful for the three genes studied to obtaining reduction of 88.9% in levels of GFP, 87.5% in levels of LMNA and 74.4% to Gro-β. The cell model allowed identification of changes in the susceptibility of infection of macrophages infected by *L. (V.) braziliensis*, as a result of the gene silencing. The microarray assays helped identify 218 differentially expressed genes between macrophages uninfected and infected with *L. (V.) braziliensis*. Functional enrichment analysis determined that the biosynthesis of sterols, specifically the cholesterol, was the main associated process. The genes associated with cholesterol biosynthesis were down-regulated. This is the first study that reports the profile of gene expression in macrophages infected with *L. (V.) braziliensis* and the main biological process associated during the establishment of the infection.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	4
Lista de tablas.....	8
Lista de figuras	9
Lista de símbolos y abreviaturas.....	10
1. Introducción	14
2. Marco teórico	17
2.1. Leishmaniasis un problema de salud pública	17
2.2. Interacción macrófago- <i>Leishmania</i>	18
2.3. Evaluación funcional de genes en leishmaniasis	23
3. Pregunta de investigación	25
4. Objetivos	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. Estrategias para el cumplimiento de los objetivos -	25
6. Materiales y métodos	26
6.1. Procedimientos generales	26
6.2. Caracterización del modelo celular	30
6.2.1. Expresión de un gen exógeno	30
6.2.2. Evaluación de la expresión del gen exógeno	32
6.2.3. Caracterización de la línea expresando el gen exógeno <i>gfp</i>	32
6.2.4. Silenciamiento del gen exógeno <i>gfp</i>	32
6.2.5. Generación de controles negativos del proceso de silenciamiento	33
6.2.6. Evaluación del silenciamiento	36
6.3. Determinación del efecto del silenciamiento de un gen endógeno	38
6.4. Determinación del efecto del silenciamiento del gen <i>gro-β</i>	39
6.5. Identificación de genes expresados diferencialmente	44
6.5.1. Validación de los niveles de expresión por PCR cuantitativa (qPCR).	46
6.6. Análisis estadístico	49
7. Resultados	49
7.1. Determinación del momento de la replicación de amastigotes	49
7.2. Determinación del efecto de la expresión y silenciamiento de un gen exógeno	50
7.2.1. Expresión de un gen exógeno: <i>gfp</i>	50
7.2.2. Caracterización de la línea expresando GFP	51
7.2.3. Silenciamiento del gen exógeno	52
7.2.4. Evaluación del fenotipo de infección de la línea silenciada para <i>gfp</i>	53
7.3. Determinación del efecto del silenciamiento de un gen endógeno	54
7.4. Determinación del efecto del silenciamiento del gen <i>gro-β</i> en el fenotipo	57
7.4.1. Identificación de genes diferencialmente expresados	57
7.4.2. Validación de los niveles de expresión por PCR cuantitativa (qPCR)	57
7.4.3. Silenciamiento del gen <i>gro-β</i>	58
7.4.4. Evaluación del fenotipo de infección de la línea silenciada para <i>gro-β</i>	59
7.5. Resultados de los ensayos de microarreglos	60
7.5.1. Expresión global de genes de macrófagos infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i>	60

7.5.2	Identificación de entidades biológicas	62
8.	Discusión de resultados	65
8.1.	Caracterización del modelo celular	65
8.2.	Expresión de genes de macrófagos en respuesta a la infección	68
8.3.	Entidades biológicas asociadas a la interacción macrófago- <i>L.(V.) braziliensis</i>	69
8.4.	Propuesta de un modelo	71
9.	Conclusiones	74
10.	Proyecciones	74
11.	Aspectos éticos	76
12.	Anexos	76
13.	Bibliografía	85

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones de adquisición de fotografías para cada fluorocromo.	28
Tabla 2: Rangos empleados en la configuración de <i>CellProfiler</i> ®	29
Tabla 3. Secuencias de shRNA no relacionados, empleadas como control negativo	33
Tabla 4. Condiciones de inmuno-detección empleadas para la detección de la proteína GFP	37
Tabla 5. Condiciones de inmuno-detección empleadas para la detección de la proteína LMNA	39
Tabla 6. Secuencias de shRNAs dirigidos contra el gen <i>gro-β</i>	40
Tabla 7. Condiciones de inmuno-detección empleadas para la detección de la proteína Gro-β	44
Tabla 8. Condiciones de amplificación de los genes seleccionados	48
Tabla 9. Valores de porcentaje de infección y carga parasitaria	53
Tabla 10. Valores de porcentaje de infección y carga parasitaria	55
Tabla 12. Valores de porcentaje de infección y carga parasitaria	60

Lista de figuras

Figura 1. Configuración del programa <i>CellProfiler</i> ®, pasos para el análisis de las imágenes	29
Figura 2. Perfil térmico. Configuración para realizar la qPCR,	48
Figura 3. Evaluación de la carga parasitaria de macrófagos infectados	50
Figura 4. Células U937 expresando la proteína verde fluorescente y cinética de crecimiento.	51
Figura 5. Porcentaje de diferenciación de las líneas celulares U937-GFP y U937.	52
Figura 6. Comparación de la expresión de GFP en diferentes líneas celulares	52
Figura 7. Resultados de la evaluación funcional: LMNA.	54
Figura 8. Evaluación del silenciamiento del gen LMNA.	55
Figura 10. Niveles de expresión por qPCR del gen <i>CXCL2</i> (<i>gro-β</i>)	58
Figura 11. Evaluación del silenciamiento del gen <i>gro-β</i>	59
Figura 12. Resultados de la evaluación funcional de las diferentes líneas celulares gen <i>gro-β</i>	60
Figura 13 Niveles de expresión de los genes detectados por los ensayos de microarreglos	61
Figura 14. Validación por RT-qPCR	62
Figura 15. Análisis de enriquecimiento funcional	63
Figura 16. Genes expresados diferencialmente en la vía de biosíntesis del colesterol	64
Figura 17. Modelo propuesto	72

Lista de abreviaturas

Abreviatura: término en inglés (término en español)

ADP: *adenosine diphosphate* (Difosfato de adenosina).
ANOVA: *analysis of variance* (Análisis de varianza)
ATPase: *adenosine triphosphatase* (Adenosin trifosfatasa).
B2M: *beta-2-microglobulin* (β -2-microglobulina)
BCL6: *B-cell lymphoma 6* (proteína 6 del linfoma de células B)
BM: *bone marrow* (médula ósea)
C3b: complement component 3 (Fracción 3 del complemento)
C3bi: *inactive complement protein fragment* (fracción 3 inactiva del complemento)
CARD15: *caspase recruitment domain family, member 15* (miembro 15 de la familia de las caspasas con dominio de reclutamiento)
CARD6: *caspase recruitment domain family, member 6* (miembro 6 de la familia de las caspasas con dominio de reclutamiento).
cDNA: complementary DNA (ADN complementario)
CR1: *complement receptor 1* (Receptor 1 del complemento)
CR3: *complement receptor 3* (receptor 3 del complemento)
CSF-1: *colony stimulating factor 1* (factor estimulante de colonia 1)
CXCL2: *chemokine (C-X-C motif) ligand 2* (quimiocina ligando 2)
DHR: *1,2,3 dihidrorodamina* (1, 2, 3 dehidrorodamina)
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco)
DNAasa: deoxyribonuclease (Desoxirribonucleasa)
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* (Análisis de inmunoabsorción ligada a las enzimas).
FnRs: (*fibronectine receptors*) receptor de fibronectina
GFP: *green fluorescent protein* (Proteína verde fluorescente)
GNB2L1: *guanine nucleotide binding protein (G protein), β polypeptide 2-like 1* (Proteína de unión a guanina, polipéptido 2- β tipo 1)
Gp63: *glycoprotein 63* (glicoproteína 63)
Gp91: *glycoprotein 91* (glicoproteína 91)
Gro- β : *growth-regulated protein β* (Proteína reguladora del crecimiento β)
H-2M α : *Mus musculus MHC class II MMB1p protein*, endocytosis related (proteína MMB1p de *Mus musculus* de la familia MCH-II relacionada)
HLX1: *H2.0-like homeobox*, factor de transcripción tipo H20, homeobox 1
HMC: *major histocompatibility complex* (Complejo mayor de histocompatibilidad)
HRP: *horseradish peroxidase* (peroxidasa de rábano)
HSP70: *Heat shock protein 70* (Proteína de choque térmico 70)
ID3: DNA-binding protein inhibitor ID-3 (proteína 3, inhibidora de unión a ADN)
IFN- β : *interferon β* (Interferón - β)
IFU: *infectious units* (unidades infectivas)
IL-4: interleukin 4 (Interleucina 4)

IL-10: Interleukin 10 (Interleucina 10)

IL-12: interleukin 12 (Interleucina 12)

IL-12p40: *Interleukin 12 subunit beta* (Subunidad p40 de la interleucina 12)

IL-4R-alpha: *interleukin-4 receptor subunit alpha* (Subunidad α del receptor de interleucina 4)

INF- γ : *Interferon- γ* (Interferón γ)

iNOS: *inducible nitric oxide synthase* (sintasa inducible del óxido nítrico)

INSIG1: *insulin induced gene 1* (gen 1 inducido por insulina)

IPA: Ingenuity Pathway Analysis

IRF7: *Interferon regulatory factor 7* (Factor regulador de interferón 7)

JAK 1: *Janus kinase 1* (Kinasa Janus 1)

JAK 2: *Janus kinase 2* (Kinasa Janus 2)

K.O: *knock-out*

LAMP-1: *lysosomal-associated membrane protein 1* (Proteína 1 de membrana, asociada al lisosoma)

LB: *Luria Bertani medium* (Medio de cultivo Luria Bertani)

LCF: *Leishmania chemotactic factor* (Factor quimiotáctico de Leishmania)

LMNA: *lamin A/C* (lámina A/C)

LPG: Lipophosphoglycan (Lipofosfoglicano)

LPS: Lipopolysaccharide (Lipopolisacárido)

LXR α : Liver X receptor alpha (Receptor X alfa del hígado)

LXR β : Liver X receptor betha (Receptor X beta del hígado)

MaFB: *v-maf avian musculo-aponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B* (Oncogen homólogo B de fibrosarcoma musculo-aponeurótico)

MAP kinase: *mitogen-activated protein kinase* (Proteína kinasa activada por mitógenos)

MARCKS: *myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate* (sustrato miristilado de la proteína kinasa C, rico en alanina)

MBMM: *mouse primary bone marrow macrophages*, macrófagos derivados de monocitos de medula ósea.

MDM: *monocyte-derived macrophages* (macrófagos derivados de monocitos)

MEF2: *myocyte enhancer factor-2* (Factor 2, potenciador de miocitos)

MIP1 α : *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (proteína inflamatoria de macrófago 1 α)

MIP1 β : *macrophage inflammatory protein 1 beta* (proteína inflamatoria de macrófago 1 β)

miRNA: RNA micro

MR: *manose receptor* (receptor de manosa)

MOI: *multiplicity of infection* (multiplicidad de infección)

mRNA: *messenger RNA* (RNA mensajero)

MYD88: *myeloid differentiation primary response 88* (proteína mielóide de respuesta primaria de diferenciación, 88)

NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase* (enzima de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida)

NBT: *nitro blue tetrazolium* (Nitroazul de tetrazolio)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

NFIL3: *nuclear factor, interleukin 3 regulated* (Factor nuclear regulador de interleucina 3)

NF-kB: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas)

NK: *natural killer* (célula natural agresora)

NLRP2: NLR family, pyrin domain containing 2 (Miembro 2 de la familia NLR con dominio conteniendo pirina)

NLRP3: NLR family, pyrin domain containing 2 (Miembro 3 de la familia NLR con dominio conteniendo pirina)

NLRP11: *NLR family, pyrin domain containing 11* (Miembro 11 de la familia NLR con dominio conteniendo pirina)

NLRP12: *NLR family, pyrin domain containing 12* (Miembro 12 de la familia NLR con dominio conteniendo pirina)

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

NOX: *NADPH oxidase* (oxidasa de NADPH)

Nur77: *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1*, receptor nuclear 1 del grupo A de la subfamilia 4

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBM: *peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleares de sangre periférica)

PBS: *phosphate buffered saline* (solución amortiguadora salina fosfatada)

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate* (forbol-12-miristato-13-acetato)

Prf1: *perforin 1, pore forming protein* (perforina 1, proteína formadora de poros 1)

PVDF: *polyvinylidene fluoride* (fluoruro de polivinilideno)

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa)

Rag1: Recombination activating gene 1 (Gen activante de recombinación 1)

Rag2: Recombination activating gene 2 (Gen activante de recombinación 2)

RLFP: Restriction fragment length polymorphism (Fragmentos de restricción de polimorfismos de longitud)

RMA: Robust Multichip Average

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium (Medio de cultivo del Instituto Roswell Park Memorial)

RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis con gel de poliacrilamida en presencia de sulfato dodecil de sodio)

FBS :*fetal bovine serum* (suero fetal bovino)

shRNA: *short hairpin RNA* (RNA horquillado corto)

siRNA: *small interfering RNA* (RNA interferente corto)

SNARE: *soluble N-ethylmaleimide sensitive attachment protein* receptor (receptor de anclaje al factor sensible a N- ethylmaleimida)

SOCS: *suppressor of cytokine signaling* (proteína supresora de la señalización de citocinas)

STAT1: *signal transducer and activator of transcription 1* (transductor de señal y activador de transcripción1)

STAT1 α : *signal transducer and activator of transcription 1 α* (transductor de señal y activador de transcripción 1 α)

STAT4: *signal transducer and activator of transcription 4*(transductor de señal y activador de transcripción 4)

TBS: *tris-buffered saline* (solución amortiguadora salina a base de tris)

TCF7L2: *transcription factor 7-like 2* (factor de transcripción 7, tipo 2)

TGF- β : *transforming growth factor β* , factor de crecimiento transformante β .

Th1: *T-cell helper 1 (célula T ayudadora1)*

TLR: *Toll like receptor* (receptor tipo *Toll*)

TLR2: *Toll like receptor 2* (receptor 2, tipo *Toll*)

TLR3: *Toll like receptor 3* (receptor 3, tipo *Toll*)

TLR4: *Toll like receptor 4* (receptor 4, tipo *Toll*)

TNF- α : *tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral α factor de necrosis tumoral α)

TRAF3: *TNF receptor-associated factor 3* (factor 3 asociado el receptor del factor de necrosis tumoral)

UCP2: *uncoupling protein 2* (proteína de desacoplamiento 2)

1. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades que afectan 98 países, causadas por diferentes especies de parásitos del género *Leishmania*. Dependiendo de la especie infectante y la respuesta inmune del hospedero se pueden presentar diferentes formas clínicas: leishmaniasis cutánea, muco-cutánea y visceral, con un amplio espectro de signos y síntomas que puede ir desde estadios asintomáticos en algunos casos de la leishmaniasis cutánea hasta formas que comprometen la vida en casos de leishmaniasis visceral. Por décadas ha sido un reto para los investigadores y clínicos entender la patogénesis de la enfermedad con el fin de prevenirla y curarla.

El desarrollo de este conjunto de enfermedades es multifactorial y está determinado por la especie infectante, por el sistema inmune del hospedero y depende de la supervivencia y replicación del parásito en el macrófago. La supervivencia del parásito depende de su capacidad para contrarrestar los mecanismos leishmanicidas del macrófago y modular la respuesta inmune. El parásito ha desarrollado diferentes estrategias para lograr su replicación, tales como retardar la maduración del fagosoma, inactivar las hidrolasas ácidas del fagolisosoma [1, 2], alterar la presentación de antígenos [3, 4], suprimir la respuesta de las células Th1 [5] y alterar vías metabólicas del macrófago [6].

Aunque muchos estudios han evaluado la expresión de genes del macrófago y los factores que influyen la patogénesis de la enfermedad, los resultados pueden variar de acuerdo al momento de la infección y a la especie infectante. Un estudio realizado por Peacock et al., en el 2007, compararon los genomas de *L. (Leishmania) major*, *L. (L) infantum* y *L. (V) braziliensis* encontrando 200 genes diferencialmente distribuidos entre las tres especies. El mayor número de genes especie-específicos corresponden a *L. (V) braziliensis*. Los genes diferencialmente distribuidos entre las especies codifican para proteínas implicadas en la interacción parásito-hospedero y en la supervivencia del parásito en el macrófago [7]. Lo anterior resalta la importancia de estudiar la interacción del macrófago con cada una de las especies de *Leishmania*.

Gran parte de los trabajos realizados sobre el efecto de la infección de *Leishmania* en la expresión de genes del macrófago se han realizado en especies del subgénero *Leishmania* [8-11]. Esto contrasta con los escasos estudios realizados con especies del subgénero *Viannia*. No se encontró ningún estudio que reporte la expresión global de genes de macrófagos retados con *L. (V) braziliensis*. Por otra parte, la mayoría de los estudios que han identificado el perfil de expresión de macrófagos se han realizado en las etapas iniciales de la infección, entre las 0 y

24 horas [9, 10, 12-17]. Son pocos los trabajos realizados en estadios más avanzados de la infección [5, 8].

Los perfiles de expresión de macrófagos retados con diferentes especies de *Leishmania*, en su mayoría muestran regulación negativa generalizada [11, 18]. No obstante, en macrófagos infectados con *L. (V.) panamensis* la expresión de genes fue regulada positivamente. En contraste, macrófagos infectados con *L. (L.) chagasi* no presentaron diferencias entre los genes con regulación positiva y los genes con regulación negativa.

Lo anterior muestra que puede haber variabilidad en los perfiles de expresión del macrófago, dependiendo de la especie infectante y el momento en que se estudia la interacción parásito-hospedero. No es posible extrapolar los resultados de estudios realizados con diferentes especies.

La patogénesis y respuesta inmune de las leishmaniasis ha sido principalmente estudiada en modelos animales que han incluido perros, hámster, primates no humanos, ratones silvestres y principalmente los ratones BALB/c y C57BL/6 sensibles y resistentes a la enfermedad, respectivamente. La especie más estudiada ha sido *L. major* y la principal estrategia utilizada para identificar las cascadas de transducción de señales, perfil de citocinas, sensibilidad y resistencia a la enfermedad han sido los ratones *knockout* para el gen o genes de interés. Para el estudio de la interacción macrófago-*Leishmania*, múltiples trabajos se han enfocado en la evaluación funcional de los genes del macrófago durante la infección del parásito. Este tipo de estudios se han realizado principalmente a nivel de ratones *knockout*, sin embargo esta estrategia no permite la evaluación a gran escala y no siempre es posible obtener ratones *knockout* para genes vitales. Una estrategia alternativa es el *knockdown* por RNA de interferencia en líneas celulares infectadas por el parásito. Se han realizado pocos trabajos con esta estrategia que permitan la evaluación funcional de genes, comparado con los realizados con modelos animales. Los genes estudiados han sido principalmente los involucrados en las vías de señalización activadas por los receptores tipo *Toll*. De otra parte la mayoría de los estudios se han realizado con especies del viejo mundo y en menor proporción con especies del subgénero *Viannia*.

El objetivo de este trabajo fue Identificar los genes y los procesos biológicos potencialmente importantes en la interacción macrófago - *L. (V.) braziliensis* y caracterizar un modelo celular que permita la evaluación funcional de los genes identificados. En el estudio se identificaron 218 genes diferencialmente expresados de los cuales el 71,6% presentaron regulación negativa. Los análisis de enriquecimiento funcional mostraron que la biosíntesis de esteroides incluyendo la del colesterol son los procesos biológicos más relevantes asociados al perfil de

expresión de los macrófagos infectados. De otra parte se caracterizó el modelo celular, el cual permite ser modificado genéticamente e identificar diferentes fenotipos de infección en consecuencia al silenciamiento de genes del macrófago.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Leishmaniasis un problema de salud pública

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por un parásito protozoario del género *Leishmania*, transmitida por la picadura de flebótomos y está presente en 98 países. Con base en el último estudio realizado por la OMS sobre la epidemiología de la enfermedad entre 2008-2012, se estima que ocurren en el año, aproximadamente entre 200.000 y 400.000 casos de leishmaniasis visceral y entre 700.000 y 1.2 millones casos de leishmaniasis cutánea. Más del 90% de los casos de leishmaniasis visceral se concentran en seis países: India, Bangladesh, Sudan, Sudan del sur, Etiopía y Brasil. La leishmaniasis cutánea es más ampliamente distribuida en tres regiones epidemiológicas: Las Américas, El oeste Mediterráneo, y Asia. Los diez países con el mayor número de casos son: Afganistán, Algeria, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudan del Norte, Costa Rica y Perú. Se estima que se presentan entre 20.000 a 40.000 muertes al año por esta enfermedad [19].

En Las Américas la enfermedad está presente en 18 países y 3 de los 10 países del mundo donde se registra el 75% de los casos globales de leishmaniasis cutánea, son: Brasil, Colombia y Perú. Un promedio de aproximadamente 60.000 casos de leishmaniasis cutánea y de mucosa, y 4.000 de Leishmaniasis visceral se diagnostican cada año en las Américas, con una tasa de mortalidad del 7%. En las Américas se han identificado 15 de las 22 especies de *Leishmania* que causan enfermedades en los seres humanos, y 54 especies diferentes de vectores están potencialmente implicadas en su transmisión[20]. En Colombia las leishmaniasis constituyen un problema creciente en salud pública, debido al cambio en el patrón epidemiológico por la aparición de nuevos focos, al proceso de domiciliación y urbanización del ciclo de transmisión, por el número de casos existentes en el país y la población en riesgo de adquirir la enfermedad. Hasta la semana 52 del año 2013 se notificaron al sistema de información Sivigila, 9060 casos de leishmaniasis, de los cuales, 8914 fueron de la forma cutánea que corresponden al 98,4 %, 136 casos de la forma mucosa, que corresponden al 1,5 % y 10 casos confirmados para la forma visceral, que corresponden al 0.1 %. El comportamiento de los casos de L. cutánea, respecto a años anteriores es similar debido a que se tienen factores constantes como la migración, el conflicto armado, dinámica vectorial, entre otros que condicionan esta enfermedad. Los pacientes en su mayoría son hombres, en edad productiva, cuyas actividades son de tipo rural y los llevan a ingresar a zonas selváticas, deforestadas e intervenidas por la actividad humana. Hay una disminución de casos notificados para las formas cutánea y mucosa en las 52 semanas epidemiológicas del 2013, respecto al mismo período del año 2012, este comportamiento es atribuido a factores como: la falta de oportunidad en el proceso de notificación, la disminución de la implementación de vigilancia rutinaria orientada a la vigilancia activa del evento, la falta de consulta e inoportunidad de la misma a los servicios de salud por parte de los pacientes [21].

2.2. Interacción macrófago-*Leishmania*

Leishmania es un parásito intracelular obligado, que tiene un ciclo de vida genético que transcurre entre el vector y el hospedero mamífero. Presenta dos estadios en su ciclo de vida: el promastigote que se encuentra en el vector y el amastigote en los macrófagos del hospedero mamífero. La forma extracelular reside y prolifera como promastigote procíclico en el intestino del vector donde se diferencia a la forma infectiva del parásito conocida como promastigote metacíclico. Cuando el parásito toma sangre del hospedero inocula los promastigotes metacíclicos, de los cuales unos son eliminados y otros son fagocitados por los neutrófilos y macrófagos. En el macrófago, los promastigotes se transforman en amastigotes donde se replican y posteriormente invaden otros macrófagos. En consecuencia el parásito tiene la capacidad de vivir en tres microambientes diferentes: El tracto digestivo del insecto, en el compartimiento extracelular de los hospederos mamíferos y en los fagolisosomas de los macrófagos. La hembra del vector, toma sangre de los mamíferos lacerando los capilares superficiales de la dermis y creando un pozo de sangre del cual se alimenta. El pozo se forma gracias a sustancias contenidas en la saliva del insecto tales como hialuronidasa, maxadilán, adenosina y prostaglandinas que tienen efecto vasodilatador. La picadura por el vector inicia una respuesta local inflamatoria con el reclutamiento de neutrófilos, células NK, eosinófilos y mastocitos. La mayoría de los promastigotes depositados en la dermis activan las vías clásicas y alternativas del complemento y son opsonizados y destruidos por la lisis del mismo. Los promastigotes que logran sobrevivir son internalizados vía fagocitosis mediada por receptores expresados en la membrana del macrófago. [22, 23]

Interacción inicial *Leishmania*-macrófago

El parásito y el macrófago pueden interactuar por diferentes receptores y ligandos, lo que le permite al parásito tener varias vías redundantes para su ingreso al hospedero. Dependiendo del ligando y el receptor se desencadenan diferentes respuestas en la célula. Se ha propuesto que muchas interacciones son necesarias para la internalización, así como la cooperación entre los distintos receptores como se describió para el CR1 y CR3 [24, 25]

La unión *Leishmania*-macrófago varía de acuerdo al tipo de macrófago y a la especie infectante dado que la composición de las moléculas de superficie del parásito es propia de éste [26]. En la interacción inicial los parásitos se pueden unir principalmente a cinco receptores: el Receptor 1 del complemento (CR1), el Receptor 3 del complemento (CR3), el Receptor de manosa (MNR), el Receptor de fibronectina (FnRs) y Receptores tipo Toll (TLR). Los promastigotes metacíclicos, que han sido opsonizados por la fracción 3 del complemento (C3b) y su forma inactiva (C3bi), se unen a CR1 y CR3 respectivamente. CR1 coopera con el receptor CR3 al promover la inactivación de la fracción C3b quien a su vez también es inactivada por la gp63 del parásito. Este tipo de interacción es común entre todas las especies. El ingreso del parásito al macrófago por CR3 le da ventaja dado que evita la producción del estallido respiratorio por el hospedero permitiendo la supervivencia de *Leishmania* en la vacuola parasitófora [24, 27, 28].

El receptor de manosa es muy importante en la respuesta inmune innata a muchos microorganismos, ya que hace parte del reconocimiento de patrones. Se ha demostrado que el parásito puede ingresar al macrófago a través de este receptor [29], sin embargo en estudios realizados con ratones *knockout* para MNR infectados con *L. major* y *L. donovani* no mostraron diferencia frente a los ratones control en la resolución de la enfermedad, evidenciando producción muy similar en IL 12 y la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en respuesta a la infección [30]. No hay estudios concluyentes sobre la influencia de este receptor en las vías de señalización del macrófago.

Los receptores de fibronectina son integrinas del macrófago que interactúan con la proteína gp63, aumentando la adhesión de los parásitos al macrófago cuando estos son opsonizados por el complemento. Estas observaciones se hicieron en estudios realizados en promastigotes de *L. amazonensis* especie con la que demostraron la interacción de este receptor con el parásito. Los receptores FnRs cooperan con los receptores del complemento CR1 y CR3 para facilitar la internalización de promastigotes opsonizados con C3bi [25, 31, 32].

Otros receptores que no disparan la fagocitosis pero si activan diferentes vías de señalización en el macrófago para la producción de una respuesta pro inflamatoria son los receptores tipo *Toll*, quienes tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos y ocupan un lugar importante dentro de la respuesta inmunitaria innata a *Leishmania*. Los TLR asociados al reconocimiento del parásito son los TLR2, TLR3 y TLR4, los cuales se unen al lipofosfoglicano (LPG) del parásito [33-36].

Fagocitosis y supervivencia del parásito

Después del reconocimiento del ligando por el receptor, inicia la internalización y la fagocitosis. La biogénesis del fagosoma ocurre por la acumulación de actina F que permite que la membrana plasmática rodee la partícula y de origen a éste. Los promastigotes inician su diferenciación a amastigotes en un ambiente relativamente favorable en el fagosoma que inicia su proceso de maduración, con eventos de fusión con endosomas tempranos y tardíos, así como con los lisosomas para finalmente dar origen a la formación del fagolisosoma, en el cual se encuentran hidrolasas ácidas, moléculas tóxicas como el óxido nítrico (ON) y especies reactivas del oxígeno (ROS) que generan un ambiente altamente microbicida.

Leishmania tiene la capacidad de retardar la maduración del fagosoma con el fin de finalizar la diferenciación de promastigote a amastigote antes de la formación del fagolisosoma dado que el estado de amastigote es capaz de sobrevivir al ambiente hostil del fagolisosoma. Varios autores atribuyen este retardo en la maduración del fagosoma, a la remodelación de éste por una acumulación de actina F y la exclusión de componentes citosólicos de la NADPH oxidasa de la membrana del fagosoma [37]. El LPG del parásito tiene la capacidad de inactivar la proteína quinasa C α (PKC α), quien al fosforilar la proteína sustrato miristilado de la quinasa C rica en alanina (MARCKS), induce la despolimerización de la actina; acción indispensable para la fusión del fagosoma con los endosomas [38, 39].

Estudios realizados con *L. donovani* mostraron que el LPG también se integra en los micro-dominios de la membrana del fagosoma que contienen el gangliósido GM1EI y causa la disociación de la synaptotagmina V. Esta proteína es esencial en el reclutamiento de la enzima protón ATPasa (V-ATPase), que hace parte del complejo que lidera la acidificación del fagolisosoma. De esta forma el parásito inhibe el proceso de acidificación de la vacuola parasitófora[40].

Una vez desarrollado el amastigote, se enfrenta al ambiente hostil del fagolisosoma, donde se encuentran hidrolasas ácidas, moléculas tóxicas como el NO y ROS. El amastigote tiene la capacidad para sobrevivir y multiplicarse en el fagolisosoma gracias a varias estrategias incluyendo la actividad proteolítica de la gp63, que aumenta su actividad a pH ácido y soporta la acción de las enzimas lisosomales, protegiendo al parásito de la degradación por estas enzimas [41]. De otra parte, proteínas tales como peroxidoxinas (LcPxn1-2) y superóxido dismutasa inactivan las ROS y los derivados del nitrito [1, 2].

Inmunidad adaptativa y modulación de *Leishmania* de las vías de señalización

Leishmania tiene la capacidad de modular la respuesta inmune y las vías de señalización del macrófago para lograr su supervivencia en la célula hospedera. A continuación se abordan algunas de las vías que son moduladas por el parásito.

Los macrófagos son células muy importantes en la respuesta inmunitaria adaptativa frente a los patógenos infecciosos, dado que presentan antígenos y secretan citocinas que modulan los linfocitos T. La producción de linfocitos T ayudadores (Th1) es indispensable para resolver la infección por *Leishmania* spp. ya que estos producen interferón gamma (IFN- γ), la citocina más potente para activar los macrófagos y es esencial para inducir la eliminación de los amastigotes [42]. Las especies de *Leishmania* han desarrollado varios mecanismos para suprimir la respuesta de células Th1 y la producción de IFN- γ [5]. En estas condiciones las células infectadas no son capaces de realizar una expresión adecuada del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (CMH) sobre su superficie, ni de las moléculas co-estimuladoras [3, 4]. De otra parte el parásito inhibe la producción de la IL-12, la cual es esencial para iniciar la respuesta Th1 [43]. Los mecanismos por los cuales el parásito produce esta inhibición aún no son bien conocidos; sin embargo, las diferentes especies de *Leishmania* modulan a su favor varias cascadas de señalización involucradas en la inducción de la producción de la IL12, tales como la vía JAK/STAT y las vías en que interviene la proteína quinasa C. Por lo anterior, la capacidad de los macrófagos infectados de interactuar con los linfocitos T disminuye y se afecta la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa.

En múltiples estudios se ha demostrado que las especies de *Leishmania* alteran diversas vías de señalización del macrófago como medio para sobrevivir y propagarse en el hospedero. El parásito es capaz de activar los reguladores negativos propios del macrófago para inactivar las vías de señalización que conducirían a su eliminación [44].

El INF- γ es la citocina más importante para inducir la activación de los macrófagos. Una vez que el interferón se une a su receptor de citocinas en el macrófago, se produce un cambio en la conformación del receptor, que estimula la formación de un receptor dimérico funcional, lo cual conduce a la fosforilación de las quinasas JAK1 y JAK2 presentes en el receptor. Las JAK1 y JAK2 fosforilan otros residuos de tirosina del receptor, los residuos de tirosina fosforilados son reconocidos por los dominios homólogos a Src 2 (SH2) de los factores de transcripción transductores de señales y activadores de transcripción uno (STAT1). Los dominios SH2 unidos a los receptores permiten que los STAT1 sean fosforilados y formen dímeros. Los dímeros STAT1 se liberan del receptor, migran hacia el núcleo y se unen a promotores del ADN, que activan la transcripción de los genes que expresan proteínas requeridas para la activación de los macrófagos, como la oxidasa fagocítica y la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS). Esta vía es necesaria para que el macrófago destruya el parásito.

La vía de señalización descrita es regulada negativamente por la fosfatasa de tirosina SHP1, que tiene un dominio catalítico fosfatasa y dos dominios SH2. En estado inactivo, un dominio SH2 se fija e inactiva el dominio catalítico en la SHP1; sin embargo, en el estado estimulado, este dominio SH2 se fija a un residuo fosfo-tirosina en el receptor activado. El cambio de conformación que acompaña esta fijación desenmascara el sitio catalítico SHP1 y, también, lo atrae al residuo de fosfo-tirosina en el labio de activación de JAK asociada al receptor. Mediante la eliminación de este fosfato, SHP1 inactiva la JAK de modo que no puede fosforilar más al receptor o a otros sustratos [45-47]. En algunos estudios se ha demostrado que en el macrófago infectado por *Leishmania* spp., la inhibición de la cascada de fosforilación después de que el IFN- γ se ha unido a su receptor se debe a la activación de fosfatasas de tirosina del huésped [48, 49]. En otro estudio se demostró que la actividad de la fosfatasa de tirosina del macrófago es activada rápidamente dentro de los primeros cinco minutos de exposición del macrófago a *L. donovani*, lo que se correlaciona con una rápida defosforilación de las proteínas Tyk2, JAK1 y JAK2. Esta interacción podría explicar en parte la incapacidad del INF- γ para desencadenar la vía de señalización [50].

Otra de las vías de señalización moduladas por el parásito es la vía MAP quinasa en la cual ERK1/2 intervienen en la producción de NO. La modulación de esta vía por el parásito se ha demostrado en varios estudios. El primer trabajo se llevó a cabo con *L. amazonensis*, en el cual se demostró alteración en la fosforilación de la MAP quinasa durante la activación de los macrófagos infectados por el parásito [51]. En un segundo estudio con amastigotes de *L. donovani*, se observó la inhibición de los factores de transcripción Elk-1 y c-fos debido a la inactivación de MAP quinasa. En estos dos estudios, los autores sugirieron que las proteínas tirosinas fosfatasas (PTP) eran las responsables de la defosforilación de ERK1/2 MAP quinasa. Posteriormente, se comprobó que la SHP-1 inducida por el parásito es necesaria para el proceso de defosforilación de ERK1/2 [50].

Diferentes factores de transcripción también son blancos del parásito y es así como los factores STAT y el factor nuclear κ B (NF- κ B), los cuales están relacionados con la

transcripción de genes que responden a los interferones y a otras citocinas son modulados por *Leishmania*. En ratones *knock-out* para STAT1 infectados con *L. major*, se observó mayor propensión a la infección, y reducción de la producción de IL-12, IFN- γ y NO [52]. En otros estudios se demostró que la fosforilación de STAT1 α y la unión del factor de transcripción al ADN se encontraban muy reducidas en macrófagos infectados con *L. donovani* [53-55]. Uno de los hallazgos importantes en estos trabajos fue evidenciar que la inhibición no era consecuencia de un aumento de la expresión de SHP-1, sino de una rápida degradación de STAT1 α por el proteosoma [56].

El factor NF- κ B, es importante para la expresión de los genes involucrados en varias funciones del macrófago, que van desde la supresión de la apoptosis hasta la producción de citocinas. Los promastigotes y los amastigotes pueden emplear diferentes mecanismos para regular a NF- κ B, con el fin de inhibir la expresión de genes como el de iNOS, el de interleucina IL12 e inducir la expresión de IL10 [57, 58]. En un estudio en que se infectaron macrófagos con *L. mexicana*, los autores evidenciaron que el parásito causa una rápida degradación de p65 (RelA) gracias a la acción de una proteasa de cisteína. En este mismo trabajo, se observó que, además, se producía la degradación del inhibidor I κ B α , lo cual parece contradictorio para la inactivación de la vía pero, en este caso parece ser parte de la acción de la proteasa de cisteína que causa la destrucción total de la vía. Este mecanismo de inactivación parece ser específico de los amastigotes, dado que los promastigotes no expresan esta proteasa [58].

De otra parte las diferentes especies de *Leishmania* pueden inducir la producción o la secreción de moléculas inmunosupresoras, como metabolitos del ácido araquidónico y citocinas: factor de crecimiento transformador β (TGF- β) e IL10. El TGF- β es inducido por muchas especies de *Leishmania* lo que se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*, y su aumento se correlaciona con retardo en la expresión de iNOS y reducción de la actividad de las células NK [59, 60]. Estos resultados concuerdan con el postulado de que el TGF- β inhibe la actividad microbicida de los macrófagos. Gantt, *et al.*, en el 2003, demostraron que *L. chagasi* induce producción de TGF- β en macrófagos humanos infectados y esto trae como consecuencia inhibición de la respuesta inmune.

Análisis de expresión genética de macrófagos infectados

Aunque muchos estudios han examinado la expresión de genes del macrófago infectados por *Leishmania spp.* y los factores que influyen la patogénesis de la enfermedad, estos estudios varían de acuerdo a la especie infectante y al momento de la infección. Un estudio realizado por Peacock *et al.*, en el 2007, comparó los genomas de *L. (Leishmania) major*, *L. (L) infantum* y *L. (V) braziliensis* encontrando 200 genes diferencialmente distribuidos entre las tres especies. El mayor número de genes especie-específicos corresponden a *L. (V) braziliensis*. Los genes diferencialmente distribuidos entre las especies codifican para proteínas implicadas en la interacción parásito-hospedero y en la supervivencia del parásito en el macrófago [7]. Lo anterior resalta la importancia de estudiar la interacción del macrófago con cada una de las especies de *Leishmania*.

Gran parte de los trabajos realizados sobre el efecto de la infección de *Leishmania* en la expresión de genes del macrófago se han realizado en especies del subgénero

Leishmania [8-11]. Esto contrasta con los escasos estudios realizados con especies del subgénero *Viannia*. No se encontró ningún estudio que reporte la expresión global de genes de macrófagos retados con *L. (V) braziliensis*. Por otra parte, la mayoría de los estudios que han identificado el perfil de expresión de macrófagos se han realizado en las etapas iniciales de la infección, entre las 0 y 24 horas [9, 10, 12-17]. Son pocos los trabajos realizados en estadios más avanzados de la infección [5, 8].

2.3. Evaluación funcional de genes en leishmaniasis

Con el fin de acercarse al conocimiento del estado del arte de los trabajos realizados para la validación funcional de genes del macrófago infectados por diferentes especies de *Leishmania* se hizo una revisión de la literatura en inglés en la base de datos de *Pubmed*, utilizando las siguientes palabras clave: *Leishmania*, macrófago, recombinación homóloga, *Knockout*, *Knockdown* siRNA, shRNA, mutación química y transgénesis. El período de tiempo considerado fue entre los años 1994 y 2014. En la búsqueda se encontraron 381 artículos y en el análisis de estos se tuvo en cuenta, el gen estudiado, la especie infectante, el modelo celular y la estrategia utilizada para la evaluación funcional.

En total, se reporta evaluación funcional para 190 genes, en su mayoría asociados a la respuesta inmune en la infección. Dentro de los genes más estudiados se encuentran IL-4, IFN γ , IL-12p40, IL-10, IL-4R- α y TLR2 representando en conjunto el 22 % de los trabajos revisados. En el resto de los trabajos se reportan 144 genes los cuales solo han tenido un estudio de evaluación funcional. Los estudios *in vivo* se han centrado en estudios sistémicos de la enfermedad en ratones *knockout*, especialmente en las cepas BALB/c y C57BL/6.

De los estudios con RNA de interferencia que correspondieron al 11% de los trabajos revisados, el 40 % usaron shRNA y el 60 % siRNA. Entre los estudios con shRNA el 63 % de los trabajos fueron realizados en modelos *in vivo* utilizando ratones BALB/c y el 19% usaron la línea celular THP1.

Se encontraron pocos trabajos en los cuales se ha utilizado la estrategia de silenciamiento por shRNA, entre estos están el realizado por Srivastav y colaboradores en el 2012 quienes utilizaron vectores lentivirales que portaban un constructo para la expresión de shRNAs dirigidos contra el mRNA del gen A20, que codifica para una enzima de deubiquitinación. Los autores encontraron que al silenciar el gen se reducía la infección por *L. donovani* en ratones BALB/c [61]. Este mismo grupo de investigadores en el 2014, utilizaron la misma estrategia de silenciamiento con shRNA dirigido contra la proteína TRAF3 en ratones infectados con *L. donovani* y encontraron una reducción en la infección posterior al silenciamiento[62]. Otro gen silenciado por shRNA en el contexto macrófago-*Leishmania major* ha sido *mkp-1*. Los investigadores reportaron que el silenciamiento del gen en ratones BALB/c resulta en reducción de la infección[63].

En el caso de los siRNA en el 46 % de los reportes se utilizó la línea celular RAW 264.7, mientras que en el 17% de los estudios se utilizaron macrófagos derivados de monocitos murinos. Las células J774 fueron usadas en el 12.5 % de los estudios y el porcentaje

restante se distribuye en células Jurkat, P388D1 y macrófagos derivados de monocitos humanos. Solo un estudio se llevó a cabo en la línea celular U937, modelo utilizado en este estudio. El silenciamiento de genes del macrófago mediante los siRNA ha sugerido la importancia funcional de los receptores tipo Toll [61, 64], receptores de quimiocinas [65] y proteínas SNARE [66] entre otros.

Otra variable analizada en los artículos revisados fue la especie de *Leishmania* incluida en los estudios. *L. major* ha sido la más estudiada (60%) seguida por *L. donovani* (22 %). En la literatura también se reportan trabajos con las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. panamensis*, y *L. tropica*, sin embargo el número de reportes es muy reducido en comparación con las especies ya mencionadas. *L. braziliensis*, especie objeto de estudio en este trabajo, se ha utilizado en el 4% de los reportes principalmente en estudios de evaluación por KO. Los genes evaluados durante la infección con esta especie incluyen: *gp91*, *IFN γ* , *IL-12*, *IL17*, *iNOS*, *myd88*, *prf1*, *rag1*, *rag2*, *stat4*, *tlr2*, *tlr4*, *tnf*, sin embargo se podría suponer que es un número reducido al compararlo con la extensa información que se tiene sobre genes diferencialmente expresados entre macrófagos infectados y no infectados por otras especies del parásito. En un meta-análisis donde se analizaron 5 estudios de microarreglos realizados para evaluar la expresión diferencial de genes de macrófagos infectados y no infectados por diferentes especies de *Leishmania* (*Leishmania. mexicana*, *Leishmania. major*, *Leishmania. donovani*, *Leishmania. chagasi* y *Leishmania. amazonensis*), se encontraron 468 genes expresados diferencialmente en los estudios incluidos[11]. Lo anterior demuestra que existe una gran cantidad de genes que podrían ser importantes en la interacción macrófago-*Leishmania*. Hacer esta evaluación por *knockout* en ratones implicaría un alto costo. Por lo anterior se resalta la importancia de evaluar el uso de un modelo celular in vitro para la evaluación funcional de genes del macrófago infectado por *L. braziliensis*, una de la especies circulantes en Colombia y agente causal de leishmaniasis cutánea y mucocutánea.

3. Pregunta de investigación

Tomando en cuenta:

- La importancia del estudio de la interacción macrófago-*Leishmania* para el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad.
- El conocimiento existente sobre la capacidad del parásito para modular la respuesta del macrófago y la del macrófago de permitir la supervivencia del parásito.
- La dinámica de la expresión de genes del macrófago dependiendo de la especie infectante y la probabilidad de cambios acorde con el tiempo de la infección.
- Los escasos estudios del patrón de expresión de genes en momentos avanzados de la infección de macrófagos por *L. (V.) braziliensis*.

Se planteó la siguiente pregunta de investigación:

Una vez se ha establecido la infección, ¿Cuáles genes del macrófago son importantes en la interacción macrófago – *Leishmania (V.) braziliensis*?

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Identificar los genes y los procesos biológicos potencialmente importantes en la interacción macrófago - *L. (V.) braziliensis* y caracterizar un modelo celular que permita la evaluación funcional de los genes identificados.

4.2. Objetivos específicos

Determinar el perfil global de expresión de genes de macrófagos derivados de la línea celular U937 asociado a la infección por *Leishmania Viannia braziliensis* e identificar los procesos biológicos asociados a los genes diferencialmente expresados

Caracterizar el modelo celular U937 para la identificación de fenotipos inducidos por RNA de interferencia en macrófagos infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*.

5. Estrategias para el cumplimiento de los objetivos

1. Caracterización de un modelo celular para la identificación de fenotipos inducidos por el silenciamiento genético mediado por RNA de interferencia en macrófagos infectados por *Leishmania*.
 - Expresión y silenciamiento de un gen exógeno
 - Expresión y silenciamiento de un gen endógeno
 - Expresión de un gen diferencialmente expresado entre macrófagos no infectados e infectados por *L. (V.) braziliensis*
2. Identificación de los genes potencialmente importantes en la interacción macrófago-*Leishmania (V.) braziliensis*

- Análisis de expresión diferencial de genes de macrófagos no infectados e infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*
- Análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados

6. Materiales y métodos

6.1. Procedimientos generales

Cultivos celulares

- **Células U937.** La línea celular U937 (*American Type Culture Collection* -CRL-1593.2), se cultivó a una concentración inicial de 1×10^5 células por mL en un volumen final de 5 mL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich R410), complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.
- **Células HEK-293FT.** Las células HEK-293FT (Invitrogen R700-07) se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Gibco® complementado con 6 mM de L-Glutamina, 1 mM de Piruvato de Sodio, 0,1 mM MEM - aminoácidos no esenciales (Gibco® - 11400350), FBS al 10% y 500 µg/mL de Geneticina®. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂.
- **Promastigotes de *Leishmania braziliensis*.** Se utilizó la cepa de referencia (MHOM/BR/00/M2903), cultivada durante seis días hasta alcanzar la fase estacionaria, con una concentración inicial de 1×10^6 parásitos por mL, en medio Schneider (Sigma-Aldrich S9895) complementado con 10% de FBS a 26 °C.
- **Determinación del momento de replicación de amastigotes- establecimiento de la infección**

Se indujo la diferenciación de macrófagos derivados de células U937 incubando $1,2 \times 10^5$ células durante 120 horas con PMA en medio RPMI-1640 complementado con 10% de FBS a 37 °C en una atmosfera al 5% de CO₂ sobre una matriz de vidrio en una placa de 24 pozos. Los macrófagos fueron infectados con promastigotes opsonizados de *L. (V) braziliensis* en proporción 15:1 respecto a los macrófagos y se calculó el porcentaje de infección y la carga parasitaria cada 24 horas mediante tinción de Giemsa y observación por microscopio óptico. El experimento fue realizado por triplicado y en cada tiempo se evaluaban 3 réplicas técnicas.

- **Evaluación del fenotipo de infección**
- Infección *in vitro* de macrófagos con promastigotes de *L. braziliensis*. Se opsonizaron 4×10^6 parásitos por mL durante 1 hora a 34 °C con suero humano AB inactivado y se centrifugaron a 900 g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en PBS pH 7.4 y precalentado a 37°C. La suspensión de

promastigotes opsonizados se centrifugó de nuevo con las mismas condiciones mencionadas, se descartó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en medio RPMI complementado con 10% de FBS.

A las placas conteniendo los macrófagos derivados de la línea celular U937 se les retiró el medio y se les adicionó una suspensión de 15 promastigotes de *L. braziliensis* por macrófago. Los macrófagos infectados se incubaron durante dos horas a 34 °C y posteriormente se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 para remover los parásitos no adheridos. Finalmente, se agregó medio RPMI complementado con 10% de FBS y se incubó a 34 °C y 5% de CO₂ por 72 horas.

- Tinción fluorescente. Transcurrido el tiempo de incubación de los macrófagos infectados, se retiró el medio RPMI y fueron lavados con PBS pH 7.4 y precalentado a 37°C. Posteriormente, fueron fijados con 2% de paraformaldehído durante 25 minutos a 37 °C. Las trazas de paraformaldehído se inactivaron con 50 mM de cloruro de amonio durante 5 minutos a temperatura ambiente y seguido se permeabilizaron las células con 0,2% de saponina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante 1h en cámara húmeda a 37 °C, con 10 mM del marcador de lípidos *Vybrant® DiD cell-labeling solution* (Invitrogen V-22887) para marcar las membranas celulares y con 1,25 µg/mL del marcador de DNA *Hoechst 33258 (Molecular Probes® H3569)* para tinción de núcleos. Los macrófagos se observaron en el microscopio de fluorescencia *Leica DMI3000B* a una magnificación de 1000X. Se adquirieron imágenes en cada uno de los filtros, según el espectro de emisión de cada fluorocromo, empleando el programa *LAS core*.

- Adquisición de imágenes de macrófagos infectados. Para cada línea celular evaluada se tomaron fotografías para cada uno de los fluorocromos utilizados (DiD, Hoechst), empleando el programa *LAS core*, acoplado al microscopio de fluorescencia *Leica DMI3000B* con las siguientes condiciones:

Fluorocromo	Filtro para visualizar	Rango de tiempo de exposición (ms)	Ganancia	Saturación	Gamma
DiD	N2.1	290 ms – 350 ms	3,5X	2	0,87
Hoechst	A	58 ms – 124 ms	3,5X	2	0,87

Tabla 1. Condiciones de adquisición de fotografías para cada fluorocromo.

- Estandarización del protocolo para evaluar pruebas funcionales a partir de imágenes de macrófagos infectados

Inicialmente, se calculó el tamaño de muestra requerido para evaluar carga parasitaria y porcentaje de infección, aplicando la prueba de cambio de Frison y Pocock con medidas repetidas. Se usó el programa *STATA 13®*, insertando los valores promedio de carga parasitaria, porcentaje de infección y desviación estándar de poblaciones de macrófagos infectados de ensayos previos. El tamaño de muestra determinado fue de 125 amastigotes y 125 macrófagos entre infectados y no infectados.

En una muestra de 125 macrófagos y 125 amastigotes y con ayuda del programa *CellProfiler*® se realizó la identificación manual de la intensidad de señal de los núcleos de los macrófagos y de la medición conjunta de los núcleos y cinetoplastos de los amastigotes. Adicionalmente, se determinó el tamaño en píxeles de los núcleos de los macrófagos y de los núcleos y cinetoplastos de los amastigotes. Las anteriores mediciones se realizaron con el fin de establecer los valores mínimos y máximos de los parámetros morfométricos mencionados.

Los rangos obtenidos de intensidad de señal y de tamaño (tabla 2) se utilizaron para configurar el protocolo del programa *CellProfiler*® (<http://www.cellprofiler.org>) (figura 1). Fue parte de la estandarización ajustar el programa hasta lograr 100% de concordancia entre los objetos observados por el investigador y los detectados por el programa.

Variable	Media	Desviación estándar	Rangos configurados en CellProfiler®	
			Min	Máx.
Diámetro de los macrófagos (Píxeles)	299,2	7,8	100	400
Diámetro de núcleos y cinetoplastos (Píxeles)	10,3	1,53	7,3	15,9
Intensidad de señal de los macrófagos (Escala de gris)	0,35	0,08	0,1	1
Intensidad de señal de los núcleos y cinetoplastos (Escala de gris)	0,096	0,012	0,052	1

Tabla 2: Rangos empleados en la configuración de CellProfiler® para identificar los objetos de interés (macrófagos y amastigotes)

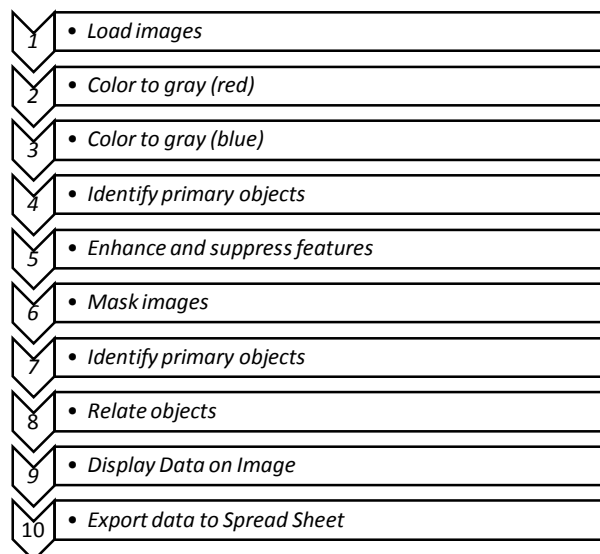


Figura1. Configuración del programa CellProfiler®, pasos para el análisis de las imágenes.

- Procesamiento de imágenes con CellProfiler®

La secuencia de pasos obtenida de la configuración del programa CellProfiler® para el conteo de carga parasitaria y porcentaje de infección de macrófagos infectados con *L. braziliensis* se muestra en la figura 1. Con el módulo *Load images* (paso 1) se cargaron las imágenes y con la aplicación *color to gray* se transformaron a escala de grises las fotografías adquiridas a color (pasos 2 y 3) para medir la intensidad de la señal emitida por los fluorocromos y así identificar los objetos de interés: membranas de los macrófagos y cinetoplastos y núcleos de los amastigotes.

Con el módulo *identify primary objects* (pasos 4 y 7), se identificaron los macrófagos a partir de las fotografías de marcación de membranas con DiD y los amastigotes en las fotografías obtenidas de la marcación de núcleos con Hoechst, observando tanto los núcleos como los cinetoplastos. La identificación se obtuvo introduciendo los valores mínimos y máximos de la intensidad de señal (escala de gris) y del tamaño de los objetos de interés (diámetro en píxeles) obtenidos de la medición de una muestra representativa de células.

Para facilitar la identificación de los amastigotes en las fotografías se empleó el módulo de *enhance and suppress features* (paso 5) configurado para aumentar el contraste de los objetos con un área aproximada de 20 píxeles. Como resultado se sustrajo el ruido de fondo y otros objetos que no eran de interés en la imagen y se resaltaron los núcleos y cinetoplastos para observarlos con mayor definición.

Con el objeto de garantizar que los amastigotes se encontraban dentro del área de proyección bidimensional que ocupa la célula y de descartar otros artefactos que se hallen por fuera, se generó una máscara (paso 6) que permite superponer la imagen de la marcación de membranas con DiD sobre la imagen de la marcación de núcleos con Hoechst. Aplicada la máscara, se llevó a cabo la identificación de los núcleos y cinetoplastos de la misma manera como se hizo la cuantificación de los macrófagos, mediante el módulo de *identify primary objects* que en este caso es el paso 7. Se seleccionaron los núcleos y cinetoplastos para realizar el conteo de amastigotes.

Una vez determinados los objetos de interés, se relacionaron los amastigotes con la célula hospedera empleando el módulo de *relate objects* (paso 8). Este módulo identificó cada uno de los objetos pequeños (núcleo + cinetoplasto de los amastigotes) que pertenecen a cada objeto grande (macrófago), permitiendo inferir cuáles células son las infectadas y cuáles no.

Finalmente, el módulo *Display Data on Image* (paso 9) cuantifica el número de amastigotes (definido por núcleo + cinetoplasto) por célula y el número total de macrófagos. Estos datos son exportados a una base de datos de Excel mediante el módulo *Export to spread sheet* (paso 10).

- **Evaluación de la carga parasitaria y porcentaje de infección con *Cell Profiler***

Con el protocolo descrito en la figura 1 se analizaron las imágenes adquiridas para cada una de las líneas celulares y teniendo en cuenta el número de objetos identificados que reportó el *CellProfiler*®, se calculó la carga parasitaria de la muestra de macrófagos infectados con *L. braziliensis*, definiendo ésta como el número de parásitos por macrófago muestreado. El porcentaje de infección se calculó con base en el número de macrófagos infectados por cada 100 macrófagos muestreados.

6.2. Caracterización del modelo celular: macrófagos derivados de la línea celular U937

Determinación del efecto de la expresión y silenciamiento de un gen exógeno en el fenotipo de infección de células U937 infectadas por *L. braziliensis*.

6.2.1. Expresión de un gen exógeno

- Producción de vectores lentivirales codificando para el gen *gfp*. Para la producción de lentivirus se utilizaron los constructos: pMD2.G (VSVg), p-Delta-8.74 (cordialmente

cedidos por el Doctor David Ann [67]) y pLenti-6.3-V5-GW-EmGFP (Invitrogen V370-06) distribuidos en fracciones equimolares para una cantidad total de 30 µg de DNA. Se transfectaron $1,8 \times 10^7$ células HEK-293FT en caja de cultivo de 75 cm² usando 60 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen ® 11668019). Las células fueron incubadas durante toda la noche bajo las condiciones de cultivo descritas para la línea celular HEK-293FT.

- Recolección de virus. La primera recolección de lentivirus se realizó a las 16 horas y seguido se adicionó al cultivo de células HEK-293FT 10 mM de butirato de sodio (Sigma B5887) en medio de cultivo DMEM complementado con 10 % de FBS. Las demás recolecciones de lentivirus se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas, retirando el medio de cultivo y almacenándolo a 4°C. Después de cada recolección se adicionó medio DMEM complementado con 10 % de FBS a las células en cultivo. Las suspensiones lentivirales se filtraron con membranas de 0,45 µm y se concentraron utilizando columna de concentración *Millipore Centricon Plus-20®* (Millipore UFC2 LTK 24) según las recomendaciones del fabricante.

- Titulación de los virus que portan el constructo que codifica para el gen *gfp*. Se sembraron 2×10^5 células HEK-293FT en 2 mL de medio DMEM y se incubaron toda la noche; en seguida se retiró el medio de cultivo y se adicionó 1 mL de suspensión viral diluida 1/200 en DMEM sin geneticina más 1 µL de bromuro de hexadimetrina (Polybrene) (Sigma H9268) para una concentración final de 9 µg/mL. Las células se incubaron durante toda la noche en las condiciones de cultivo mencionadas, se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio fresco. Después de 48 horas de la transducción se agregó 1 mL de tripsina (Eurobio CEZTDA01-0U) para despegar las células HEK-293FT de la caja de cultivo y se cuantificó el número de células totales. El porcentaje de células expresando GFP se determinó por observación con microscopio de fluorescencia *Leica DMI3000B*. Para determinar el número de células presentes en el día de la transducción, se aplicó la función de crecimiento con base en el número de células del día inicial del cultivo y el día final del experimento. El título viral se determinó asumiendo que por cada célula HEK-293FT expresando GFP había al menos una unidad infectiva. Se utilizó la siguiente fórmula:

Titulo viral= $[F \times C/V] \times D$ (White *et al.*, 1999) (Sastry *et al.*, 2002)

En donde:

F = Frecuencia de células GFP positivas
C = Total de células en el pozo al momento de la transducción
V = Volumen del inóculo de lentivirus por ml
D = Dilución de lentivirus elevada a -1

Se obtuvo un título de 3.06×10^7 unidades infectivas/mL para los vectores lentivirales conteniendo el constructo de expresión para *gfp*.

- Transducción de células U937 con virus para expresión del gen *gfp*. Se transdujeron las células U937 a una multiplicidad de infección (MOI) de 306 unidades infectivas/célula. A 1×10^5 células contenidas en 1 mL de medio RPMI más 10% FBS se le adicionaron 9 µg/mL de Polybrene (Sigma H9268) y 1 mL de la suspensión viral en una caja de cultivo. Las células se incubaron durante toda la noche, tras lo cual se realizó cambio de medio. A las 48 horas de la transducción se cuantificó el porcentaje de células con expresión de GFP mediante el microscopio de fluorescencia *Leica DMI3000B* para determinar la eficiencia de la transducción.

6.2.2. Evaluación de la expresión del gen exógeno

La expresión de la proteína fluorescente en las células transducidas se evaluó mediante microscopia de fluorescencia utilizando el microscopio *Leica DMI3000B* y el programa *Leica application suite core® (LAS core)* para la adquisición de las imágenes. Las células totales se cuantificaron en campo claro y las fluorescentes usando el filtro I3. Con base en estos resultados se determinó el porcentaje de células fluorescentes. La evaluación de la fluorescencia de las células expresando GFP se realizó durante 20 pases de cultivo.

6.2.3. Caracterización de la línea expresando el gen exógeno *gfp*

- Determinación de la cinética de crecimiento de las células U937 y U937-GFP. Las células fueron cultivadas en medio RPMI complementado con FBS al 10% como se mencionó anteriormente. La curva de crecimiento se comenzó a una concentración de 1×10^5 células/ml y se determinó la concentración celular mediante cuantificación en cámara de *Neubauer* cada 24 horas durante 5 días, mezclando 50 µl de muestra de cultivo y 50 µl de azul de tripán al 0,4% en PBS el cual permite identificar las células consideradas no viables. Con los valores de concentración celular determinados durante cada uno de los 5 días de seguimiento de los cultivos se elaboró la curva de crecimiento. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

- Diferenciación de monocitos a macrófagos. 2×10^5 células/mL fueron diferenciadas a macrófagos, usando 100 ng/mL de *phorbol myristate acetate* (PMA)(Sigma P8139) durante 120 horas a 37 °C y 5% de CO₂ [68]. La diferenciación se determinó con base en la morfología y en la capacidad de adherencia a la matriz.

6.2.4. Silenciamiento del gen exógeno *gfp*

La línea celular U937-GFP fue transducida a una MOI de 10 unidades infectivas por célula, con vectores lentivirales conteniendo un constructo que codifica para la expresión de shRNAs dirigidos contra el gen *gfp* (Santa Cruz Biotechnology sc-45924-V). La solución de lentivirus contenía 1.0×10^6 unidades infectivas en 200 µl de medio DMEM lo que equivale a un título de 5×10^6 unidades infectivas/ml). Para obtener el MOI necesario se adicionaron 20 µL de la suspensión viral a 1×10^4 células en 80 µL de medio RPMI complementado con 10% de FBS y 9 µg/mL de Polybrene®

(Sigma H9268). Se incubó durante toda la noche y en seguida se realizó cambio de medio. A las 48 h de la transducción se cuantificaron por microscopía de fluorescencia las células U937-GFP transducidas y se determinó la eficiencia de la transducción definida como el porcentaje de células que no expresaban GFP. Las células obtenidas fueron amplificadas y seleccionadas con 5 µg/mL de puomicina (Santa Cruz Biotechnology sc-108071) durante 8 días con cambio de medio cada 2 días y cuantificación diaria de las células viables, con el fin de obtener la línea celular U937-GFP/shRNA-GFP.

6.2.5. Generación de controles negativos del proceso de silenciamiento

Con el fin de evaluar si el proceso de silenciamiento era específico y se debía a los shRNAs dirigidos contra el mRNA codificante para los genes objeto de estudio (*gfp*, *gro-β* y *Imna*), se produjeron vectores lentivirales que portan constructos para la expresión de shRNAs no relacionados. Estos constructos se tomaron como control negativo del proceso de silenciamiento.

- Diseño de shRNA no relacionados.

Para la generación de shRNAs no relacionados empleados como control negativo, se utilizó la herramienta de generación de siRNAs: *siRNA wizard* de Invivogen: <http://www.sirnazard.com/scrambed.php>.

Se seleccionaron 4 siRNAs cuya secuencia no alineaba con ninguna secuencia codificante reportada en la base de datos del NCBI y por medio de la aplicación *Invitrogen Block-iT RNAi Designer* se les agregó el *loop* y los sitios de unión para formar la estructura de los shRNAs, de acuerdo al vector de entrada *pENTRTM/H1/TO del kit BLOCK-iTTM Inducible H1 RNAi Entry Vector* de Invitrogen (Invitrogen K492000).

Las secuencias empleadas como shRNAs no relacionados fueron las siguientes:

shRNA no relacionado 1	<i>Top strand</i>	CACCGTCTGTCACCTAGTTCGTACGCGAACGTACGAACTAGGTGACAGAC
	<i>Bottonstrand</i>	AAAAGTCTGTCACCTAGTTCGTACGTTTCGCGTACGAACTAGGTGACAGAC
shRNA no relacionado 2	<i>Top strand</i>	CACCGGCGCACCCGACGACGTAGGTTCGAAACCTACGTCGTCGGGTGCGCC
	<i>Botton strand</i>	AAAAGGCGCACCCGACGACGTAGGTTTCGACCTACGTCGTCGGGTGCGCC
shRNA no relacionado 3	<i>Top strand</i>	CACCGGTCCGACGCATACTAATACGAATATTAGTATGCGTCCGACC
	<i>Botton strand</i>	AAAAGGTCCGACGCATACTAATATTCGTATTAGTATGCGTCCGACC
shRNA no relacionado 4	<i>Top strand</i>	CACCGCCTATAATTACGGGTCTCCTCGAAAGGAGACCCGTAATTATAGGC
	<i>Botton strand</i>	AAAAGCCTATAATTACGGGTCTCCTTTTCGAGGAGACCCGTAATTATAGGC

Tabla 3. Secuencias de shRNA no relacionados, empleadas como control negativo

- Generación de vectores de entrada. Se sintetizaron oligonucleótidos de cadena sencilla conteniendo la secuencia de los shRNAs diseñados, los cuáles fueron hibridados para crear hebras de doble cadena (*double strand oligos – ds oligos*). La

hibridación se realizó mezclando 5 µL de cada hebra a una concentración de 200 µM en buffer de anillamiento 1X (Invitrogen K492000). La mezcla se incubó a 95°C durante 4 minutos y después por 10 minutos a temperatura ambiente para que se formaran las hebras de doble cadena. La formación de las hebras fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 4%.

Los *ds oligos* fueron clonados en el vector de entrada pENTRTM/H1/TO (Invitrogen K492000) mediante una reacción de ligación de acuerdo a las indicaciones del fabricante y el producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias quimio-competentes, *One Shot® TOP10 E. coli* (Invitrogen C404006), las cuales fueron transformadas mediante choque térmico con el producto de la ligación. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas de LB agar (Invitrogen 22700-025) más 50 µg/mL de kanamicina (Gibco 11815-032), como antibiótico de selección e incubadas toda la noche a 35 °C. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias diferentes, cada una se inoculó en 3 mL de medio LB y se cultivaron durante toda la noche a 35 °C con 50 µg/mL de kanamicina. Transcurrido este tiempo, se prepararon *stocks* en glicerol de cada colonia y se extrajo el ADN plasmídico de las bacterias transformadas mediante el kit *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymoresearch D4015)*. La inserción y la identidad de las secuencias de los shRNAs en los vectores de entrada fueron corroboradas por polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación Sanger.

Para el RFLP se utilizó la enzima de restricción BamHI-HF (NEBR3136S) según las indicaciones del fabricante. El producto de la restricción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % durante 120 min a 80 V y el gel fue documentado en el equipo GelDoc de BIORAD. El vector de entrada pENTRTM/H1/TO tiene un tamaño de 3869 bpb y posee dos sitios de restricción para la enzima BamHI (el primero entre las bases 1978-1804 y el segundo entre las bases 1805-1977). La inserción de los oligonucleótidos conteniendo la secuencia de los shRNAs diseñados se comprobó con un patrón de restricción de dos bandas: una con un tamaño de 3696 bp y otra de 220 bp. De no haber existido inserción el plásmido podría encontrarse en una conformación lineal y la digestión con la enzima originaría un patrón de 4 bandas. Si el plásmido se hubiera ligado sin incorporar los oligonucleótidos con la secuencia de los shRNA la segunda banda tendría un tamaño inferior a 170 bp.

La secuenciación de los plásmidos se llevó a cabo a través de una empresa siguiendo la química de Sanger por extensión del iniciador usando los *primers* universales M13. Se usó el kit de secuenciación "*Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit*" y el equipo de secuenciación "*Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer*". Los resultados de estos productos fueron recibidos en archivos comprimidos de formato AB1 y electroforegramas que mostraban la calidad del proceso de la reacción de secuenciación. Estos archivos fueron cargados en el software *Geneious Pro* y se realizó un alineamiento con las secuencias de los shRNA diseñados para confirmar que no existían cambios en la secuencia insertada en comparación con la diseñada.

- Generación de vectores de expresión. Los vectores de expresión para la producción de lentivirus fueron generados mediante una reacción de recombinación (LR) *Gateway*[®] (Invitrogen K49250), entre el vector de entrada conteniendo la secuencia que codifica para cada shRNA y el vector destino pLenti4/BLOCK-iT-DEST (Invitrogen K49250). La reacción LR se hizo utilizando la enzima *LR Clonase*^{™ II Enzyme Mix} (Invitrogen K49250) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se empleó el producto de la recombinación para transformar bacterias *E. coli* químicamente competentes: *OneShot*^{® Stbl3}[™] (Invitrogen C737303) mediante choque térmico. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo LB agar más 100 µg/mL de ampicilina como antibiótico de selección y se incubaron toda la noche a 35 °C. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias de cada vector de expresión y se cultivaron en 3 mL de medio LB caldo más 100 µg/mL de ampicilina durante toda la noche a 35 °C. Transcurrido este tiempo se prepararon *stocks* en glicerol de cada colonia y se extrajo el ADN plasmídico de las bacterias transformadas mediante el kit *Zyppy*^{™ Plasmid Miniprep Kit (D4015)}. La correcta recombinación de los plásmidos y la identidad de las secuencias de los shRNAs en los vectores de expresión fueron comprobadas por secuenciación Sanger. Una vez verificada la generación del vector para la expresión de los shRNAs, las colonias seleccionadas se amplificaron nuevamente para extraerles ADN plasmídico usando el *kit Hi Speed Plasmid Midi Kit*(QIAGEN 12643) con el fin de obtener ADN de alta pureza para la producción de los lentivirus. Al final de este procedimiento se obtuvieron 4 constructos con diferentes shRNAs no relacionados como controles negativos.
- Producción de vectores lentivirales que portan un constructo para la expresión de shRNA no relacionados.

Para la producción de vectores lentivirales se utilizaron los constructos: pMD2.G (VSVg), p-Delta-8.74 y los constructos que codifican para el shRNA no relacionados (control negativo) distribuidos en fracciones equimolares para una cantidad total de 30 µg de ADN. Se transfectaron $1,8 \times 10^7$ células HEK-293FT en caja de cultivo de 75 cm² usando 60 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen ® 11668019). Las células fueron incubadas durante toda la noche bajo las condiciones de cultivo descritas para la línea celular HEK-293FT.

- Recolección de virus. La primera recolección de lentivirus se realizó a las 16 horas, seguido por la adición al cultivo de 10 mM de butirato de sodio (Sigma B5887) en medio de cultivo DMEM complementado con 10 % de FBS. Las demás recolecciones de lentivirus se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas, retirando el medio de cultivo y almacenándolo a 4°C. Después de cada recolección se adicionó medio DMEM complementado con 10 % de FBS a las células en cultivo. Las suspensiones lentivirales se filtraron y se concentraron utilizando columna de concentración *Millipore Centricon Plus-20*[®] (Millipore UFC2 LTK 24) según las recomendaciones del fabricante.

- Titulación de los virus que portan un constructo para la expresión de shRNA no relacionados.

El título viral fue determinado cuantificando la proteína p24 de la nucleocápside del lentivirus mediante una prueba de ELISA desarrollada con el *kit Lenti-X™ p24 Rapid Titer (Clontech)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó con base en una curva estándar de concentraciones conocidas generada con proteína p24 purificada. Los lentivirus producidos fueron diluidos en medio DMEM y se lisaron con buffer de lisis incluido en el kit. La proteína p24 fue detectada mediante una prueba de ELISA tipo sándwich en donde el segundo anticuerpo se encuentra conjugado con biotina y se revela con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano, más el sustrato indicado en el *kit*. Se obtuvo un título de $2,01 \times 10^{10}$ partículas virales/mL para las mezclas de lentivirus de los shRNAs no relacionados.

Para determinar el número de unidades infectivas (IFU) por ml del stock lentiviral titulado, se asumió que una unidad infectiva equivale a 500 partículas lentivirales obteniendo así un título de $4,02 \times 10^7$ unidades infectivas /mL.

- Transducción de células U937-GFP con vectores lentivirales portando constructos que codifican para los shRNAs no relacionados. Se transdujeron células U937-GFP y U937 con la mezcla de los lentivirus codificando para 4 shRNAs no relacionados a una MOI de 8 unidades infectivas/célula. Para esto se dispensaron 5×10^5 células en 1 mL de medio RPMI más 10% de FBS, se adicionó 9 µg/mL Polybrene (Sigma H9268) y 99,5 µL de la solución viral para obtener la MOI esperada. Para el cálculo del volumen de virus a utilizar se multiplicó el número de células a transducir por la MOI esperada y se dividió por el título viral expresado en Unidades infectivas /ml.

Las células se incubaron durante toda la noche y luego se les realizó cambio de medio. Se amplificaron las células transducidas y se seleccionaron con 200 µg/mL de Zeocina (Invitrogen R25001) durante 8 días con cambio de medio cada 2 días y cuantificación diaria. La línea celular generada se denominó U937-GFP/shRNA-no relacionados.

6.2.6. Evaluación del silenciamiento

- Extracción de proteínas

Se indujo la diferenciación a macrófagos de $3,75 \times 10^6$ células por mL de las líneas celulares a evaluar. Los macrófagos fueron lavados con PBS (NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 10,1 mM) estéril pH 7,4 y lisados con buffer RIPA-Triton (Buffer Tris- NaCl: NaCl 1,25 M en Tris-HCl 0,25 M pH: 8.0, 1% RIPA Tritón X-100 (w/v), 0.5 % deoxicolato de sodio (w/v), 0.1% SDS (w/v) y 0.004% azida de sodio (w/v) en presencia del cóctel inhibidor de proteasas (# Catálogo 11836170001 de Roche®). El lisado fue centrifugado a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recolectó

la fracción soluble del lisado y el extracto de proteína total se cuantificó por el método de Bradford (BIORAD 5000006).

- SDS-PAGE.

Para la evaluación de GFP se realizaron geles de acrilamida al 10% y para correr la electroforesis vertical, en cada pozo se sembraron 25 µg de extracto de proteína total. La electroforesis vertical se corrió durante 1h y 30 minutos a 100 V. Al finalizar la electroforesis vertical uno de los geles se empleó para realizar la transferencia de proteínas a la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y el otro se empleó como control de carga. Los dos geles se corrieron en paralelo.

El gel de control de carga fue fijado con 25% de isopropanol y 10% de ácido acético, teñido con 0,006 % de azul de Coomassie durante 1h y desteñido con 10% de ácido acético para eliminar el exceso de colorante y acentuar el contraste entre las bandas y el gel. Se adquirió una imagen del gel empleando el equipo GelDoc de BIORAD.

- Western blot.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BIORAD 162-0177), durante 1 hora y 15 minutos a 100V. Posteriormente la membrana fue incubada con solución de bloqueo (TBS 1X; Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, pH 7.5 leche descremada 5% w/v) durante 1 hora con agitación constante. Se procedió a la incubación con el anticuerpo primario en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C en agitación constante. La membrana se lavó tres veces con *buffer* Tween-Tris Salino (TTBS 1X; Tris-HCl 20mM, NaCl500mM, pH 7.5 más Tween 20 0.05% v/v), luego tres veces con TBS y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Finalmente la membrana fue lavada como se indicó anteriormente y revelada mezclando en una proporción 1:1 los dos reactivos (*Luminol/enhancer* y *buffer* de peróxido) del *kit Immun-Star HRP Substrate* (BIORAD 170-5041). Se realizaron tres réplicas biológicas para cada uno de los procedimientos.

Condiciones de inmuno-detección empleadas para la detección de las proteínas GFP en el western blot:

Proteína	Anticuerpo 1°	Dilución anticuerpo 1°	Anticuerpo 2°	Dilución de anticuerpo 2°
GFP	Polyclonal <i>mouse-anti-GFP</i> (Santa Cruz Biotechnology sc-2031)	1:5000	Polyclonal <i>goat-anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase</i> (Santa Cruz Biotechnology sc-2055)	1:3000

Tabla 4. Condiciones de inmuno-detección empleadas para la detección de la proteína GFP por western blot

- Adquisición y análisis de imágenes

Se adquirieron imágenes de las membranas en el equipo *ChemiDoc* (BIORAD) empleando el módulo de acumulación de señal por captura repetida de imágenes. Las imágenes fueron tomadas cada 30s durante 10 minutos y fueron analizadas con el programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se seleccionó cada uno de los carriles de las bandas (del gel control de carga y de la membrana de PVDF) para calcular el área integrada de cada carril. El área integrada se define como el área en pixeles en donde se registra señal por encima del ruido de fondo. Se normalizaron las áreas integradas de las muestras con su área integrada correspondiente en el control de carga. La densidad relativa se calculó dividiendo el valor de área integrada normalizada de cada muestra entre el área normalizada de la línea celular de referencia (línea parental U937 en el caso de las proteínas LMNA y Gro-β o línea celular U937-GFP para la proteína GFP).

6.3. Determinación del efecto del silenciamiento de un gen endógeno (*Imna*) en el fenotipo de infección de células U937 infectadas por *L. braziliensis*.

Producción de vectores lentivirales que portan un constructo para la expresión de shRNAs contra el gen *Imna*.

Para la producción de lentivirus se utilizaron los constructos: pMD2.G (VSVg), p-Delta-8.74 y pLenti4-GW/H1/TO-lamin^{shRNA} (Invitrogen) distribuidos en fracciones equimolares para una cantidad total de 30 µg de ADN. Se transfectaron 1,8x10⁷ células HEK-293 en caja de cultivo de 75 cm² usando 2 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen ®) por cada µg de DNA para un total de 60µL. Las células fueron incubadas durante toda la noche bajo las condiciones de cultivo descritas para la línea celular HEK-293FT.

- Recolección de virus.

La primera recolección de lentivirus se realizó a las 16 horas y seguido se adicionó al cultivo celular 10 mM de butirato de sodio (Sigma) en medio de cultivo DMEM complementado con 10 % de FBS. Las demás recolecciones de lentivirus se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas, retirando el medio de cultivo y almacenándolo 4°C. Después de cada recolección se adicionó medio DMEM complementado con 10 % de FBS a las células en cultivo. Las suspensiones lentivirales se filtraron y se concentraron utilizando columna de concentración *Millipore Centricon Plus-20*® según las recomendaciones del fabricante.

- Titulación de los virus que portan un constructo que codifica para shRNA dirigido contra el gen *Imna*.

El título viral fue determinado cuantificando la proteína p24 del núcleo y la cápside del lentivirus mediante una prueba de ELISA desarrollada con el *kit Lenti-X™ p24 Rapid Titer* (Clontech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como ya se mencionó.

Se obtuvo un título de $1,90 \times 10^{10}$ partículas virales/mL para los lentivirus que portan el constructo que codifica para los shRNAs contra LMNA.

- Transducción de células U937 con vectores lentivirales que portan un constructo para la expresión de shRNAs contra el gen LMNA.

Se transdujeron las células U937 a una MOI de 380 unidades infectivas/célula dispensando 1×10^5 células contenidas en 1 mL de medio RPMI más 10% FBS. Se adicionó 9 µg/mL de Polybrene y 1 mL de la suspensión viral en una caja de cultivo de seis pozos. Las células se incubaron durante toda la noche y se les realizó cambio de medio. Después de esto, se amplificaron las células transducidas y se seleccionaron con 200 µg/mL de Zeocina (Invitrogen) durante 8 días con cambio de medio cada 2 días y cuantificación diaria para seleccionar una línea celular eficientemente transducida.

- Generación de controles negativos del proceso de silenciamiento

Como control negativo del proceso de silenciamiento en células U937 se emplearon los mismos shRNAs no relacionados utilizados en el silenciamiento del gen exógeno *gfp*.

Se utilizaron los procedimientos descritos en la sección 4.2.5

- Evaluación del silenciamiento y evaluación del fenotipo de infección

El procedimiento empleado se describió en la sección 4.2.6

Para el SDS-PAGE de la proteína LMNA se realizaron geles de acrilamida de 8% y para correr la electroforesis vertical, en cada pozo se sembraron 50 µg de extracto de proteína total.

Para el western blot se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Proteína	Anticuerpo 1°	Dilución anticuerpo 1°	Anticuerpo 2°	Dilución de anticuerpo 2°
LMNA	Polyclonal rabbit- <i>anti-LMNA</i> (Santa Cruz Biotechnology sc-20681)	1:200	Polyclonal goat- <i>anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase</i> (Santa Cruz Biotechnology sc-2054)	1:3000

Tabla 5. Condiciones de inmuno-detección empleadas para la detección de la proteína LMNA por *Western blot*

6.4. Determinación del efecto del silenciamiento del gen *gro-β* sobre el fenotipo de infección de células U937 infectadas con *L. braziliensis*

El gen *gro-β* fue seleccionado entre los genes reportados en los ensayos por microarreglos como diferencialmente expresado, entre macrófagos no infectados e

infectados por *L. (V.) braziliensis*, con FC=1,92. Los ensayos de microarreglos se describen más adelante

Silenciamiento del gen *gro-β*

- Diseño de shRNAs dirigidos contra *gro-β*.

Para el diseño de los shRNAs se seleccionó la secuencia codificante del gen *gro-β* (NM_002089.3) a partir de la cual se generaron shRNAs con ayuda de herramientas bioinformáticas especializadas como:

- Kribb
- Dharmacon

Se seleccionaron 5 shRNAs teniendo en cuenta los siguientes criterios: secuencias dirigidas a diferentes regiones de la secuencia blanco con el fin de aumentar las probabilidades de silenciamiento del gen y evitar su solapamiento, longitud entre 19-21 nucleótidos; porcentaje de guanina/citosina entre 35% y 55% y finalmente, que no se alinee con otras secuencias transcritas del genoma humano diferentes al gen de interés. Para formar la estructura de los shRNAs se empleó la herramienta de Invitrogen: [Invitrogen Block-iT RNAi Designer](http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/) que permite insertar el *loop* y los sitios de unión adecuados de acuerdo al vector de entrada utilizado, en este caso: *BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit* de Invitrogen: (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>)

Las secuencias empleadas como shRNAs dirigidos contra *gro-β* son las siguientes:

shRNA Gro-β-1	<i>Top strand</i>	CACCGCATCGCCCATGGTTAAGACGAATCTTAACCATGGGCGATGC
	<i>Bottonstrand</i>	AAAAGCATCGCCCATGGTTAAGATTCGTCTTAACCATGGGCGATGC
shRNA Gro-β-2	<i>Top strand</i>	CACCGCATCCAAAGTGTGAAGGTGAAGTCGAAACTTCACCTTCACACTTTGGATG
	<i>Bottonstrand</i>	AAAACATCCAAAGTGTGAAGGTGAAGTTTCGACTTCACCTTCACACTTTGGATGC
shRNA Gro-β-3	<i>Top strand</i>	CACCAAGATGCTGAAAAATGGCAAATCCGAAGATTTGCCATTTTTTCAGCATC
	<i>Bottonstrand</i>	AAAAGATGCTGAAAAATGGCAAATCTTCGGATTTGCCATTTTTTCAGCATCTT
shRNA Gro-β-4	<i>Top strand</i>	CACCGAAGGAAGGAGGAAGCTTACGAATAAGCTTCCTCCTTCCTTC
	<i>Bottonstrand</i>	AAAAGAAGGAAGGAGGAAGCTTATTCGTAAGCTTCCTCCTTCCTTC
shRNA Gro-β-5	<i>Top strand</i>	CACCGCGCCCATGGTTAAGAAAATCGAAATTTTCTTAACCATGGGCG
	<i>Bottonstrand</i>	AAAACGCCCATGGTTAAGAAAATTTTCGATTTTCTTAACCATGGGCGC

Tabla 6. Secuencias de shRNAs dirigidos contra el gen *gro-β*

Como control negativo se emplearon los constructos que codifican para los shRNAs no relacionados, empleados para generar las líneas celulares que se utilizaron como controles negativos en el silenciamiento de los genes *gfp* y *Imna*.

- Generación de vectores de entrada.

Se ordenó la síntesis de oligo-nucleótidos de cadena sencilla conteniendo la secuencia de los shRNAs diseñados. Éstos fueron hibridados para formar hebras de doble cadena (*double strand oligos – ds oligos*). La hibridación se realizó mezclando 5 µL de cada hebra a una concentración de 200 µM en buffer de anillamiento 1X (Invitrogen K492000). La mezcla se incubó a 95°C durante 4 minutos y después a temperatura ambiente por 10 minutos para que se formaran las hebras de doble cadena. La formación de las hebras fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 4%.

Los *ds oligos* fueron clonados en el vector de entrada pENTRTM/H1/TO (Invitrogen K492000) mediante una reacción de ligación de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Bacterias quimio-competentes *One Shot® TOP10 E. coli* (Invitrogen C404006) fueron transformadas mediante choque térmico por el producto de la ligación. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas con LB agar (Invitrogen 22700-025) más 50 µg/mL de kanamicina (Gibco 11815-032), como antibiótico de selección, y se incubaron toda la noche a 35 °C. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias diferentes, cada una se inoculó en 3 mL de medio LB caldo con 50 µg/mL kanamicina y se cultivaron durante toda la noche a 35 °C. Transcurrido este tiempo, se prepararon *stocks* en glicerol de cada colonia y se extrajo el DNA plasmídico de las bacterias transformadas mediante el kit *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo research D4015). La inserción y la identidad de las secuencias de los shRNAs en los vectores de entrada fueron corroboradas por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación Sanger.

Para el RFLP se utilizó la enzima de restricción BamHI-HF (NEB R3136S) según las indicaciones del fabricante. El producto de la restricción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % durante 120 min a 80 v y el gel fue documentado en el equipo GelDoc de BIORAD. El vector de entrada pENTRTM/H1/TO tiene un tamaño de 3869 bp, y posee dos sitios de restricción para la enzima BamHI (el primero entre las bases 1978-1804 y el segundo entre las bases 1805-1977). La inserción de los oligo nucleótidos conteniendo la secuencia de los shRNAs diseñados se comprobó con un patrón de restricción de dos bandas; una con un tamaño de 3696 bp y otra de 220 bp. De no haber existido inserción el plásmido podría encontrarse en una conformación lineal y la digestión con la enzima originaría un patrón de 4 bandas. Si el plásmido se hubiera ligado sin incorporar los oligo nucleótidos con la secuencia de los shRNA la segunda banda tendría un tamaño inferior a 170 bp.

Se ordenó la secuenciación de los plásmidos la cual fue realizada siguiendo la química de Sanger por extensión del iniciador usando los primer universales M13. Se usó el kit de secuenciación “Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit” y el equipo de secuenciación “Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer”. Los resultados de estos productos fueron recibidos en archivos comprimidos de formato AB1 y electroforegramas que mostraban la calidad del proceso de la reacción de

secuenciación. Estos archivos se fueron cargados en el software *Geneious Pro* y se realizó un alineamiento con las secuencias de los shRNA diseñados para confirmar que no existían cambios en la secuencia insertada en comparación con la diseñada.

- Generación de vectores de expresión.

Los vectores de expresión para la producción de lentivirus fueron generados mediante una reacción de recombinación (LR) *Gateway®* (Invitrogen K49250) entre el vector de entrada conteniendo la secuencia que codifica para cada shRNA y el vector destino pLenti4/BLOCK-iT-DEST (Invitrogen K49250). La reacción LR se hizo utilizando la enzima *LR Clonase™II Enzyme Mix* (Invitrogen K49250) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Bacterias *E. coli* químicamente competentes: *OneShot® Stb I3™* (Invitrogen C737303) mediante choque térmico fueron transformadas con el producto de recombinación. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo LB agar más 100 µg/mL de ampicilina como antibiótico de selección y se incubaron toda la noche a 35 °C. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias de cada vector de expresión y se cultivaron en 3 mL de medio LB caldo durante toda la noche a 35 °C. Transcurrido este tiempo se prepararon *stocks* en glicerol de cada colonia y se extrajo el DNA *plasmídico* de las bacterias transformadas mediante el kit *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo research D4015)*. La correcta recombinación de los plásmidos y la identidad de las secuencias de los shRNAs en los vectores de expresión fueron comprobadas por secuenciación Sanger.

Una vez verificada la generación del vector de expresión que codifica para los shRNAs, las colonias seleccionadas se amplificaron nuevamente para extraerles ADN plasmídico usando el *kit HiSpeed Plasmid Midi Kit* (QIAGEN 12643) con el fin de obtener ADN de alta pureza para la producción de los lentivirus. Al final de este procedimiento se obtuvieron 4 constructos con diferentes shRNAs dirigidos contra el gen *gro-β*.

- Producción de vectores lentivirales que portan un constructo para la expresión shRNAs dirigidos contra el gen Gro-β.

Para la producción de lentivirus se utilizaron los constructos: pMD2.G (VSVg), p-Delta-8.74 (cordialmente cedidos por el Doctor David Ann: [67] y el vector de expresión portando los constructos que codifican para los shRNAs dirigidos contra *gro-β* distribuidos en fracciones equimolares para una cantidad total de 30 µg de ADN. Se transfectaron $1,8 \times 10^7$ células HEK-293 en caja de cultivo de 75 cm² usando 2µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen® 11668019) por cada microgramo de DNA transfectado. Las células fueron incubadas durante toda la noche bajo las condiciones de cultivo descritas para la línea celular HEK-293FT.

- Recolección de virus.

La primera recolección de lentivirus se realizó a las 16 horas y seguido se adicionó al cultivo celular 10 mM de butirato de sodio (Sigma) en medio de cultivo DMEM complementado con 10 % de FBS. Las demás recolecciones de lentivirus se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas, retirando el medio de cultivo y almacenándolo a 4°C. Después de cada recolección se adicionó medio DMEM complementado con 10 % de FBS a las células en cultivo. Las suspensiones lentivirales se filtraron y se concentraron utilizando columna de concentración *Millipore Centricon Plus-20®* según las recomendaciones del fabricante.

- Titulación de los virus que portan un constructo que codifica para shRNA dirigido contra el gen *gro-β*.

El título de la mezcla viral fue determinado cuantificando la proteína p24 del núcleo y la cápside del lentivirus mediante una prueba de ELISA desarrollada con el *kit Lenti-X™ p24 Rapid Titer (Clontech)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como ya se mencionó. Se obtuvo un título de $2,12 \times 10^{10}$ partículas virales/mL para los lentivirus conteniendo el constructo que codifica para los shRNAs contra *gro-β*.

- Transducción de células U937 con vectores lentivirales portando constructos que codifican para los shRNAs dirigidos contra *gro-β*.

Se transdujeron las células U937 a una MOI de 0,2 con la mezcla de los lentivirus portando los constructos codificantes para shRNAs dirigidos contra el gen *gro-β*. Para esto se dispensaron 5×10^5 células en 1 mL de medio RPMI más 10% FBS, se adicionó 9 µg/mL Polybrene (Sigma H9268) y la cantidad necesaria de la mezcla viral para obtener la MOI esperada. Para el cálculo del volumen de virus a utilizar se multiplicó el número de células a transducir por la MOI esperada y se dividió por el título viral expresado en Unidades infectivas /ml.

Las células se incubaron durante toda la noche y se les realizó cambio de medio. Después de esto, se amplificaron las células transducidas y se seleccionaron con 200 µg/mL de Zeocina (Invitrogen R25001) durante 8 días con cambio de medio cada 2 días y cuantificación diaria para seleccionar una línea celular eficientemente transducida.

- Generación de controles negativos del proceso de silenciamiento
Se utilizaron los descritos en la sección 4.2.5. La MOI utilizada en la transducción fue de 0.2 unidades infectivas por célula
- Evaluación del silenciamiento y evaluación del fenotipo de infección
El procedimiento empleado se describió en la sección 4.2.6

Para el SDS-PAGE de la proteína Gro-β se realizaron geles de acrilamida/bisacrilamida de 15% y para correr la electroforesis vertical, en cada pozo se sembraron 200 µg de extracto de proteína total.

Para el *Western blot* se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Proteína	Anticuerpo 1°	Dilución anticuerpo 1°	Anticuerpo 2°	Dilución de anticuerpo 2°
GRO-β	Polyclonal goat- <i>anti-Gro-β</i> Thermo Scientific PA5-19126	1: 500	polyclonal <i>rabbit-anti-goat IgG conjugated to horseradish peroxidase</i> (Abcam ab6741)	1:5000

Tabla 7. Condiciones de inmuno-detección empleadas para la detección de la proteína Gro-β por *Western blot*

6.5. Identificación de genes expresados diferencialmente entre macrófagos no infectados e infectados por *L. braziliensis*

- Extracción de RNA

El RNA total fue extraído a las 72 horas después de la infección. Se sembraron $6,75 \times 10^6$ células/mL en caja de Petri de 100 mm² y se diferenciaron e infectaron según lo descrito previamente. Los macrófagos infectados y no infectados fueron lavados tres veces con PBS pH 7.4 estéril y se adicionó 500 µl de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen 15596-018) directamente a las cajas de cultivo. El reactivo se distribuyó por toda la superficie con un rastrillo de plástico y se siguió el protocolo de acuerdo a las instrucciones del fabricante hasta obtener la fase acuosa conteniendo el RNA, a la cual se adicionó un volumen equivalente de etanol al 70%. Esta solución se transfirió a una mini columna de centrifugación del *kit RNeasy* (QIAGEN 74104) para realizar la purificación y precipitación del RNA según las indicaciones del fabricante. La calidad y cantidad del RNA fue evaluada mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) y el equipo *Agilent 2100 Bioanalyze* usando el *kit RNA 6000 Nano LabChip* (*Agilent Technologies Ltd.*). Todas las muestras tenían proporción 260/280 superior a 1.9 y valor de integridad (*RNA integrity numbers- RIN*) mayor a 7.8. Las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su uso.

- Ensayo de microarreglos.

Se utilizaron dos tipos de muestras: una proveniente de macrófagos infectados y la otra de no infectados. Por cada condición se realizaron tres réplicas biológicas y para cada una de ellas tres réplicas técnicas para un total de 18 microarreglos. El servicio de microarreglos fue contratado con la compañía *Almac Diagnostics* (Durham U.K).

En la metodología utilizada por *Almac Diagnostics* se reporta que inicialmente se redujo la cantidad de RNA ribosomal de las muestras de RNA total usando el *kit RiboMinus™ Human transcriptome isolation* (*Life Technologies K155001*). Se

sintetizó el DNAC de cadena sencilla usando *NuGENOvation™ RNA amplification system* (NuGEN Technologies Inc. 3100-12) y el DNAC fue fragmentado y marcado con biotina mediante el *kit GeneChip® WT Terminal Labelling Kit* (Affymetrix Inc.900670). Cada fragmento marcado fue hibridado en el microarreglo *Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array*. (Affymetrix Inc. 900649) durante 16 horas a 45°C. Finalmente, los arreglos hibridados fueron lavados, teñidos y escaneados usando el *GeneChip® Fluidics Station 450* y el escáner *GeneChip® Scanner 3000* (Affymetrix Inc.) para generar los datos crudos de los niveles de expresión.

- Normalización y procesamiento de datos de microarreglos.

Los datos crudos generados por la aplicación *Affymetrix Expression Console* versión 1.1 (EC), fueron normalizados aplicando el algoritmo de *Robust Multichip Average* (RMA). Se utilizó la herramienta *Exon QC Summary* versión 1, basados en los estándares de *Almac Diagnostics Gene Chip Quality Control* para evaluar la calidad de los datos.

En la etapa de procesamiento los datos se filtraron teniendo en cuenta la intensidad de las sondas (p valor = 0.01 para el ruido de fondo) y la varianza ($\alpha = 0,8$). Con estos parámetros se eliminaron los transcritos poco informativos, obteniendo 15237 conjuntos de sondas que superaron los umbrales estadísticos que dan soporte a la confianza de los genes detectados. Este análisis fue realizado con la herramienta de *Feature Selection Workflow* (versión102), desarrollada por *Affymetrix*.

- Identificación de genes diferencialmente expresados.

Mediante el método de análisis estadístico ANOVA y comparaciones *pos-hoc* se identificaron los transcritos diferencialmente expresados entre los grupos evaluados (*i.e.* macrófagos infectados y no infectados) y las réplicas biológicas. El efecto de inflación por la aplicación de las pruebas múltiples se redujo usando la tasa de falsos positivos (*false discovery rate* – FDR) de la ANOVA de los valores p [69].

La matriz de datos pre-procesada se estandarizó con la mediana de los valores de expresión de las sondas y con la aplicación de los algoritmos *Euclidean distance* y *Ward'slinkage*. Los transcritos diferencialmente expresados se seleccionaron considerando un cambio en la expresión de mínimo 1,5 veces entre los grupos, con un valor $p \leq 0.05$. Con el programa *Partek® Genomics Suite* versión 6.5 se generaron los mapas de calor que muestran las agrupaciones jerárquicas de las réplicas biológicas y técnicas.

Los datos crudos y los datos procesados fueron depositados en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) con el número de acceso GSE61211 de acuerdo a los lineamientos de MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) [70].

- Análisis de enriquecimiento funcional.

Para este análisis se emplearon dos herramientas, una desarrollada por ALMAC Diagnostics: *Functional Enrichment Tool* (FET), basado en las anotaciones de Gene Ontology (GO)[71] y la otra, el software comercial Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). Los análisis permitieron identificar y ordenar las entidades biológicas asociadas con las listas de genes expresados diferencialmente[72]. Cada entidad se ordenó de acuerdo al valor estadístico obtenido en el análisis de enriquecimiento[73] y éste fue ajustado para “múltiples pruebas” [69]. De este modo se evaluó la probabilidad de que la asociación entre un gen particular y una entidad biológica se debiera al azar.

6.5.1. Validación de los niveles de expresión por PCR cuantitativa (qPCR).

Se utilizó RT-qPCR con el fin de validar los resultados obtenidos por microarreglos. Se seleccionaron 14 genes de los cuales 9 fueron escogidos al azar dentro del grupo de los 218 genes con expresión diferencial, 4 genes que hacen parte de la vía de la biosíntesis del colesterol y el último gen corresponde a *gro-β* el cual fue seleccionado para validar el modelo debido a que ha sido reportado en múltiples ensayos de microarreglos. Los genes *β2M* y *GNB2L1* fueron usados como genes *housekeeping* dado que su expresión en macrófagos infectados y no infectados no varió en los ensayos de microarreglos. Las secuencias de los iniciadores empleados para amplificar los genes *housekeeping* y los genes seleccionados se encuentran en la tabla 8.

- Generación de cDNA

Las muestras de ARN utilizadas para los análisis de microarreglos fueron tratadas con DNasa I (*Invitrogen 18068-015*) adicionando 1U de enzima por cada μg de ARN, con el fin de eliminar cualquier contaminación con ADN genómico. Empleando el kit de retro-transcripción: *High Capacity RNA-to-cDNA (4387406)* y siguiendo las instrucciones del fabricante, se obtuvo cDNA a partir del RNA tratado previamente con DNasa I. En cada experimento de retro-transcripción se empleó como control negativo el RNA sin la enzima retro-transcriptasa.

- Diseño de primers.

Se diseñaron *primers* para los 14 genes y los genes *house keeping* β -2 microglobina y *GNB2L1* usando la herramienta *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Se utilizaron las siguientes secuencias:

Gen	Secuencia de <i>primers</i> utilizados		Temperatura de anillamiento (°C)
GNB2L1	Fwd	GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG	60,0 °C
	Rev	GCTTGCAGTTAGCCAGGTTC	
B2M	Fwd	ACTGAATTCACCCCACTGA	60,0 °C
	Rev	CCTCCATGATGCTGCTTACA	
HMGCS1	Fwd	GATGTGGGAATTGTTGCCCTT	62,0 °C
	Rev	ATTGTCTCTGTTCCAACCTCCAG	
HMGCR	Fwd	AGCTTGCCCGAATTGTGTGT	630 °C
	Rev	CCAATGCCCATGTTCCAGTT	
MSMO1	Fwd	GCCAGAGACATGGGAAAACC	62,0 °C
	Rev	GCACAACCAAAGCATCTTGC	
DHCR7	Fwd	CTCCTGCAGGGGTTGTGAAC	63,0 °C
	Rev	CGAAGGTGGAGACGGCATAG	
ATP8B4	Fwd	ACGACATTCCCTGACCCAGA	63,0 °C
	Rev	AGGCCTTCGGCTACTTGGAG	
B3GNT7	Fwd	CTGGGACGTGACCACCACTA	62,0 °C
	Rev	GACCGACTTGACAACCACCA	
C14orf1	Fwd	GGGGAGTCATGAGCCGTTTC	63,0 °C
	Rev	AGCGTCCAGATCCCAAAGGT	
CDKN1	Fwd	CTCGTCGGGGTCTGTGTCTT	63,0 °C
	Rev	CAGGCTAGGGCTCCCGTTA	
CXCL2	Fwd	TGCTGAAAAATGGCAAATCC	61,0 °C
	Rev	CATTAGGCGCAATCCAGGT	
FADS1	Fwd	CTTTGCCACCTTTTGGGTGT	63,0 °C
	Rev	TGTCCCTTTGTGGCCATGTA	
HSP40	Fwd	AGGCAGCGGACAAAGAGGTAAG	63,0 °C
	Rev	CTGGGTCCTCTCTGCTGCTT	
KCNE4	Fwd	GTTTCGCAGATCCGTTAGGC	63,0 °C
	Rev	CTGAAACCCAGGAGGTGGAG	
KCNK3	Fwd	ACCAAAGCTGCGGAGAGAAG	63,0 °C
	Rev	GAGTGAGGGGGAAGCAACAC	
LRRC37A3	Fwd	TACACCGTATCCCGGTAGCC	63,0 °C
	Rev	AGGAGCTGTGGAAGCTGTGC	
MDP1	Fwd	GGCTGCTTCAAGGACAAGTG	62,0 °C
	Rev	ATTCCGCCTCTCATCATCAA	
MMP3	Fwd	TGAGGACACCAGCATGAACC	63,0 °C
	Rev	GCATCACCTCCAGAGTGTCTG	
MUCL1	Fwd	CCAGCTACTGGTCCTGCTGA	63,0 °C
	Rev	CCCAACCCATTTGGGTAAAA	
PLEKHA1	Fwd	TTCTTAGTGGAGGGCCAGAG	63,0 °C
	Rev	ACGGAAAGCGTGTGTTGGATT	
PSME2	Fwd	GGTGCTGGAGAGGGTGAATG	62,0 °C
	Rev	CCATAGGCTGCCTCATCTCG	

RHOB	Fwd	AGAGAGCTAGGCCGAGTCCA	63,0 °C
	Rev	GCGTTCTCTCGCTGCGCTT	
SEPTIN11	Fwd	AGGGAATAACCGCGAATGCT	63,0 °C
	Rev	CTGCTGAGGCGGTGAGAAGT	
STAT2	Fwd	CCTCCTGCCTGTGGACATTC	63,0 °C
	Rev	CTGCAACGGCCACACTCATA	

Tabla 8. Condiciones de amplificación de los genes seleccionados para hacer la validación, por RT q-PCR, de los resultados de microarreglos. Se reportan las secuencias de los *primers* y la temperatura de anillamiento para cada gen.

- q-PCR.

Se cuantificaron los niveles de expresión de los genes mediante qPCR usando el *kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BIO-RAD 172-5201)*. La mezcla de reacción para la PCR en tiempo real se realizó adicionando 1 μ L de cDNA, 10 μ L de master mix y el volumen correspondiente de iniciadores. La mezcla se llevó a volumen final de 20 μ L con agua ultra pura. La PCR se llevó a cabo según el siguiente perfil térmico:

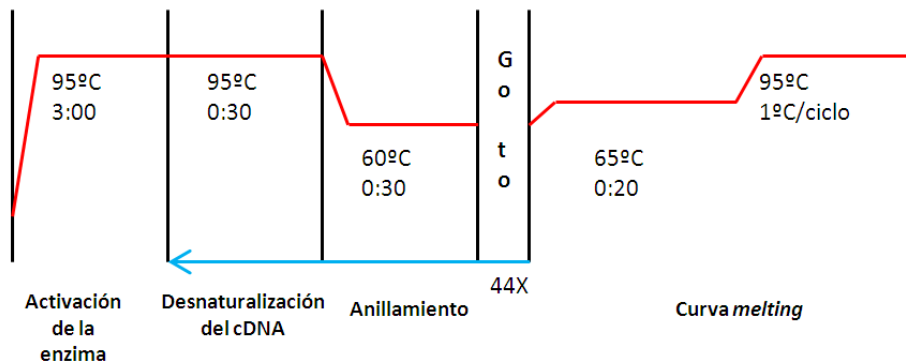


Figura 2. Perfil térmico. Configuración para realizar la qPCR, la temperatura de anillamiento depende del gen evaluado según lo consignado en la tabla 8.

Los valores de expresión fueron determinados por el método $\Delta\Delta Cq$ usando el módulo *Gene Expression* del software *CFX manager™ versión 3.0* (BIORAD). El análisis se hizo normalizando los valores de expresión de los genes de interés con la expresión de los genes de referencia (*housekeeping*). Para comparar los niveles de expresión de los genes de los macrófagos infectados versus los de macrófagos no infectados se tomó como condición control: macrófagos no infectados. Estos ensayos se realizaron por triplicado para las tres diferentes réplicas biológicas de las muestras de cDNA de macrófagos infectados y no infectados.

6.6. Análisis estadístico

- Cinética de crecimiento de las líneas celulares U937 y U937-GFP: Para determinar si el tipo de línea celular tiene algún efecto en la relación que existe entre la concentración celular y el día de cultivo se aplicó el modelo de regresión lineal con el programa STATA 13.
- Porcentaje de diferenciación de las líneas celulares. Para comparar la capacidad de diferenciación entre las líneas U937 y U937-GFP se aplicó la prueba t-Student con nivel de confianza del 95%.
- Niveles de expresión de proteína obtenidos por Western blot. se calculó la media geométrica de las densidades ópticas relativas normalizadas con el control de carga, de las tres réplicas biológicas de las líneas evaluadas. Para cuantificar las diferencias entre las señales obtenidas en los ensayos de Western blot, la media geométrica de las densidades relativas se expresó en porcentaje y la resta entre el porcentaje de la línea de referencia y el porcentaje de cada línea evaluada se interpretó como la diferencia de expresión (Biosciences, 2013).
- Fenotipo de infección: para determinar si existían diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de infección entre las líneas celulares generadas respecto a la línea parental, se aplicó la prueba X^2 . Para establecer si habían diferencias entre las cargas parasitarias de las líneas celulares evaluadas se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de múltiples comparaciones de Dunn.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas Stata 13 y GraphPad Prism 5.0.

7. Resultados

7.1. Determinación del momento de la replicación de amastigotes – establecimiento de la infección.

Para determinar el momento del establecimiento de la infección se indujo la diferenciación de macrófagos derivados de células U937 incubando $1,2 \times 10^5$ células durante 120 horas con PMA en medio RPMI-1640 complementado con 10% de FBS a 37 °C, en una atmosfera de 5% de CO₂ sobre una matriz de vidrio en una placa de 24 pozos. Los macrófagos fueron infectados con promastigotes opsonizados de *L. (V.) braziliensis* en proporción 15:1 respecto a los macrófagos y se calculó la carga parasitaria cada 24 horas mediante tinción de Giemsa y observación por microscopio óptico. El experimento fue realizado por triplicado y en cada tiempo se evaluaron 3 réplicas técnicas (figura 3).

La carga parasitaria se mantiene estable durante a las primeras 48 horas y hacia el final del periodo evaluado (entre las 96 y 120 horas). No obstante, entre las 48 y 72 horas se observa un aumento de la carga parasitaria, indicando la replicación activa de los

amastigotes durante la infección. Teniendo en cuenta lo anterior se seleccionó la evaluación de la infección a las 72 h ya que es el momento en el cual se observó que los amastigotes se estaban replicando dentro del macrófago y la infección se había establecido.

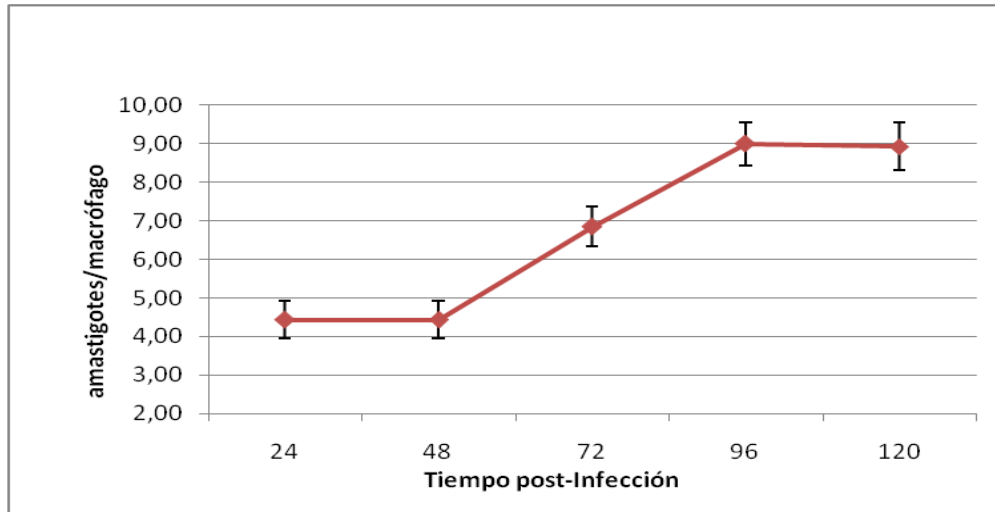


Figura 3. Evaluación de la carga parasitaria de macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* durante 120 h. Se observó que a las 72 horas había replicación de los amastigotes y se escogió este tiempo para realizar todos los experimentos.

7.2. Determinación del efecto de la expresión y silenciamiento de un gen exógeno en el fenotipo de infección de células U937 infectadas con *L. braziliensis*

Con el fin de evaluar de una forma eficiente la capacidad de las células U937 para ser modificadas genéticamente y determinar si estas modificaciones se podían evidenciar en los macrófagos derivados de la línea celular, las células fueron transducidas con vectores lentivirales que portan el gen codificante para la proteína GFP. Una vez verificada la expresión del gen, las células fueron transducidas con vectores portando un constructo que codifica para shRNAs contra el gen GFP. Con estos procedimientos se evaluó la expresión y silenciamiento de un gen exógeno. La selección de este gen se realizó teniendo en cuenta que la proteína codificada es estable y no requiere co-factores o sustratos adicionales para ser visualizado mediante microscopía de fluorescencia. Adicionalmente, se verificó si la expresión de GFP afecta las características básicas de la línea celular. Por tal razón se evaluaron los parámetros de curva de crecimiento, viabilidad y diferenciación.

7.2.1. Expresión de un gen exógeno: *gfp*

La eficiencia de la transducción se evaluó por microscopía a las 72 horas después de la adición de los lentivirus al cultivo celular. Los resultados mostraron que el 100% de las células expresaron el gen *gfp*. Se observó variación en la intensidad de la fluorescencia entre las células de la población evaluada (Figura 4A). Durante los 20 pases realizados a la línea celular U937-GFP, 100% de las células mantuvieron la expresión del gen. No fue necesaria la selección con antibióticos.

7.2.2. Caracterización de la línea expresando GFP

- Cinética de crecimiento

El modelo de regresión lineal como era esperado, mostró que el día del cultivo explica el 90% de la variabilidad de la concentración celular ($R^2=0,8959$). Al realizar el modelo incluyendo la variable del tipo de línea celular se demostró que el crecimiento no es afectado por éstas como se observa en la figura 4B, en donde ambas curvas de crecimiento se solapan en la mayoría de los días de cultivo.

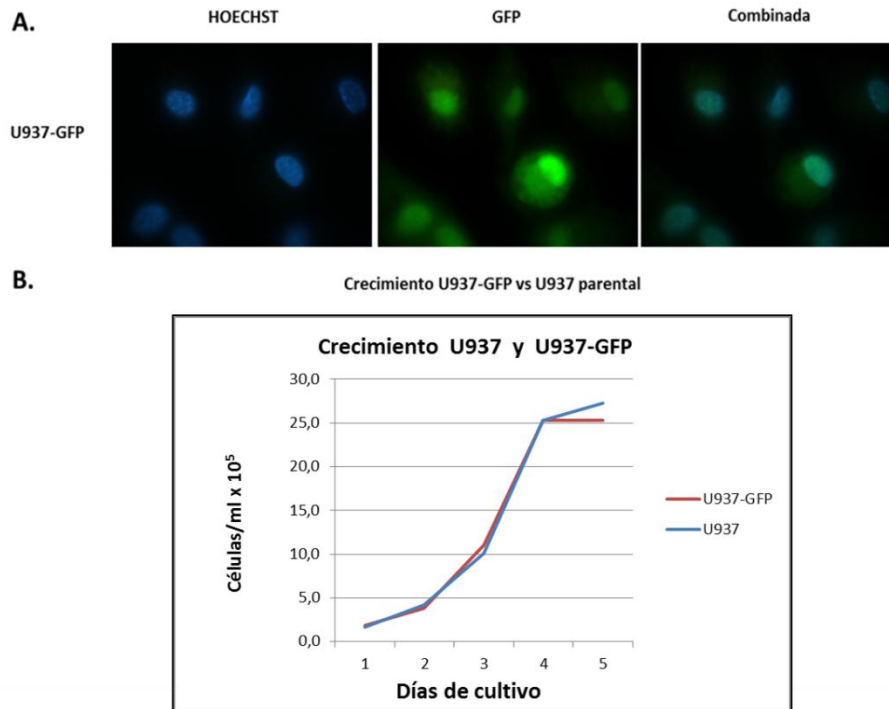


Figura 4. Células U937 expresando la proteína verde fluorescente y cinética de crecimiento. **A)** imágenes de microscopía de fluorescencia tomadas a 1000 aumentos. Núcleos teñidos con 1,25 $\mu\text{g/mL}$ de Hoechst (izquierda), células expresando GFP (centro) e imagen resultante de la combinación de los dos canales de fluorescencia (derecha). **B)** Cinética de crecimiento de las líneas celulares U937 y U937-GFP, se grafican las medianas de 3 experimentos independientes.

- Diferenciación de monocitos a macrófagos:

Al aplicar la prueba de t-Student, los resultados mostraron que no hay diferencias estadísticas significativas entre el porcentaje de diferenciación a macrófagos de la línea U937-GFP respecto a la línea parental U937 ($p=0,3298$) (figura 5).

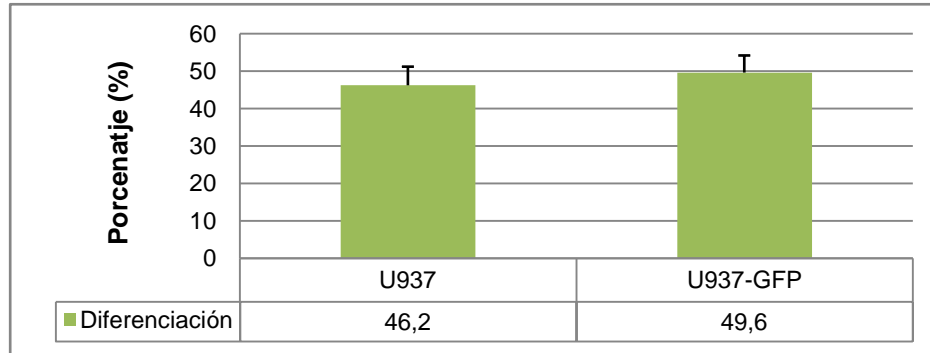


Figura 5. Porcentaje de diferenciación de las líneas celulares U937-GFP y U937. Las líneas celulares fueron diferenciadas a macrófagos mediante tratamiento con PMA, 100 µg/mL, durante 120 horas sobre una matriz de vidrio. Se muestra los resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

7.2.3. Silenciamiento del gen exógeno

Con el objetivo de evaluar el silenciamiento se compararon, mediante western blot, los niveles de la proteína GFP de las líneas U937-GFP/shRNA-GFP y U937-GFP/shRNA no relacionados (Control negativo) con los niveles de expresión de la línea U937-GFP. Se encontró una reducción de 88.9% en los niveles de GFP de la línea U937-GFP/shRNA-GFP. No se registró reducción de los niveles de la proteína en la línea U937-GFP/shRNA no relacionados (Figura 6A). Se muestra el promedio de tres experimentos en los que se evaluaron los niveles de expresión de la proteína GFP en las líneas celulares U937, U937-GFP/shRNA-GFP y U937-GFP/shRNA no relacionados tomando como referencia la línea U937-GFP (Figura 6B).

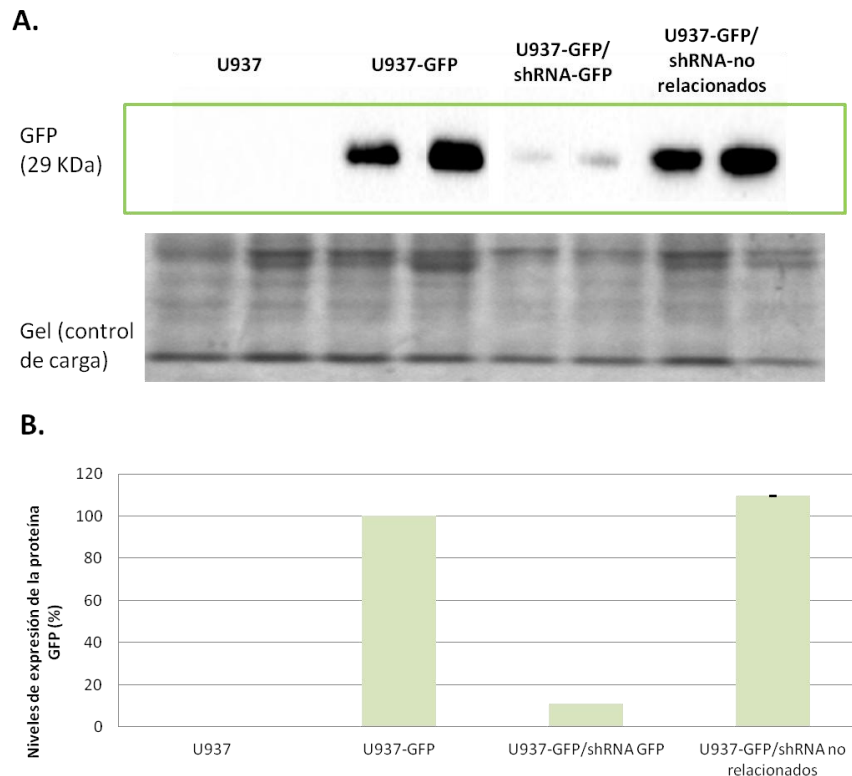


Figura 6. Comparación de la expresión de GFP en diferentes líneas celulares A) *Western blot* de los niveles de la proteína GFP expresados en porcentaje. La línea celular U937-GFP fue transducida con vectores lentivirales que portaban un constructo para la expresión de shRNA dirigido contra GFP o shRNAs no relacionados. Las diferentes líneas celulares fueron diferenciadas a macrófagos y se realizó extracción de proteínas. Para el SDS-PAGE se cargaron 25 µg de proteína total en dos geles de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Uno de ellos fue empleado para el Western blot y el otro como control de carga teñido con azul de Coomassie. Se observa disminución de los niveles de proteína en la línea U937-GFP/shRNA-GFP respecto a la línea U937-GFP y al control negativo U937-GFP/shRNA-no relacionados. **B)** Niveles de expresión de la proteína GFP de las líneas celulares U937, U937-GFP/shRNA-GFP y U937-GFP/shRNA-no relacionados normalizadas respecto a la expresión de la línea U937-GFP.

7.2.4. Evaluación del fenotipo de infección de la línea silenciada para *gfp*

Después de realizar la evaluación funcional se encontró que las líneas celulares que expresan GFP tenían menor porcentaje de infección y carga parasitaria que la línea parental y la línea silenciada para GFP.

Se utilizó la prueba de X^2 para evaluar la independencia o asociación entre las líneas celulares (U937-GFP, U937-GFP/shRNA-GFP, U937-GFP/shRNA-no relacionados y U937) y el porcentaje de infección. Los análisis de X^2 para las líneas celulares con expresión de GFP arrojaron valor $p \leq 0,05$, lo que indica que hay asociación entre las líneas celulares expresando GFP y el porcentaje de infección. De otra parte, los análisis de X^2 realizados para la línea sin expresión de GFP o silenciada para *gfp* arrojaron valor $p \geq 0,05$ lo que indica que no hay asociación entre el tipo de línea celular y el porcentaje de infección. Como se observa en la figura 7 y tabla 9 las líneas celulares con expresión de GFP (U937-GFP y U937-GFP/shRNA-no relacionados) presentan porcentaje de infección similar, el cual es inferior al porcentaje de infección registrado para las líneas sin expresión o con baja expresión de GFP (U937 y U937-GFP/shRNA-GFP). Estos resultados sugieren que la expresión de GFP está relacionada con los cambios registrados en el porcentaje de infección.

Para determinar si hay diferencias estadísticas en la carga parasitaria de las líneas evaluadas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis la cual dio como resultado que hay diferencias estadísticas significativas entre las líneas y la línea parental ($p=0,0001$). Por medio de la prueba de múltiples comparaciones de Dunn se identificó que las diferencias estadísticas significativas se dan entre la línea parental (U937) y la línea U937-GFP y entre la línea parental y la línea U937-GFP/shRNA-no relacionados ($p < 0,05$), mientras que no hubo diferencias significativas entre la línea parental y la línea U937-GFP/shRNA-GFP.

Línea celular	Porcentaje de infección \pm SD	Promedio carga parasitaria
U937	44,4% \pm 4,97	2,0
U937-GFP	29,4% \pm 4,56	1,3
U937-GFP/shRNA-GFP	45,3% \pm 4,98	2,4
U937-GFP/shRNA-no relacionados	32,2% \pm 4,65	1,1

Tabla 9. Valores de porcentaje de infección y carga parasitaria de cada una de las líneas evaluadas: U937, U937-GFP, U937-GFP/shRNA GFP y U937-GFP/shRNA no relacionados. SD: Desviación estándar.

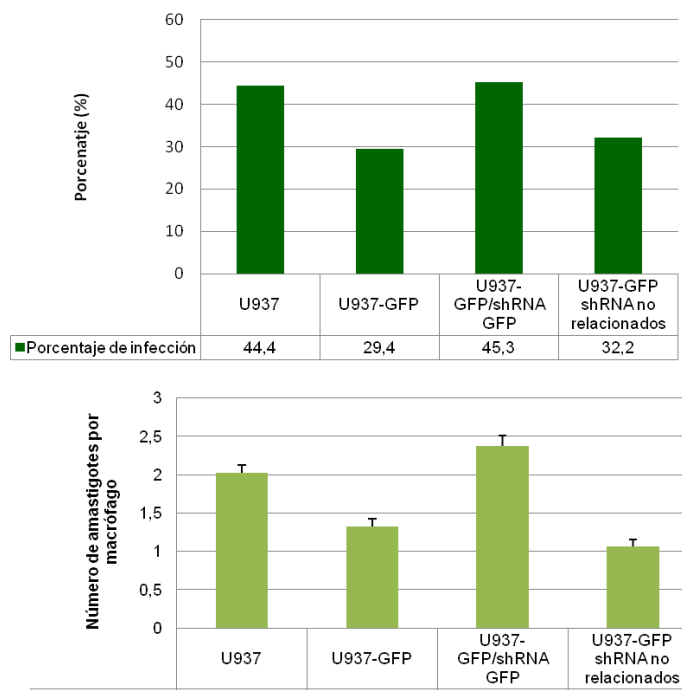


Figura 7. Resultados de la evaluación funcional de las diferentes líneas celulares: porcentaje de infección y carga parasitaria. Se indujo diferenciación a macrófagos de las líneas: U937, U937-GFP, U937-GFP/shRNA-GFP y U937-GFP/shRNA-no relacionados mediante tratamiento con 100 ng/mL de PMA durante 120 horas. Los macrófagos obtenidos fueron infectados con promastigotes de *L. braziliensis*. Después de 72 horas de infección los macrófagos infectados fueron fijados con paraformaldehído y se realizó tinción fluorescente. La determinación del porcentaje de infección y la carga parasitaria fue realizada mediante el análisis de fotografías de fluorescencia y el programa *CellProfiler*. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes.

7.3 Determinación del efecto del silenciamiento de un gen endógeno en el fenotipo de infección de células U937 infectadas por *L. braziliensis*

Una vez validada la capacidad de las células de expresar un gen exógeno y de silenciarlo se procedió con el silenciamiento de un gen constitutivo: Lamin-A a manera de gen modelo. Este gen ha sido empleado en múltiples estudios como gen control del proceso de silenciamiento y fue utilizado en los primeros estudios realizados con pequeños RNA de interferencia (siRNAs). Como estrategia experimental se seleccionó la misma metodología usada para el silenciamiento de GFP de acuerdo a los resultados obtenidos. El fenotipo de infección de las células silenciadas se caracterizó cuantitativamente, mediante la determinación de los parámetros: porcentaje de infección (número de macrófagos infectados por cada 100 macrófagos muestreados) y carga parasitaria (parásitos por macrófagos totales muestreados).

7.3.1 Silenciamiento del gen endógeno: *Imna*

Con el objetivo de evaluar el silenciamiento se compararon los niveles de la proteína LMNA entre las líneas U937 y U937/shRNA-LMNA y como control negativo se utilizaron células U937 transducidas con shRNA no relacionados (U937/shRNA no relacionados).

Se obtuvo que la línea celular U937/shRNA-LMNA tuvo una reducción del 87,5% de LMNA respecto a la línea parental U937, mientras que la línea U937/shRNA no relacionados no mostró reducción alguna en los niveles de LMNA (Figura 8A). Se muestra el promedio de tres experimentos en los que se evaluaron los niveles de expresión de la proteína LMNA en las líneas celulares U937, U937/shRNA-LMNA y U937/shRNA-no relacionados tomando como referencia la línea parental U937(Figura 8B).

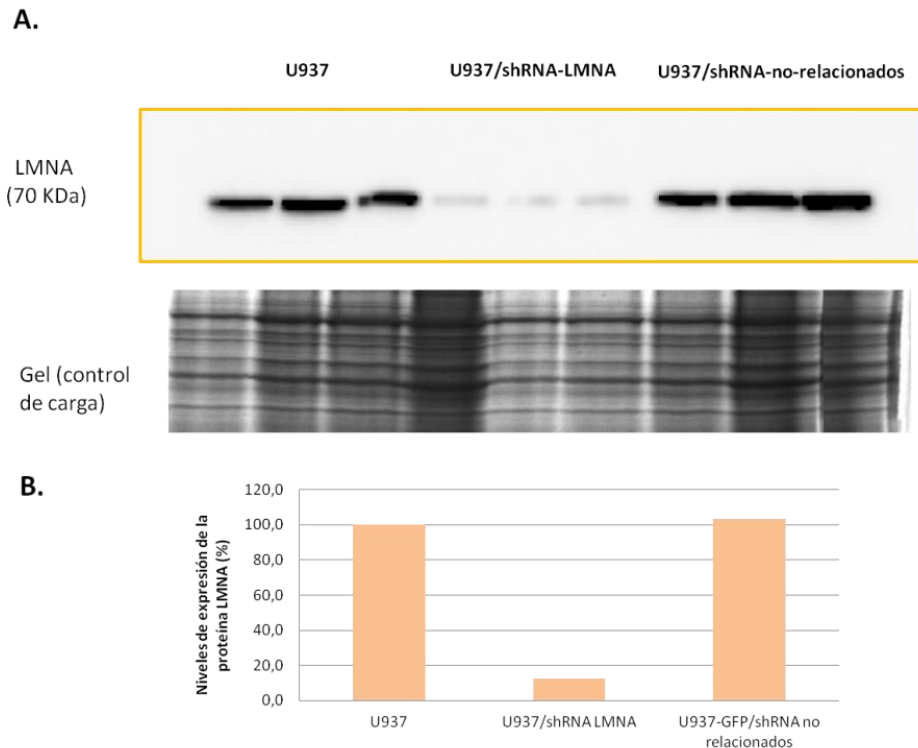


Figura 8. Evaluación del silenciamiento del gen LMNA. A) *Western blot* de los niveles de la proteína LMNA expresados en porcentaje. Las diferentes líneas celulares fueron diferenciadas a macrófagos y se realizó extracción de proteínas. Para el SDS-PAGE se cargaron 50 µg de proteína total en dos geles de acrilamida/bisacrilamida al 8%. Uno de ellos fue empleado para el *Western blot* y el otro como control de carga. Se observa disminución de los niveles de proteína en la línea U937/shRNA-LMNA respecto a la línea U937 y al control negativo: U937/shRNA-no-relacionados. Se muestra el gel de poliacrilamida, teñido con azul de *Coomassie* como control de carga. B) Niveles de expresión de la proteína LMNA de las líneas celulares, U937/shRNA-LMNA y U937/shRNA-no-relacionados normalizadas respecto a la expresión de LMNA de la línea parental U937.

7.3.2 Evaluación del fenotipo de infección de la línea silenciada para *Imna*

Los resultados de la prueba X^2 , empleada para evaluar la independencia o asociación entre las diferentes líneas celulares (U937, U937/shRNA-LMNA y U937/shRNA-no relacionados) con el porcentaje de infección arrojó un valor $p=0,001$ lo que indica que hay asociación entre la línea celular y el porcentaje de infección. Como se observa en la figura 9 y en la tabla 10 la línea celular con reducción en la expresión del gen *Imna* presenta un menor porcentaje de infección que las líneas no silenciadas.

Comparando la carga parasitaria de las líneas celulares evaluadas, mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se encontró que al menos uno de los valores es diferente de los otros. Aplicando la prueba de múltiples comparaciones de Dunn se determinó que hay diferencias estadísticas significativas entre la línea celular U937 y la línea U937/shRNA-LMNA, así como entre la línea U937/shRNA-LMNA respecto a la U937/shRNA no relacionados. No hay diferencias significativas entre la línea celular U937 y U937/shRNA no relacionados.

Los resultados de los porcentajes de infección y carga parasitaria se representan en la tabla 10.

Línea Celular	Porcentaje de infección \pm SD	Promedio carga parasitaria
U937	44,4% \pm 4,97	2,02
U937/shRNA LMNA	38,6% \pm 4,87	1,29
U937/shRNA no relacionados	46,0% \pm 4,99	2,39

Tabla 10. Valores de porcentaje de infección y carga parasitaria de cada una de las líneas evaluadas: U937, U937/shRNA LMNA y U937/shRNA no relacionados.

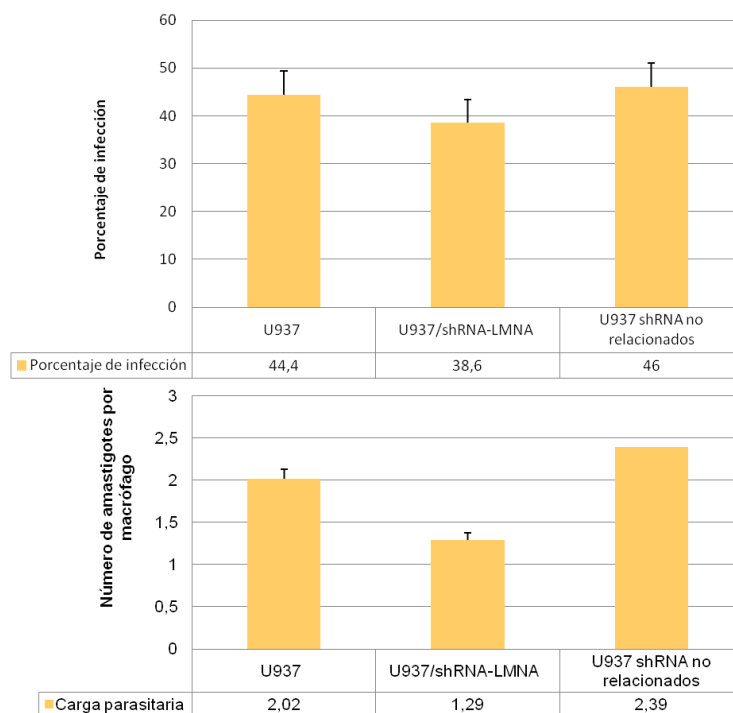


Figura 9. Resultados de la evaluación funcional de las diferentes líneas celulares evaluadas en términos de porcentaje de infección y el promedio de la carga parasitaria. Se indujo diferenciación a macrófagos de las líneas: U937, U937/shRNA-LMNA y U937/shRNA-no relacionados mediante tratamiento con 100 ng/mL de PMA durante 120 horas. Los macrófagos obtenidos fueron infectados con promastigotes de *L. braziliensis*. Después de 72 horas de infección, los macrófagos infectados fueron fijados con paraformaldehído y se realizó tinción fluorescente. La determinación del porcentaje de infección y la carga parasitaria fue realizada mediante el análisis de fotografías de fluorescencia y el programa *CellProfiler*. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes.

7.4 Determinación del efecto del silenciamiento del gen *gro-β* en el fenotipo de infección de células U937 infectadas por *L. braziliensis*

Una vez seleccionado *gro-β* como gen de interés, dentro del panel de genes con expresión diferencial en macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis*, se validaron los resultados de microarreglos mediante qPCR, se diseñaron y generaron 4 shRNAs diferentes dirigidos contra el mismo gen con el fin de silenciarlo. Los cambios en los niveles de proteínas en las células transducidas y no transducidas se verificaron mediante Western blot. El fenotipo de infección de las células transducidas se caracterizó cuantitativamente mediante la determinación de los parámetros: porcentaje de infección y carga parasitaria.

7.4.1 Identificación de genes diferencialmente expresados en macrófagos infectados y no infectados

De los aproximadamente 28000 genes estudiados en los microarreglos 15237 fueron detectados en los ensayos, de éstos últimos, 295 genes estaban diferencialmente expresados entre los macrófagos infectados y no infectados con una tasa de cambio mayor a 1,5 o menor a -1,5 y un p-valor menor a 0,05 (anexo 1). De los genes expresados diferencialmente, 105 se encontraban sobre-expresados y 190 genes regulados negativamente. Se escogió el gen *gro-β* para determinar el efecto de su silenciamiento sobre el fenotipo de infección por *L. (V.) braziliensis*.

7.4.2 Validación de los niveles de expresión por PCR cuantitativa (qPCR)

Los resultados del análisis de expresión del gen *gro-β* por PCR en tiempo real, normalizando previamente con los genes de referencia (β -2-microglobina y GNB2L1), mostró niveles de expresión de 2,69 veces más en macrófagos infectados respecto a la expresión del gen en macrófagos no infectados ($p=0,0000$)(Ver tabla 11 y Figura 10). Los resultados por qPCR confirman los resultados obtenidos por microarreglos en cuanto a la expresión diferencial del gen seleccionado en macrófagos infectados y no infectados.

Gen	Expresión Normalizada	Expresión relativa normalizada	Regulación	Valor de p
B2M	N.A.	N.A.	Sin cambio	0,6131
GNB2L	N.A.	N.A.	Sin cambio	0,5853
CXCL2	0,60122	2,68646	Sobre-expresado	0,0000

Tabla 11. Niveles de expresión de CXCL2 (*gro-β*) normalizados con los genes de referencia B2M y GNB2L1. La tabla muestra el gen evaluado, el valor de la expresión del gen normalizada respecto a los genes de referencia (B2M y GNB2L), la expresión relativa normalizada respecto a la condición control (macrófagos no infectados), el tipo de regulación de la expresión y el valor p de los análisis estadísticos de los valores de expresión relativa normalizada.

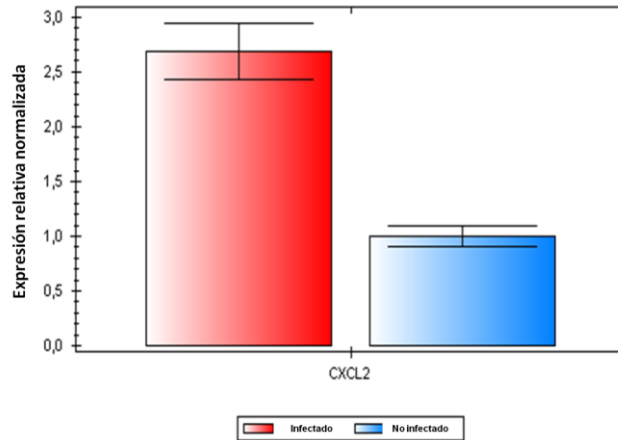


Figura 10. Niveles de expresión por qPCR del gen CXCL2 (*gro-β*) en macrófagos infectados y no infectados. Se evaluó de manera cuantitativa mediante qPCR la expresión del gen CXCL2 (*gro-β*) en macrófagos infectados con *L. braziliensis* durante 72 horas. Los niveles de expresión del gen fueron normalizados respecto a los genes de referencia B2M y GNB2L y la expresión relativa se calculó respecto a la expresión de este gen en los macrófagos no infectados. Las barras muestran la desviación estándar.

7.4.3 Silenciamiento del gen *gro-β*

Para evaluar el silenciamiento genético del gen *gro-β* se compararon los niveles de expresión de la proteína *gro-β* entre las líneas U937, U937/shRNA-Gro-β y U937/shRNA no relacionados (control negativo). La línea celular U937/shRNA-Gro-β presentó una reducción del 74,4% de la expresión de la proteína *gro-β* respecto a la línea parental U937, mientras que la línea U937/shRNA no relacionados mostró una reducción de 21,0% en los niveles de *gro-β* respecto a la línea parental U937 (Figura 11A). Se muestra el promedio de tres experimentos en los que se evaluaron los niveles de expresión de la proteína Gro-β en las líneas celulares U937, U937/shRNA-Gro-β y U937/shRNA-no-relacionados tomando como referencia la línea parental U937(Figura 11B).

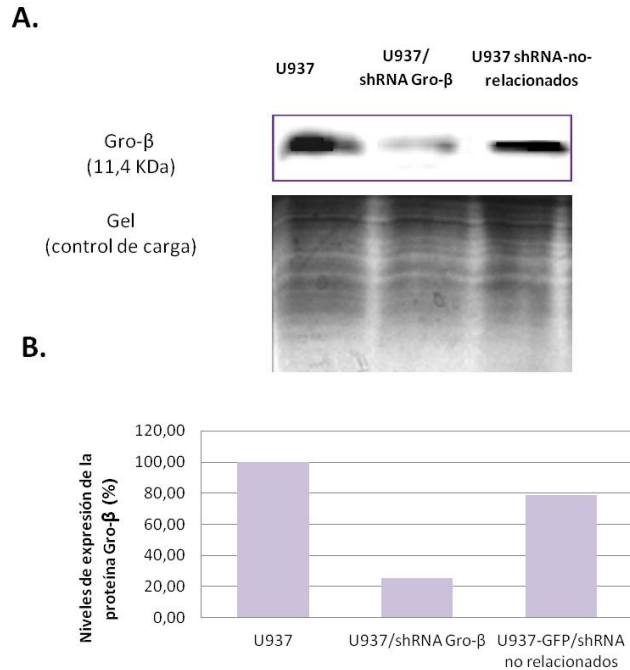


Figura 11. Evaluación del silenciamiento del gen *gro-β*: A) *Western blot* de los niveles de la proteína Gro-β expresados en porcentaje. Las diferentes líneas celulares fueron diferenciadas a macrófagos y se realizó extracción de proteínas. Para el SDS-PAGE se cargaron 100µg de proteína total en dos geles gel de acrilamida/bisacrilamida al 15 %. Uno de ellos fue empleado para el *Western blot* y el otro como control de carga. Se observa disminución de los niveles de proteína en la línea U937/shRNA-Gro-β respecto a la línea U937 y al control negativo: U937/shRNA-no-relacionados. B) Niveles de expresión de la proteína Gro-β de las líneas celulares U937/shRNA Gro-β y U937/shRNA-no-relacionados normalizadas respecto a la expresión de la línea parental U937.

7.4.4 Evaluación del fenotipo de infección de la línea silenciada para *gro-β*

Los resultados de la prueba X^2 , empleada para evaluar la independencia o asociación entre las diferentes líneas celulares (U937, U937/shRNA-Gro-β y U937/shRNA-no-relacionados) con el porcentaje de infección arrojó un valor $p=0,000$ lo que indica que hay asociación entre la línea celular y el porcentaje de infección. Como se observa en la figura 12 y en la tabla 12 la línea celular con reducción en la expresión del gen *gro-β* presenta un menor porcentaje de infección que las líneas no silenciadas.

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis, para comparar las cargas parasitarias de las tres líneas evaluadas, se determinó que al menos una de las líneas difería de las otras en términos de carga parasitaria. Por la prueba de múltiples comparaciones de Dunn se identificó que hay diferencias estadísticas significativas entre la línea parental y las líneas U937/shRNA-Gro-β y entre la línea parental y la línea U937/shRNA-no-relacionados. También se encontraron diferencias significativas entre la línea silenciada y la línea U937/shRNA no relacionados. Teniendo en cuenta los porcentajes de infección y carga parasitaria obtenidos para cada línea (tabla 11) se infiere que los macrófagos derivados de la línea silenciada U937/shRNA-Gro-β son menos susceptibles de ser infectados por promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Línea Celular	Porcentaje de infección \pm SD	Carga parasitaria
U937	44,4% \pm 4,97	2,02
U937/shRNA-Gro- β	21,7% \pm 4,08	0,48
U937/shRNA no relacionados	57,7% \pm 4,94	3,86

Tabla 12. Valores de porcentaje de infección y carga parasitaria de cada una de las líneas evaluadas: U937, U937/shRNA Gro- β y U937/shRNA no relacionados.

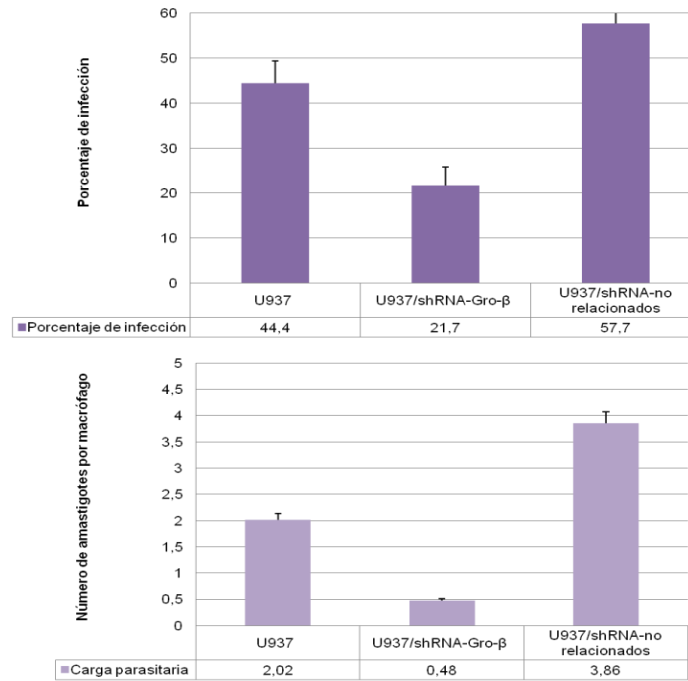


Figura 12. Resultados de la evaluación funcional de las diferentes líneas celulares: porcentaje de infección y carga parasitaria. Se indujo diferenciación a macrófagos de las líneas: U937, U937/shRNA-Gro- β y U937/shRNA-no-relacionados mediante tratamiento con 100 ng/mL PMA durante 120 horas. Los macrófagos obtenidos fueron infectados con *L. braziliensis*. Después de 72 horas de infección, los macrófagos infectados fueron fijados con paraformaldehído y se realizó tinción fluorescente. La determinación del porcentaje de infección y la carga parasitaria fue realizada mediante el análisis de fotografías de fluorescencia y el programa *CellProfiler*. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes.

7.5 Resultados de los ensayos de microarreglos

7.5.1 Expresión global de genes de macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis*

De los aproximadamente 28000 genes estudiados en los microarreglos 15237 fueron detectados en los ensayos, de estos 295 genes estaban diferencialmente expresados entre los macrófagos infectados y no infectados con una tasa de cambio mayor a 1,5 o menor a -1,5 y un p-valor menor a 0,05 o una tasa de cambio de 1,3 y $p \leq 0,02$ de acuerdo a lo reportado por Huggins y colaboradores [74] (Figura 13, ANEXO 1).

De los genes expresados diferencialmente 105 se encontraban sobre-expresados y 190 genes regulados negativamente en macrófagos infectados con respecto al control.

Entre el set de genes sobre-expresados se detectaron algunos asociados al citoesqueleto del macrófago tales como *TUBA3*, *TUBB2B* y *SEPT11*; genes relacionados con respuesta inmune como la quimiocina *CXCL2* y el gen *WNT7B* perteneciente a la familia *WNT*. Otros genes están asociados a la regulación de iones de metales pesados como las metalotioneínas *MT1G* y *MT3*.

Entre el grupo de genes regulados negativamente, se destacaron los genes *HMGCS1*, *STARD5*, *MSMO1* (*SC4MOL*) y *STARD4*, *HMGCR*, *DHCR7*, *SC5DL*, *FADS1*, *FADS2*, *APOB48R* y *APOL6* asociados con el metabolismo y transporte de lípidos. Fueron escasos los genes asociados con la respuesta inmune, entre estos se encontraron el gen codificante para la *IL18* y para el factor de transcripción *STAT2*.

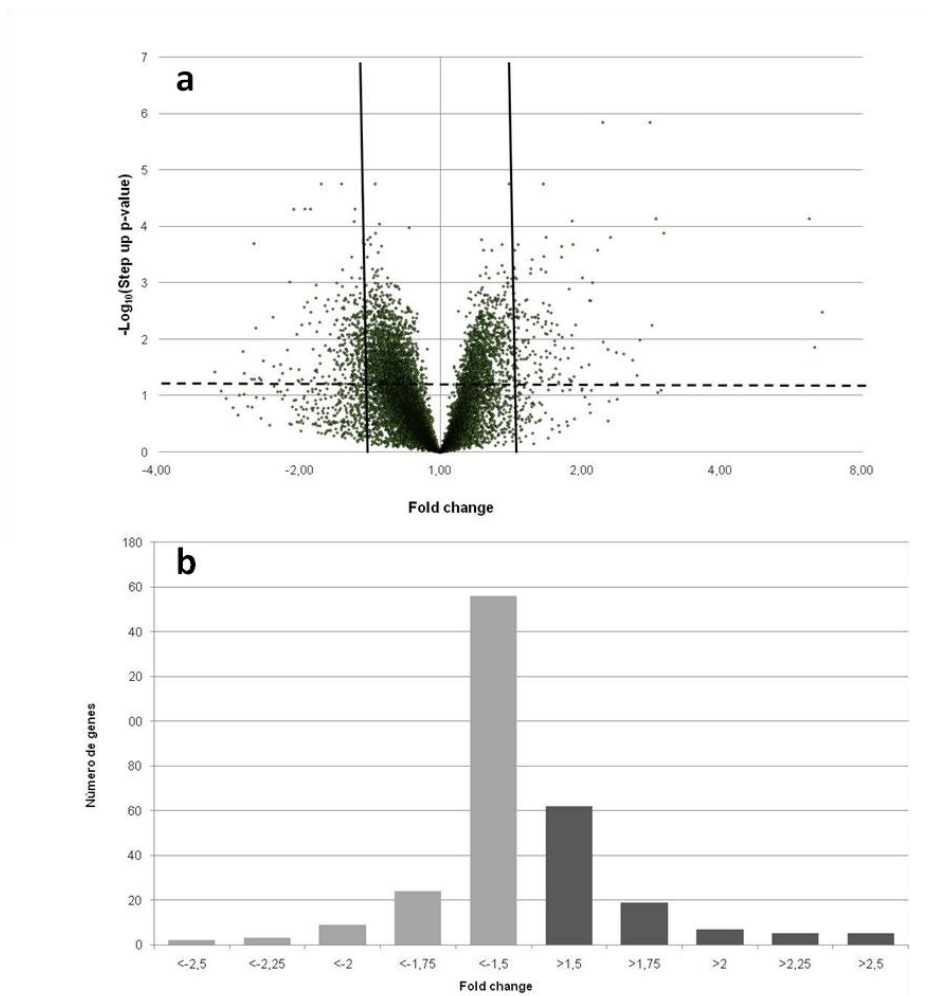


Figura 13 Niveles de expresión de los genes detectados por los ensayos de microarreglos. a) *Volcano plot* de los 12629 genes detectados en los ensayos de microarreglos. La línea punteada muestra el límite en el cual se consideró significancia estadística (0.05). Las líneas verticales indican el *Fold change* de -1,5 y 1,5 que fueron tomados como punto de corte para seleccionar los genes expresados diferencialmente. **b)** Distribución de los *Fold Change* de los 218 genes expresados diferencialmente.

Catorce genes fueron validados por qPCR, los resultados fueron concordantes con los obtenidos por microarreglos para 12 genes, sin embargo los genes *KCNK3* y *S1PR2* no registraron cambios en la expresión por qPCR entre macrófagos infectados y no infectados, mientras que por microarreglos se identificaron como sobre-expresados

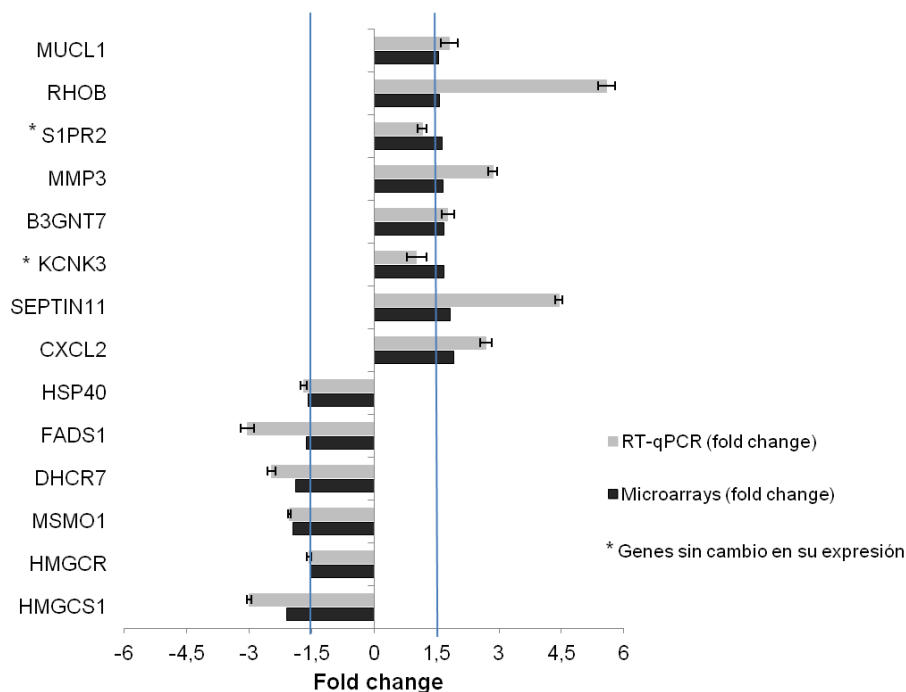


Figura 14. Validación por RT-qPCR de los niveles de expresión obtenidos en los ensayos de microarreglos. De los 218 genes con expresión diferencial entre macrófagos infectados y no infectados, identificados en los ensayos de microarreglos, se evaluaron 14 genes por RT-qPCR para validar sus niveles de expresión. Se obtuvo que 85,7% (12/14) de los datos de expresión de los genes evaluados por RT-qPCR fueron consistentes con los resultados obtenidos por microarreglos.

7.5.2 Identificación de entidades biológicas mediante los análisis de enriquecimiento funcional

Se realizó análisis de enriquecimiento funcional, empleando la herramienta FET y el *software* IPA para identificar las entidades biológicas asociadas a los genes diferencialmente expresados.

El análisis realizado con IPA evidenció con base en los análisis estadísticos: p-value y p-value FDR (False discovery rate) > 0,05, que las principales vías canónicas reguladas durante la infección fueron la biosíntesis de esteroides, a la que están asociados los genes: *sc5dl*, *hmgcr* y *dhcr7* y la síntesis y la degradación de cuerpos cetónicos a la cual se asocian los genes: *hmgcs1* y *acat2*. El análisis realizado con la herramienta FET identificó como procesos biológicos relevantes en la interacción macrófago – *L. (V.) braziliensis* la biosíntesis de esteroides y colesterol a los cuales están relacionados los genes: *sc5dl*, *sc4mol*, *hmgcr*, *c14orf1*, *hmgcs1*, *dhcr7*. Ningún otro proceso biológico tuvo significancia estadística.

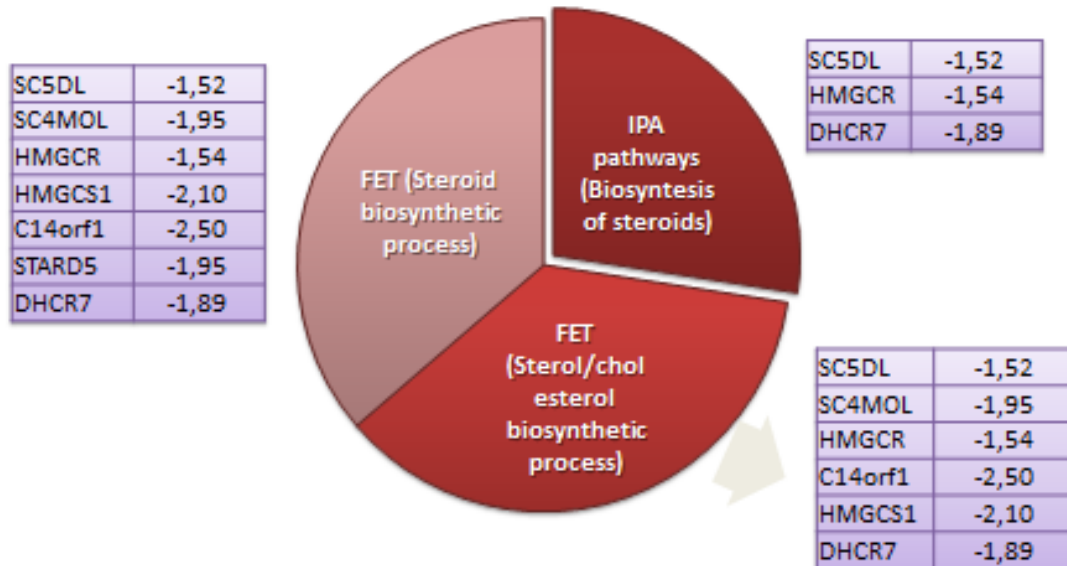


Figura 15. Análisis de enriquecimiento funcional realizado a los genes diferencialmente expresados, identificados por los ensayos de microarreglos. La biosíntesis de esteroides y colesterol fueron las vías canónicas más relevantes identificadas.

Los resultados del análisis de enriquecimiento funcional en conjunto con la validación por RT q-PCR de los niveles de expresión de algunos de los genes asociados a la biosíntesis de colesterol, sugiere que este proceso biológico se encuentra regulado negativamente en los macrófagos infectados con *L. (V.) braziliensis* durante 72 horas (Figura 16).

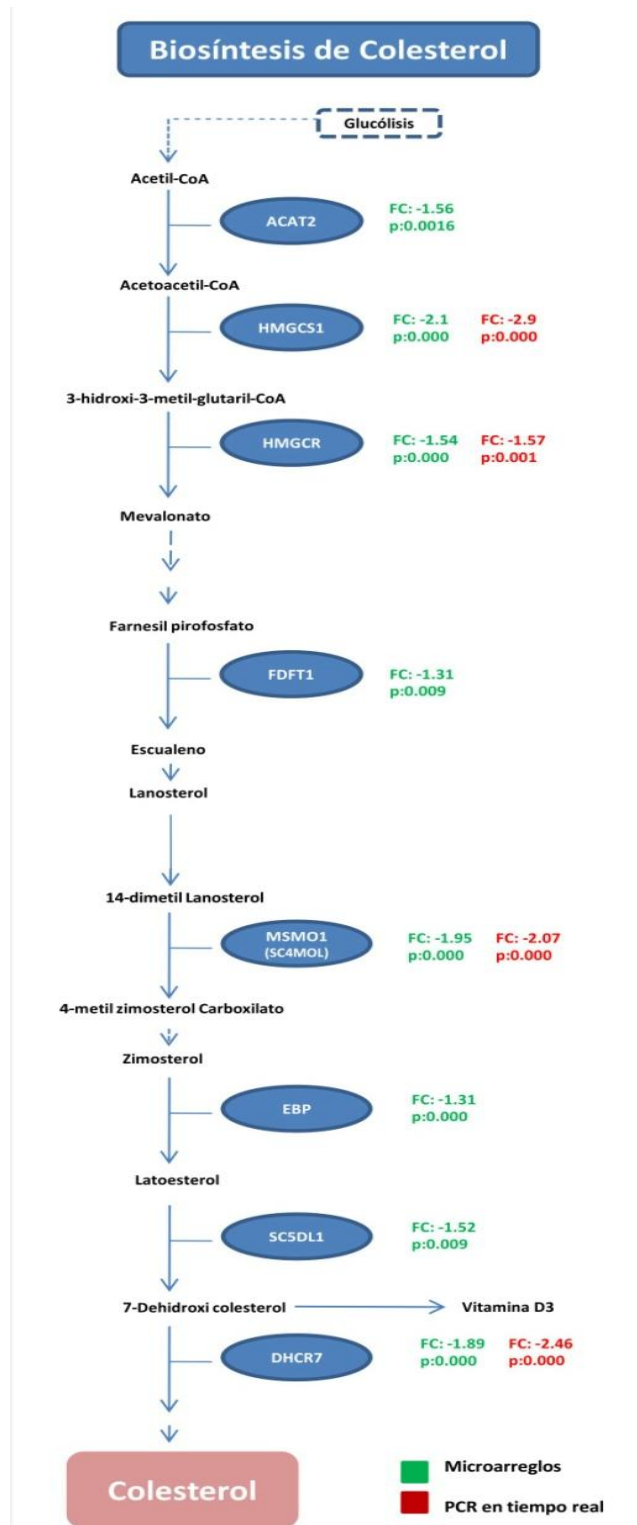


Figura 16. Genes expresados diferencialmente durante la infección del macrófago por *L. (V) braziliensis* que participan en la vía de biosíntesis del colesterol. Se muestran los resultados de expresión de los genes obtenidos por microarreglos y confirmados por RT q-PCR.

8. Discusión de resultados

El objetivo de este trabajo fue identificar en la etapa del establecimiento de la infección, los genes y los procesos biológicos del macrófago potencialmente importantes en la interacción macrófago - *L. (V.) braziliensis* y de otra parte, caracterizar el modelo celular U937 para la identificación de fenotipos de infección inducidos por RNA de interferencia en macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis*.

8.1. Caracterización del modelo celular: macrófagos derivados de la línea celular U937

En el modelo celular se evaluó la funcionalidad del sistema de silenciamiento y la capacidad para detectar cambios en el fenotipo de infección como consecuencia del silenciamiento genético. Se realizó la expresión y silenciamiento del gen exógeno *gfp*, el silenciamiento de los genes endógenos *Imna* y *gro-β*, y se evaluaron los fenotipos de infección en las células silenciadas y en células control.

En relación a la expresión del gen exógeno, los resultados mostraron que la totalidad de las células transducidas expresaron la proteína verde fluorescente evidenciando la eficiencia de la transducción, resultados que pueden atribuirse al uso de vectores lentivirales, los cuales han sido utilizados eficientemente para la incorporación de material genético en diferentes líneas celulares y modelos animales[75]. En este sentido los resultados son concordantes con reportes previos en los cuales la expresión de GFP en la línea celular U937 y en la línea SupT1 fueron superiores al 96% después de la transducción con lentivirus [76]. Por otra parte mostramos que los vectores lentivirales representa una gran ventaja cuando se trabaja con una línea celular caracterizada como difícil de transfectar como es la U937 [77-79].

La expresión de GFP se evaluó por western blot y los resultados mostraron 88,9% de reducción de la expresión de la proteína en las células silenciadas mientras que no hubo reducción de los niveles de GFP en el control negativo (U937-GFP/shRNA-no relacionados) frente a la línea U937-GFP. Lo anterior sugiere que probablemente el silenciamiento de GFP fue específico y se logró por los shRNAs utilizados.

El fenotipo de infección (porcentaje de infección y carga parasitaria) fue evaluado en las cuatro líneas celulares: U937, U937-GFP, U937-GFP/shRNA-GFP y el control negativo U937-GFP/shRNA-no relacionados. Se encontró que las líneas expresando GFP tenían menor porcentaje de infección que las líneas sin expresión de GFP, los resultados de la prueba X^2 mostraron que existe asociación entre la expresión de GFP y el porcentaje de infección, contrario a los resultados de las líneas sin expresión de GFP. En el análisis de la carga parasitaria se encontraron diferencias significativas entre la línea parental (U937) y la línea expresando GFP (U937-GFP), así como entre la línea U937 y la línea control negativo (U937-GFP/shRNA-no relacionados). Es de resaltar que no hubo diferencias entre la línea U937 y la línea U937-GFP/shRNA-GFP. Los resultados sugieren que la carga parasitaria y el porcentaje de infección son afectados por la expresión de GFP en la línea celular U937 teniendo en cuenta que con el silenciamiento del gen se recuperó el

fenotipo de infección de la línea parental. Varios reportes exponen la inocuidad de GFP en modelos celulares e incluso en modelos *in vivo*, [80, 81] sin embargo otros trabajos sugieren un efecto adverso de la expresión de GFP sobre diferentes procesos de la célula: en 1999, Liu y colaboradores demostraron por primera vez una conexión entre la inducción de apoptosis y la expresión de GFP en las líneas celulares NIH/3T3, BHK-21, Huh-7 y HepG2 [82], aunque no se pudo establecer el mecanismo por el cual se producía este fenómeno. Más adelante se reportó que la expresión de GFP en ratones causaba cardiomiopatía [83] y neuropatología con muerte prematura [84]. Se describió que estas alteraciones podrían deberse a interacciones entre GFP y miosina dando como resultado la inhibición de la correcta interacción actina-miosina generando fenotipos aberrantes [85].

En un estudio más reciente se demostró mediante 3 técnicas diferentes de proteómica que la expresión de GFP afecta la expresión de cientos de proteínas en donde se alteraban principalmente los procesos de organización de citoesqueleto, respuesta inmune celular y plegamiento de proteínas [86]. Zhang y colaboradores en un trabajo realizado con células endoteliales encontraron que la proteína de choque térmico HSP70 se sobre-expresa con la expresión del gen *gfp* y que el efecto era mayor a medida que se aumentaba la MOI usada en la transducción [87]. Es posible que las modificaciones en el fenotipo de infección de las U937-GFP se deban al MOI que se usó para expresar la proteína, con el fin de garantizar que la totalidad de las células expresaran el reportero en niveles fácilmente detectables por microscopía de fluorescencia. A futuro es importante evaluar diferentes MOI con el fin de identificar la mínima multiplicidad de infección que permita la expresión y el silenciamiento del gen. Los resultados obtenidos señalan la importancia de evaluar funcionalmente los efectos de la expresión de genes exógenos que pretendan ser usados como reporteros, específicamente se debe verificar al menos que el gen reportero no afecta el fenotipo a estudiar.

Con el propósito de evaluar el proceso de silenciamiento de un gen endógeno en el modelo celular se seleccionó el gen *lmna*, que codifica para proteínas que hacen parte de la envoltura nuclear y ha sido empleado en varios estudios como gen control del proceso de silenciamiento. Estudios previos han evaluado funcionalmente el gen *lmna* por medio del silenciamiento con RNA de interferencia con resultados exitosos, también se ha reportado que dado sus altos niveles de expresión es un gen difícil de silenciar [88, 89], por lo tanto lograr su silenciamiento se consideró un buen indicador del funcionamiento de la maquinaria de silenciamiento en el modelo utilizado en este trabajo. La expresión de la proteína LMNA en las células silenciadas mostró reducción del 87,5% respecto a la línea parental. Este resultado es concordante con los trabajos realizados en células HeLa, donde se reporta reducción de la expresión de la proteína en más del 90% con shRNA y del 95% con siRNA [90-92]. En un trabajo realizado con células endometriales humanas el gen *lmna* fue silenciado con siRNA y se obtuvo reducción del 88% en la expresión de la proteína [93].

Con los resultados obtenidos se podría inferir que la reducción en la expresión de la proteína es causada por el proceso de silenciamiento del gen *lmna* con el shRNA utilizado y que este tuvo un buen desempeño funcional. Esto se puede atribuir a las características

del shRNA que es un RNA de interferencia validado y por lo tanto se esperaba una reducción de la expresión de la proteína al menos del 70%. En cuanto al fenotipo de infección este fue evaluado en la línea parental, la línea transducida con el shRNA dirigido contra el gen *Imna* y en la línea control negativo U937/shRNA-no-relacionados. Los resultados mostraron diferencias en el porcentaje de infección y carga parasitaria entre la línea parental (U937) y la línea silenciada (U937/shRNA-LMNA). Los resultados sugieren que el silenciamiento del gen *Imna* es la causa del cambio en el fenotipo de infección en la línea celular silenciada.

Con el fin de evaluar el desempeño del modelo en el silenciamiento de un gen expresado diferencialmente entre macrófagos no infectados e infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, el gen *gro-β* fue silenciado. La línea silenciada (U937/shRNA-Gro-β) presentó una reducción de 74,4% en los niveles de expresión de la proteína CXCL2 en comparación con la línea parental. Es posible que esto se deba a la MOI utilizada (0,2 unidades infectivas/célula) para realizar la transducción, que si bien es una multiplicidad de infección recomendada hay que tener en cuenta que se utilizó una mezcla 5 shRNAs diferentes y es posible que el más efectivo en el silenciamiento tuviera un MOI más bajo de 0,2. En la literatura revisada no se encontraron trabajos similares a éste, donde se silenciara el gen en macrófagos, lo que no permitió comparar los resultados. Se reportan trabajos del silenciamiento de este gen por siRNA en ratones donde estudiaron la importancia del secuestro de neutrófilos en el pulmón por MIP2 (*gro-β*)[94]. En otro estudio realizado con células WHCO1 los autores mostraron la posibilidad del silenciamiento del gen y la relación entre el silenciamiento y los procesos de apoptosis en tumores sólidos[95]. En los trabajos mencionados no se reportan los datos cuantitativos referentes a la reducción en la expresión de la proteína.

Con los resultados obtenidos se podría atribuir el silenciamiento del gen a los shRNAs utilizados. Se evaluó el fenotipo de infección en términos de porcentaje de macrófagos infectados y carga parasitaria en la línea silenciada U937/shRNA-Gro-β, la línea parental (U937) y la línea control negativo (U937/shRNA-no relacionados). Los resultados mostraron que hay diferencias en el porcentaje de infección y la carga parasitaria entre la línea parental (U937) y la línea silenciada (U937/shRNA-Gro-β) la cual mostró 21,7% de porcentaje de infección frente al 44,4% de la línea parental. De otra parte hubo diferencias en cuanto al fenotipo de infección entre la línea parental y la línea control negativo, es posible que solo el proceso de transducción genere cambios en el fenotipo.

Es importante tener en cuenta que existe la posibilidad de efectos inespecíficos del silenciamiento, denominados “off target”, que pueden alterar diferentes procesos de la célula. Las principales causas de estos efectos son: 1. homología de la secuencia del shRNA con otros transcritos diferentes al gen de interés, 2. efectos relacionados con el procesamiento erróneo de miRNAs endógenos o edición equivocada del shRNA y por último, la perturbación de la célula por la abundante presencia de vectores y RNA de doble cadena exógeno [96]. En este trabajo se abordaron varios procesos con el fin de controlar los efectos “off target”. En cuanto a los causados por la homología, se realizaron alineamientos entre el shRNA utilizado y la base de datos de genes y

transcritos humanos del NCBI (RefSeq). Se confirmó que la secuencia no tenía identidad cercana con otro transcrito y no había ningún “mismatch” entre la secuencia blanco y el shRNA. Los shRNA fueron diseñados con máximo 19 pb dado que longitud se asocia con perturbación de la célula. Según Reynolds y colaboradores, los tamaños superiores a 23 pares de bases pueden ser reconocidos por los TLRs y de esta forma desencadenar la respuesta inmune y activar los genes que se expresan en respuesta al interferón[97]. La posibilidad de generar cambios en el fenotipo de infección y en la expresión del gen por solo la transducción de partículas lentivirales y expresión de shRNA fue evaluada con la línea control negativo (U937/shRNA-no-relacionados).

En el silenciamiento de cada uno de los genes se utilizó la misma metodología, sin embargo se utilizaron diferentes multiplicidades de infección para el silenciamiento de cada uno de los genes. Esto es pertinente cuando se hace la evaluación previa de diferentes MOI y se selecciona la mínima MOI que permite el silenciamiento del gen. En el trabajo esto se realizó para el silenciamiento de gro- β . En futuros estudios esto se debe realizar para todos los genes a evaluar dado que permite controlar que se den cambios en el fenotipo de infección y en la expresión del gen por MOI más altas de lo necesario.

Los resultados obtenidos con el silenciamiento de los tres genes utilizados indican que el silenciamiento por transducción lentiviral de constructos portando secuencias codificantes para shRNA, dirigidos contra genes de macrófagos derivados de células U937 e infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, es un modelo que permite evaluar cambios en el fenotipo de infección en términos de carga parasitaria y porcentaje de macrófagos infectados, sin embargo es necesario en futuros estudios incluir algunas mejoras al proceso en aras de asegurarse de la especificidad del silenciamiento.

8.2. Expresión de genes de macrófagos derivados de la línea celular U937 en respuesta a la infección por *L. (V.) braziliensis*

Este estudio mostró que la mayoría de los genes diferencialmente expresados, entre macrófagos no infectados e infectados con *L. (V.) braziliensis* por 72 horas, tienen regulación negativa. De acuerdo a los análisis de enriquecimiento funcional los genes están principalmente relacionados con la biosíntesis de esteroides, especialmente con la del colesterol. Este es el primer estudio que reporta la expresión global de genes de macrófagos infectados con *L. (V.) braziliensis* y las vías metabólicas asociadas.

La interacción macrófago-*Leishmania* desencadena en la célula hospedera una serie de mecanismos orientados a la destrucción del parásito sin embargo, *Leishmania* tiene la capacidad de alterar las vías de señalización del macrófago para lograr establecerse en el fagosoma y replicarse[1, 98, 99]. El parásito es capaz de inducir alteración de moléculas de señalización y de realizar cambios a nivel transcripcional mediante la regulación positiva o negativa de genes del macrófago. Además, los procesos metabólicos del macrófago pueden cambiar en respuesta al tipo de parásito [6].

Nuestros resultados muestran que la infección por *L. (V.) braziliensis* puede tener un efecto principalmente de supresión de la transcripción de genes del hospedero, como

previamente ha sido reportado para otras especies de *Leishmania* [5, 10, 100]. Zhang y colaboradores realizaron un meta-análisis en el cual incluyeron 5 estudios de expresión de genes de macrófagos infectados por diferentes especies de *Leishmania*, pertenecientes al subgénero *Leishmania*, realizados en tiempos iniciales de la infección. Los autores encontraron que en todos los estudios la mayoría de los genes estaban regulados negativamente [15]. Estos resultados y los reportados en nuestro estudio contrastan con los obtenidos por Ramírez y colaboradores quienes encontraron sobre-expresión en la mayoría de los genes de macrófagos infectados por 24 horas con *L. (V) panamensis* [101]. Esta variabilidad de resultados plantea la posibilidad que la expresión de los genes del macrófago puede estar asociada a la especie infectante y al momento de la infección en el que es evaluada la expresión.

El patrón de expresión de genes del macrófago frente a la invasión de un microorganismo es dinámico y está asociado al momento de la infección. En las etapas iniciales lo esperado es un patrón de expresión de genes asociados a los mecanismos de defensa del macrófago: la respuesta inmune innata y adaptativa. Este fenómeno ha sido demostrado en diferentes estudios en los cuales los macrófagos han sido retados con *Leishmania spp.* y en las primeras 24 h la mayoría de los genes regulados están asociados a la respuesta inmune [5, 10, 101]. Estos resultados contrastan con los obtenidos en este trabajo donde se encontró un número reducido de genes relacionados con respuesta inmune. Entre estos se identificaron los genes que codifican para el factor de transcripción *STAT2* y para la interleucina *IL 18*, dos moléculas muy importantes en la respuesta inflamatoria efectiva durante la infección. Es posible que el parásito module la expresión de estos genes para neutralizar parte de la maquinaria de defensa del macrófago con el fin de lograr el establecimiento de la infección. Resultados similares han sido reportados por otros autores [5, 102]. Otro de los genes asociados a la respuesta inmune fue el de la quimiocina *CXCL2* el cual se encontró sobre-expresado, resultado consistente con estudios realizados con diferentes especies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. major* y *L. donovani* [5, 8, 11, 12, 102]. Es posible que la escasa representatividad de genes asociados a la respuesta inmune en este trabajo se deba al momento de la evaluación de la expresión de los genes del macrófago, 72 horas post infección, tiempo en el cual ya se ha establecido la infección y el macrófago podría estar adaptando su metabolismo para enfrentarla [6].

8.3. Entidades biológicas asociadas a la interacción macrófago- *L.(V.) braziliensis*

Para identificar los procesos biológicos a los cuales estaban asociados los genes diferencialmente expresados se analizaron los resultados de microarreglos con las herramientas IPA y FET. Los resultados mostraron con base en los análisis estadísticos, solo dos vías asociadas al proceso de infección, la biosíntesis de esteroides y entre éstos principalmente la biosíntesis del colesterol. Estos resultados permiten pensar en al menos dos escenarios con respecto a la regulación transcripcional negativa de los genes involucrados en la síntesis del colesterol del macrófago infectado: en el primero, la señalización es correcta, es decir, el macrófago posee niveles elevados de colesterol y

está respondiendo a los mismos. En el segundo escenario, la señalización es incorrecta, es decir, el macrófago posee niveles normales de colesterol (o incluso menores a lo normal) pero, la cascada de señalización está siendo activada de manera incorrecta, posiblemente mediada por factores asociados a la infección.

Durante la interacción inicial entre los macrófagos y los promastigotes, el colesterol juega un papel importante dado que éste es una de las moléculas más abundantes en las balsas lipídicas: micro-dominios de las membranas celulares que sirven de plataformas para interacciones de diferentes moléculas, regulación de procesos de señalización celular, adhesión, invasión y secreción [103-105]. Estudios previos han evidenciado que durante las primeras 24 horas de infección *Leishmania* modula para su beneficio el aumento en la biosíntesis del colesterol para lograr una fuente importante de energía y formar las balsas lipídicas de la vacuola parasitófora [106, 107]. Sin embargo es importante tener en cuenta que la regulación de la biosíntesis del colesterol es por producto final y en el momento en que la célula detecta altos niveles de esta molécula, el mismo colesterol dispara la regulación negativa de la síntesis. Es posible que este fenómeno esté sucediendo a las 72 horas de infección asumiendo que en los momentos iniciales de la infección se haya aumentado la síntesis del colesterol. La regulación negativa de la biosíntesis de colesterol está relacionada con la regulación negativa de *HMGCR* que es la enzima limitante de este proceso.

Un segundo escenario que podría explicar la regulación negativa incorrecta del colesterol se puede deber a factores asociados al parásito. Recientemente se ha descrito un mecanismo de regulación del metabolismo de lípidos relacionado con la proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR). Peterson y colaboradores en el 2011 propusieron que mTORC1 puede regular la transcripción de genes asociados a la biosíntesis del colesterol modulando el factor de transcripción proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP). Proponen que mTORC1 regula la localización subcelular de Lipin1, co-activador transcripcional, el cual cuando está fosforilado reside en el citoplasma mientras que cuando está defosforilado se traslada al núcleo. Los investigadores reportan que cuando Lipin1 está en el núcleo se reprime la transcripción de genes dependientes de SREBP y se reduce la presencia de esta proteína en el núcleo [108]. En infección por *L. (L.) major*, Jaramillo y colaboradores reportaron que la glicoproteína gp63 hidroliza a mTOR e inhibe la formación del complejo mTORC1. En el contexto de nuestro trabajo, es posible que gp63 altere al complejo mTORC1 y en consecuencia no se dé la fosforilación de Lipin1, lo que podría generar el desplazamiento de Lipin1 no fosforilado al núcleo ocasionando la disminución de los niveles nucleares de SREBP.

En la literatura revisada no encontramos un estudio que evaluara la expresión global genes del macrófago infectados por *Leishmania spp.* y asociara la regulación negativa de la biosíntesis del colesterol con la infección. Sin embargo, dos estudios realizados en macrófagos infectados con *L. (L.) major* reportan disminución de los niveles de colesterol a las 72 horas de la infección a expensas de la regulación negativa del gen que codifica para la enzima *HMGCR* [109, 110]. En contraste, en dos estudios realizados en

macrófagos infectados con *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) major* los autores identificaron aumento de la biosíntesis del colesterol en las etapas iniciales de la infección [106, 107]. De acuerdo a estos reportes se puede sugerir que la biosíntesis del colesterol puede estar regulada positiva o negativamente en macrófagos infectados por *Leishmania spp.* y que esto probablemente depende del momento de la infección y de la especie infectante.

8.4. Propuesta de un modelo

La regulación negativa de la biosíntesis de colesterol observada en los macrófagos infectados con *L. braziliensis* a las 72 horas puede estar relacionada con los mecanismos de control de la expresión de enzimas limitantes de este proceso como HMGCR. Tal como se señaló anteriormente, existe una relación entre la proteína mTOR y el factor de transcripción SREBP responsable de la expresión de los genes que codifican para las enzimas asociadas a la biosíntesis de colesterol.

Se ha demostrado que mTOR fosforila a lipin 1 quien fosforilado se localiza en el citoplasma. En el caso de alguna alteración de mTOR este no puede fosforilar a lipin1 y se desplaza al núcleo disminuyendo los niveles de SREBP, lo que trae como consecuencia una disminución de la expresión de los genes asociados con la biosíntesis del colesterol. [111].

La conexión entre estos hallazgos y la infección por *Leishmania* está dada por gp63 que es una metaloproteasa del parásito, considerada un factor de virulencia importante. Se han reportado diferentes funciones de gp63 durante la infección relacionadas con inhibición de vías de señalización, transcripción y traducción. Uno de los primeros descubrimientos del efecto de esta proteína sobre las vías de señalización del macrófago fue realizado por Corradin y colaboradores en 1999 quienes identificaron a gp63 como la responsable de la hidrólisis de MARCKS (Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) durante la infección, lo que resultaba en inhibición de la producción de ROS. Gregory y colaboradores en el 2008 demostraron que esta proteína altera factores de transcripción de la familia NF- κ B mediante el rompimiento de la proteína p65^{RelA} y la inactivación del heterodímero p65^{RelA}/p50 [112].

Jaramillo y colaboradores en el 2011 reportaron que durante la infección por *L. major* el parásito reprimía la traducción de proteínas del macrófago. Diferentes experimentos permitieron llegar a la conclusión que gp63 hidroliza a mTOR y en consecuencia se inhibe el complejo mTORC1. La inhibición resulta en la alteración de la fosforilación de varias proteínas blanco de mTOR, entre ellas el factor inhibitorio de la traducción 4E-BP1, proteína que en su estado no fosforilado inhibe la traducción de proteínas [113].

Teniendo en cuenta la capacidad que tiene gp63 de hidrolizar a mTOR y por consiguiente inhibir el complejo mTORC1, esto nos hace proponer que esta alteración afecta la fosforilación del lipin1 en los macrófagos infectados por *L. braziliensis* y en consecuencia lipin1 al estar desfosforilado se desplaza al núcleo y bloquea la actividad de SREBP, resultando en una regulación negativa de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de colesterol.

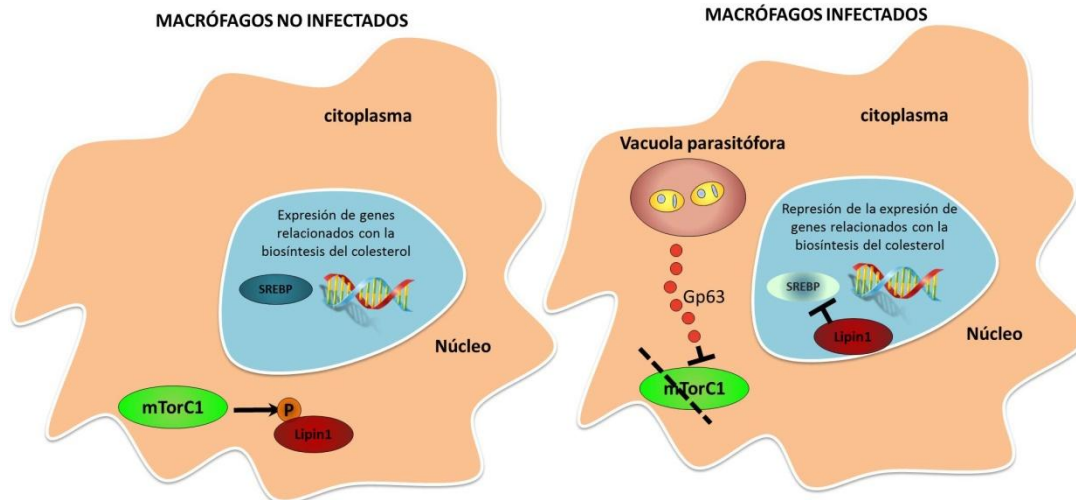


Figura 17. Modelo propuesto que explica la reducción de la expresión de genes de la vía de biosíntesis de colesterol en macrófagos infectados con *L. braziliensis*.

Este modelo podría explicar los resultados obtenidos en la regulación negativa de la expresión de los genes asociados con la biosíntesis del colesterol.

- **Predicciones del modelo**

El modelo propuesto sugiere:

- **En los macrófagos infectados hay una reducción de los niveles de colesterol**

Para evaluar esto se deben cuantificar los niveles de colesterol en macrófagos no infectados e infectados por *L. braziliensis*. La cuantificación del colesterol se puede realizar por un método enzimático, donde el colesterol es oxidado por la enzima colesterol oxidasa para originar cetona y H₂O₂. Este producto a su vez reacciona con 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine en la presencia de peroxidasa de rábano para generar resorufina que es altamente fluorescente y puede ser medido en un fluorómetro. Mediante esta técnica se pueden detectar cambios mínimos en la concentración de colesterol. Esta reacción es compatible con varios métodos de extracción por lo que se podría evaluar el colesterol en varias fracciones celulares como citoplasma y membranas.

- **mTOR es hidrolizado en macrófagos infectados**

El modelo sugiere que en los macrófagos infectados, mTOR está fragmentado. Esto puede evaluarse realizando extracción de proteínas totales de macrófagos infectados y no infectados y por western blot evaluar la integridad de mTOR. Se esperaría encontrar un patrón de fraccionamiento de mTOR como ha sido mostrado previamente por Jaramillo y colaboradores.

- **La actividad quinasa de mTOR está alterada en macrófagos infectados por *L. braziliensis***

Para caracterizar la actividad quinasa de mTOR podría evaluarse por western blot el estado de fosforilación de 4E-BP1 que es un blanco de mTOR bien caracterizado, esto se puede realizar con anticuerpos que reconozcan la proteína fosforilada. Sin embargo es importante tener en cuenta que 4E-BP1 puede también ser fosforilado por AKT1 y esto podría generar confusión en los resultados. Con el fin de intentar controlar el experimento, éste se realizará a partir de macrófagos no infectados.

- **Lipin1 modifica su localización sub-celular en macrófagos infectados**

El modelo sugiere que la localización sub-celular de Lipin1 cambiaría como resultado de la inactivación de mTOR durante la infección. Esta predicción se puede evaluar en macrófagos infectados y no infectados, por medio de inmuno-citoquímica con el fin de observar la localización y por medio de western blot para evaluar la cantidad de proteína en el núcleo y en el citoplasma.

9. Conclusiones

La mayoría de los genes diferencialmente expresados entre macrófagos derivados de la línea celular U937 no infectados e infectados por *L. (V.) braziliensis* son regulados negativamente.

Nuestros datos aportan nuevo conocimiento de la interacción macrófago- *L. (V.) braziliensis* a nivel transcripcional. Sugieren que la biosíntesis del colesterol está regulada negativamente a las 72 horas, momento del establecimiento de la infección.

El modelo empleado permite evidenciar cambios de fenotipo en la susceptibilidad de la infección de los macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis*, como consecuencia del silenciamiento genético.

Los genes evaluados evidenciaron la versatilidad del modelo para registrar el espectro de los cambios fenotípicos en términos de susceptibilidad a infección por parte de *Leishmania braziliensis*, como consecuencia del silenciamiento genético. Es importante evaluar el modelo con un rango más amplio de genes endógenos, que permitan evidenciar todo el espectro de fenotipos de infección: aumento, disminución y no cambio.

Las metodologías implementadas permitieron evaluar el efecto del silenciamiento genético por RNA de interferencia en el contexto del macrófago infectado por *L. braziliensis*, utilizando como modelo la línea U937.

10. Proyecciones

Propuesta de mejora en la metodología del proceso de silenciamiento en el modelo planteado

- Uso de diferentes secuencias contra el mismo gen

El uso de diferentes secuencias contra el mismo gen permite evaluar si el fenotipo obtenido se puede asociar al silenciamiento de éste. En próximos experimentos se deben diseñar cuatro secuencias dirigidas al marco abierto de lectura, extremo 5'UTR y 3'UTR. Se propone evaluar el fenotipo obtenido por cada una de ellas. Si las diferentes secuencias que silencian el gen brindan el o los mismos fenotipos y estos son diferentes a los presentados por los controles se podría sugerir que este gen particular puede ser la causa del fenotipo observado.

- Optimización del modelo celular

La metodología implementada en el modelo utilizado puede ser optimizada para alcanzar estrategias de alto rendimiento que permitan realizar tamizaje genético en macrófagos infectados con especies de *Leishmania*. El modelo y las metodologías utilizadas en el presente trabajo ofrecen varias características compatibles con los sistemas de alto rendimiento. En primer lugar el ensayo de microarreglos limita la población de genes a

evaluar ya que los 295 genes modulados durante la infección con *L. braziliensis* a las 72 horas se encontraron en una población de más de 15000 genes. El uso de una línea celular dentro del modelo *in vitro* propuesto abre la posibilidad de trabajar los cultivos en formato de placas de 96 o 384 pozos debido a que no hay limitaciones en la cantidad de células que se pueden obtener. De otra parte la línea celular utilizada no requiere sustratos especiales para su cultivo. De esta manera se podrían diseñar y aplicar experimentos que incluyan un gran número de unidades experimentales. Adicionalmente, la evaluación de la infección en las líneas silenciadas se realizó en macrófagos marcados con compuestos fluorescentes: metodología compatible con la citometría de flujo, técnicas que permiten la evaluación cuantitativa de variables en un gran número de unidades experimentales.

Tomando lo anterior en consideración, la estrategia propuesta para la tamización sistemática de genes en el contexto del macrófago infectado con base en el modelo desarrollado consistiría en los siguiente pasos: en primer lugar, se pueden diferenciar células U937 en formato de placas de 96 pozos y los macrófagos obtenidos se someterían a silenciamiento genético por transducción con lentivirus portando constructos para la expresión de shRNAs dirigidos contra los genes de interés. Dado que en este formato se pueden trabajar múltiples unidades experimentales, en cada pozo se podría incluir: shRNAs individuales para un gen de interés, múltiples shRNAs contra el mismo gen o shRNAs dirigidos contra diferentes genes que hagan parte de una vía, en lo denominado como “*pooled shRNA screens*” que actualmente es reportado como la aplicación más poderosa de los shRNAs en estudios de alto rendimiento [96]. Posterior al silenciamiento se realizará la infección *in vitro* y la marcación fluorescente de acuerdo a lo estandarizado en este trabajo. La evaluación de la infección se podría realizar mediante un citómetro de flujo que procese placas de 96 pozos de manera automática. Los resultados serían analizados para determinar en qué pozo o bajo qué condiciones experimentales se alteró el fenotipo de infección, y estas condiciones podrían ser analizadas más profundamente utilizando estrategias como *western blot* o *qPCR*.

Evaluación de la dinámica de la biosíntesis del colesterol en diferentes tiempos de la infección

Futuros estudios podrían enfocarse en evaluar la dinámica en el tiempo de la biosíntesis del colesterol dado que los resultados reportados en su mayoría, han sido en estudios en fases iniciales de la infección. Además, sería importante evaluar si el comportamiento de la biosíntesis del colesterol podría estar asociado a la especie infectante

11. Aspectos éticos

El proyecto no incluyó experimentación con animales ni seres humanos, sin embargo todos los experimentos fueron concebidos de acuerdo a las consideraciones contenidas en la Declaración de Helsinki, Declaración de Budapest y declaración Internacional sobre datos genéticos.

Adicionalmente, el proyecto se realizó de conformidad con la normatividad Nacional, específicamente la Resolución 8430 de 1993, en lo referente a la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos.

También es importante señalar que todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las indicaciones consignadas en el manual de bioseguridad del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta. En el caso del trabajo con vectores lentivirales, dado que no habían sido contemplados en el manual, se realizó toda una nueva sección considerando los aspectos de bioseguridad para el trabajo con lentivirus con base en documentos de referencia internacionales.

12. Anexos

Anexo 1. Genes diferencialmente expresados identificados por ensayos de microarreglos. Se muestran los 218 genes con expresión diferencial entre macrófagos no infectados e infectados con *Leishmania braziliensis*. Presentan un *fold change* mayor a 1,5 o menor a -1,5 y un valor de $p > 0,05$.

Symbol	Assignment	Transcript ID	Fold-Change	p-value
ACTR1A	ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)	3304406	-1,50	0,0002
ALDH18A1	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	3301512	-1,80	0,0000
ALPP /// ALPPL2	alkaline phosphatase, placental-like 2	2532294	1,52	0,0000
ANAPC16	anaphase promoting complex subunit 16	3251353	-1,68	0,0002
APOB48R	apolipoprotein B48 receptor	3686635	-2,28	0,0001
APOBEC3C	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C	3945572	-1,51	0,0081
APOL6	apolipoprotein L, 6	3944243	-1,50	0,0017
AQP9	aquaporin 9	3595594	-1,50	0,0016
ATP8B4	ATPase, class I, type 8B, member 4	3623552	-1,84	0,0000
B3GNT7	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7	2531908	1,68	0,0001
BAHCC1	BAH domain and coiled-coil containing 1	3737874	-1,52	0,0074
BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B	3056108	-1,53	0,0004
BMP8B /// OXCT2 /// BMP8A	bone morphogenetic protein 8a // bone morphogenetic protein 8b	2331511	2,10	0,0000

C12orf4	chromosome 12 open reading frame 4	3441215	-1,51	0,0095
C12orf47	chromosome 12 open reading frame 47	3471753	-1,52	0,0001
C12orf59	chromosome 12 open reading frame 59	3404626	-1,50	0,0090
C14orf1	chromosome 14 open reading frame 1	3572461	-2,50	0,0000
C14orf138	chromosome 14 open reading frame 138	3563687	-1,61	0,0009
C15orf51	dynamamin 1 pseudogene	3641597	1,56	0,0019
C17orf49	chromosome 17 open reading frame 49	3708201	-1,61	0,0036
C19orf61	chromosome 19 open reading frame 61	3864597	-1,53	0,0001
C1QL2	complement component 1, q subcomponent-like 2	2573016	1,50	0,0006
C20orf111	chromosome 20 open reading frame 111	3906821	-1,52	0,0000
C3orf37	chromosome 3 open reading frame 37	2641577	-1,52	0,0000
C4orf38	chromosome 4 open reading frame 38	2795904	1,52	0,0006
C9orf123	chromosome 9 open reading frame 123	3198289	-1,59	0,0012
C9orf153 /// ISCA1	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog (S. cerevisiae) // chromosome 9 open reading frame 153	3212919	-1,60	0,0097
C9orf41	chromosome 9 open reading frame 41	3210130	-1,59	0,0029
C9orf70 /// GLIS3	chromosome 9 open reading frame 70	3160500	1,53	0,0010
C9orf85	chromosome 9 open reading frame 85	3174429	-1,52	0,0056
CA5BP /// CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	3969855	-1,51	0,0000
CARM1 /// YIPF2	Yip1 domain family, member 2 // coactivator-associated arginine methyltransferase 1	3850576	-1,55	0,0019
CCNB1IP1	cyclin B1 interacting protein 1	3555300	-1,52	0,0013
CCNB2	cyclin B2	3595979	-1,90	0,0002
CCNT1	cyclin T1	3453218	-1,52	0,0014
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	3405440	-1,61	0,0000
CHMP4A /// MDP1	chromatin modifying protein 4A // magnesium-dependent phosphatase 1	3557947	-1,67	0,0000
CHRM1	cholinergic receptor, muscarinic 1	3376317	1,52	0,0101
CISD2	CDGSH iron sulfur domain 2	2737840	-1,56	0,0001
COG3	component of oligomeric golgi complex 3	3488253	-1,51	0,0001
COG6	component of oligomeric golgi complex 6	3486383	-1,70	0,0000
CRIP1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	3554851	-1,76	0,0000
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor	2881187	-1,62	0,0000
CTRB2 /// CTB1	chymotrypsinogen B2 // chymotrypsinogen B1	3699390	1,70	0,0001
CWF19L2	CWF19-like 2, cell cycle control (S. pombe)	3389745	-1,52	0,0001
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2773434	1,92	0,0000
CXorf21	chromosome X open reading frame 21	4003895	-1,63	0,0003
DCTN2	dynactin 2 (p50)	3458614	-1,52	0,0006

DDX50	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 50	3250019	-1,60	0,0000
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	3380697	-1,89	0,0001
DHDDS	dehydrodolichyl diphosphate synthase	2326496	-1,65	0,0000
DIABLO	diablo homolog (Drosophila)	3475511	-1,51	0,0004
DLST	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	3544346	-1,62	0,0004
DNAJC17 /// ZFYVE19	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 17 // zinc finger, FYVE domain containing 19	3619650	-1,59	0,0012
ELP2	elongation protein 2 homolog (S. cerevisiae)	3784727	-1,59	0,0000
EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	3818596	-1,61	0,0016
FADS1	fatty acid desaturase 1	3375545	-1,63	0,0000
FADS2	fatty acid desaturase 2	3333247	-1,62	0,0000
FAM188A	family with sequence similarity 188, member A	3279410	-1,56	0,0004
FAM63B	family with sequence similarity 63, member B	3595846	-1,54	0,0020
FAM64A	family with sequence similarity 64, member A	3707950	1,84	0,0011
FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2	2761837	1,60	0,0035
FITM2	fat storage-inducing transmembrane protein 2	3906852	-1,60	0,0018
FKBP9L /// FKBP9	FK506 binding protein 9, 63 kDa	2996246	1,76	0,0009
FN1	fibronectin 1	2598261	-2,06	0,0000
FOXL2	forkhead box L2	2697652	1,53	0,0000
FSD1L /// RALGAPA1	fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like	3183238	-1,63	0,0046
GEMIN7	gem (nuclear organelle) associated protein 7	3836044	-1,50	0,0026
GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (S. cerevisiae)	3896370	-1,50	0,0001
GPR139	G protein-coupled receptor 139	3683430	1,89	0,0000
GPR180	G protein-coupled receptor 180	3496916	-1,54	0,0004
HDGFL1	hepatoma derived growth factor-like 1	2898096	1,56	0,0000
HIST1H1A	histone cluster 1, H1a	2946194	1,59	0,0005
HIST1H2AL	histone cluster 1, H2al	2900091	1,80	0,0004
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	2815965	-1,54	0,0001
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	2855501	-2,10	0,0000
HNRNPA1L 2 /// HNRNPA1P 10 /// HNRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 // heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 10 // heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	3416483	-1,52	0,0036

IFT52	intraflagellar transport 52 homolog (Chlamydomonas)	3886179	-1,51	0,0005
IFT74	intraflagellar transport 74 homolog (Chlamydomonas)	3165780	-1,54	0,0073
IL16 /// STARD5	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5 // interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	3635553	-1,95	0,0000
IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	3391255	-1,61	0,0000
IMPACT	Impact homolog (mouse)	3782166	-1,67	0,0001
INGX	inhibitor of growth family, X-linked, pseudogene	4011951	1,54	0,0001
INO80C	INO80 complex subunit C	3804000	-1,61	0,0000
ITGA3	/ integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	3726154	-1,54	0,0002
KAT5	K(lysine) acetyltransferase 5	3335517	-1,50	0,0023
KCNE3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	3381965	-1,58	0,0020
KCNE4	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	2529627	1,75	0,0077
KCNK3	potassium channel, subfamily K, member 3	2473936	1,68	0,0000
KDM4C	lysine (K)-specific demethylase 4C	3161566	-1,75	0,0001
KIAA0528	KIAA0528	3447129	-1,50	0,0007
KIAA1826	KIAA1826	3389529	-1,64	0,0013
KLHDC2	kelch domain containing 2	3534923	-1,67	0,0000
KRTAP5-5 /// KRTAP5-7 /// KRTAP5-8 /// KRTAP5-3	keratin associated protein 5-3 // keratin associated protein 5-8 // keratin associated protein 5-7 // keratin associated protein 5-5 // keratin associated protein 5-3	3358906	3,01	0,0000
KRTAP6-3	keratin associated protein 6-3	3917582	1,88	0,0024
LCE3A	late cornified envelope 3A	2435745	1,54	0,0006
LHFPL3	lipoma HMGIC fusion partner-like 3	3017354	1,67	0,0000
LHFPL4	lipoma HMGIC fusion partner-like 4	2662297	1,54	0,0023
LOC100101266 /// HAVCR1	hepatitis A virus cellular receptor 1 // hepatitis A virus cellular receptor 1 pseudogene	2883317	-1,69	0,0055
LOC100129518 /// ACAT2	acetyl-CoA acetyltransferase 2	2934131	-1,56	0,0000
LOC100132273 /// C22orf32	chromosome 22 open reading frame 32	3947310	-1,60	0,0006
LOC100132481 /// CHCHD6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6	2640507	-1,54	0,0095
LOC100507488 /// FN1	NMfibronectin 1	2526806	-1,64	0,0005

LOC399815 /// C10orf88	chromosome 10 open reading frame 88	3310725	-1,55	0,0030
LOC80054	hypothetical LOC80054	3829300	2,84	0,0002
LRR37A3 /// LRR37A2 /// LRR37A4 /// ARL17A /// LRR37A	leucine rich repeat containing 37, member A3 //ADP-ribosylation factor-like 17A // leucine rich repeat containing 37, member A2 // LRR37A4 // leucine rich repeat containing 37, member A4 (pseudogene)	3767169	-1,87	0,0012
LRRFIP1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	2534456	-1,84	0,0003
MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-like	3240012	-1,66	0,0001
MDP1	magnesium-dependent phosphatase 1	3557968	-1,72	0,0012
MEGF8	multiple EGF-like-domains 8	3834837	-1,55	0,0089
MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	3661684	-1,52	0,0004
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	3388830	1,66	0,0000
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen	2362333	-1,54	0,0075
MOGAT2	monoacylglycerol O-acyltransferase 2	3340640	1,69	0,0004
MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	3332298	-1,56	0,0002
MT1G	metallothionein 1G	3692999	1,81	0,0026
MT3	metallothionein 3	3662093	1,62	0,0001
MUCL1	mucin-like 1	3416702	1,54	0,0082
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	2470805	1,72	0,0017
MYST4	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	3252382	-1,57	0,0000
NACAP1	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide pseudogene 1	3109600	1,92	0,0000
NAPB	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, beta	3901191	-1,52	0,0013
NAT10	N-acetyltransferase 10 (GCN5-related)	3326252	-1,52	0,0001
NCF4	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	3944543	-1,52	0,0000
NCR1	natural cytotoxicity triggering receptor 1	3841881	-1,51	0,0002
NCRNA002 57	non-protein coding RNA 257	3932261	1,93	0,0087
NEIL1 /// MAN2C1	nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli) // mannosidase, alpha, class 2C, member 1	3602299	1,57	0,0001
NFX1	Nuclear transcription factor, X-box binding 1	3166880	-1,59	0,0001
NKPD1 /// TRAPPC6A	trafficking protein particle complex 6A	3865223	-1,57	0,0036
NOB1	RPN12 binding protein 1 homolog (S. cerevisiae)	3696697	-1,69	0,0013

NXF2 /// NXF2B	nuclear RNA export factor 2	3985034	-2,09	0,0052
OR4A5	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 5	3373122	1,62	0,0001
OR52M1	olfactory receptor, family 52, subfamily M, member 1	3318141	1,68	0,0004
OSGEP	O-sialoglycoprotein endopeptidase	3555461	-1,62	0,0000
PAN3	PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit homolog (S. cerevisiae)	3483159	-1,51	0,0018
PBLD	phenazine biosynthesis-like protein domain containing	3292590	-1,76	0,0009
PCID2	PCI domain containing 2	3526378	-1,55	0,0007
PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	2698996	-1,74	0,0000
PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	4007550	1,53	0,0003
PDXP /// SH3BP1	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase // SH3-domain binding protein 1	3944873	1,52	0,0001
PFN4	profilin family, member 4	2544219	1,53	0,0026
PIH1D1	PIH1 domain containing 1	3867865	-1,53	0,0001
PIR	pirin (iron-binding nuclear protein)	4000560	-1,72	0,0004
PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1	3268274	-1,65	0,0005
PLEKHF2	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2	3107828	-1,57	0,0026
POLI	polymerase (DNA directed) iota	3788833	-1,58	0,0038
PROKR1	prokineticin receptor 1	2486901	1,58	0,0014
PSD3	/ pleckstrin and Sec7 domain containing 3	3126368	-2,12	0,0013
PSMA2 /// C7orf25	chromosome 7 open reading frame 2	3047953	-1,62	0,0040
PSME2	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	3557811	2,90	0,0000
RBM43	RNA binding motif protein 43	2580943	-2,03	0,0004
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	2372858	-1,81	0,0001
RHOB	ras homolog gene family, member B	2471978	1,57	0,0000
RNF185	ring finger protein 185	3957738	-2,01	0,0055
ROGDI	rogdi homolog (Drosophila)	3678369	-1,52	0,0002
RPL23AP64	NR_003040 // RPL23AP64 // ribosomal protein L23a pseudogene 64 // 11q23.3 // 649946 /// BC017930 // RPL23AP64 // ribosomal protein L23a pseudogene 64 // 11q23.3 // 649946	3394057	2,68	0,0006
RPLP0	ribosomal protein, large, P0	3474344	2,17	0,0000
RPP38	ribonuclease P/MRP 38kDa subunit	3236538	-1,67	0,0037
RPS11	ribosomal protein S11	3439256	-1,62	0,0037
RSF1	NM_ remodeling and spacing factor 1	3382972	-1,60	0,0001
S100B	S100 calcium binding protein B	3935486	-1,57	0,0005

S1PR2	sphingosine-1-phosphate receptor 2	3850166	1,64	0,0056
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	2750594	-1,95	0,0000
SC5DL	sterol-C5-desaturase	3352904	-1,52	0,0006
SCFD1	sec1 family domain containing 1	3531032	-1,51	0,0010
SCFD2	/ sec1 family domain containing 2	2769182	-1,66	0,0016
SEC23A	Sec23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	3561952	-1,54	0,0008
SEPT11	septin 11	2732273	1,82	0,0000
SH3BGRL /// HMG5	high-mobility group nucleosome binding domain 5	4013828	-1,54	0,0061
SIGLEC11	sialic acid binding Ig-like lectin 11	3868257	1,51	0,0001
SIRT2	sirtuin 2	3861689	-1,54	0,0019
SLC25A16	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; Graves disease autoantigen), member 16	3292735	-1,58	0,0001
SLC29A1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	2908423	-1,53	0,0000
SLC35E4 /// DUSP18	dual specificity phosphatase 18 // solute carrier family 35, member E4	3957486	-1,60	0,0002
SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	2779823	-1,61	0,0003
SLFN5	schlafen family member 5	3718555	-1,52	0,0000
SNORA17 /// SNORA43 /// SNHG7	small nucleolar RNA host gene 7 (non-protein coding) // small nucleolar RNA, H/ACA box 17 // small nucleolar RNA, H/ACA box 43	3230332	1,76	0,0007
SNORA2A /// SNORA2B /// SNORA34 /// C12orf41	chromosome 12 open reading frame 41	3453177	-1,84	0,0000
SNUPN	snurportin 1	3633522	-1,62	0,0002
STARD4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4	2870828	-1,92	0,0000
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	3457752	-1,90	0,0000
STC1	stanniocalcin 1	3128046	1,71	0,0000
SUMO1P1	SUMO1 pseudogene 1	3910347	-1,58	0,0025
SUMO1P3 /// SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>) // SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	2595252	1,73	0,0003
SUMO1P3 /// SUMO1	SUMO1 pseudogene 3 // SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	2363074	-2,63	0,0071
SYNGR2	synaptogyrin 2	3736232	-1,55	0,0007
TAGLN3	transgelin 3	2635998	1,51	0,0007
TCEAL3 /// TCEAL6	transcription elongation factor A (SII)-like 3// transcription elongation factor A (SII)-like 6	3985644	1,65	0,0002
TCEAL7	transcription elongation factor A (SII)-like	3985511	1,60	0,0018

	7			
TCEANC	transcription elongation factor A (SII) N-terminal and central domain containing	3969396	-1,73	0,0013
TCF25	transcription factor 25 (basic helix-loop-helix)	3674434	-1,53	0,0000
TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	3548152	-1,51	0,0004
TEX9	testis expressed 9	3594986	-1,53	0,0035
TGDS	TDP-glucose 4,6-dehydratase	3520989	-1,61	0,0001
TIAM2 /// TFB1M	transcription factor B1, mitochondrial	2980812	-1,54	0,0020
TIGD6 /// SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	2835300	-1,65	0,0040
TKTL2	transketolase-like 2	2792161	1,69	0,0000
TMEM145	transmembrane protein 145	3834744	1,68	0,0002
TMEM208	transmembrane protein 208	3665357	-1,52	0,0000
TMEM45A	transmembrane protein 45A	2633691	-1,67	0,0031
TPP1	tripeptidyl peptidase I	3361041	-1,55	0,0000
TRAPPC4	trafficking protein particle complex 4	3351775	-1,50	0,0000
TRIM21	tripartite motif-containing 21	3360142	-1,53	0,0039
TRUB1	TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 1 (E. coli)	3265494	1,66	0,0000
TTC39C	tetratricopeptide repeat domain 39C	3781980	-1,58	0,0004
TUBA3C /// TUBA3D /// TUBA3E	tubulin, alpha 3e // tubulin, alpha 3d // tubulin, alpha 3c	2575949	2,64	0,0081
TUBB2B	tubulin, beta 2B	2939232	1,69	0,0023
TXNIP	thioredoxin interacting protein	2356115	1,59	0,0002
UFSP2	UFM1-specific peptidase 2	2796875	-1,60	0,0008
VIPAR	VPS33B interacting protein, apical-basolateral polarity regulator	3573078	-1,55	0,0000
WNT7B	wingless-type MMTV integration site family, member 7B	4053903	1,92	0,0011
ZBED5	zinc finger, BED-type containing 5	3362934	-1,53	0,0083
ZBTB41	zinc finger and BTB domain containing 41	2449619	-1,51	0,0010
ZFC3H1	zinc finger, C3H1-type containing	3462094	-1,50	0,0005
ZNF25	zinc finger protein 25	3285614	-1,54	0,0081
ZNF263 /// TIGD7	tigger transposable element derived 7 // zinc finger protein 263	3677538	-1,58	0,0015
ZNF460	zinc finger protein 460	3843156	-1,62	0,0005
ZNF841 /// ZNF836 /// ZNF432	zinc finger protein 841 // zinc finger protein 432 // zinc finger protein 836	3869396	-1,98	0,0002

Anexo 2. Contribuciones

Durante la ejecución del proyecto se formaron dos jóvenes investigadores, financiados por COLCIENCIAS y el Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta. Las contribuciones fueron:

Carlos Esteban Franco Muñoz. Joven investigador

Apoyo a la propagación de los constructos genéticos, transducción y selección de células.

Apoyo en la estandarización de la infección in vitro de las células U-937

Extracción de RNA

Apoyo en la producción y titulación de virus.

Diana Alexandra Londoño Barbosa – Joven investigador

Apoyo en la estandarización de la técnica de tinción fluorescente y evaluación del fenotipo de infección.

Apoyo en la estandarización y realización de los ensayos de Western Blot.

Apoyo en el diseño de secuencias de shRNAs.

Daniel Restrepo Montoya MSc, PhD (c)

Apoyo en el análisis de los datos de microarreglos y en el análisis de enriquecimiento funcional.

Guillermo Sanchez Vanegas MD, MSc, PhD

Apoyo en los análisis e interpretación de resultados estadísticos

13. Bibliografía

1. Ghosh, S., S. Goswami, and S. Adhya, *Role of superoxide dismutase in survival of Leishmania within the macrophage*. Biochem J, 2003. **369**(Pt 3): p. 447-52.
2. Barr, S.D. and L. Gedamu, *Role of peroxidoxins in Leishmania chagasi survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10816-23.
3. Reiner, N.E., W. Ng, and W.R. McMaster, *Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. Leishmania donovani suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products*. J Immunol, 1987. **138**(6): p. 1926-32.
4. Kaye, P.M., et al., *Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages*. Eur J Immunol, 1994. **24**(11): p. 2850-4.
5. Dogra, N., C. Warburton, and W.R. McMaster, *Leishmania major abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective*. Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3506-15.
6. McConville, M.J. and T. Naderer, *Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania*. Annu Rev Microbiol, 2011. **65**: p. 543-61.
7. Peacock, C.S., et al., *Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 839-47.
8. Buates, S. and G. Matlashewski, *General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(5): p. 3416-3422.
9. Chaussabel, D., et al., *Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites*. Blood, 2003. **102**(2): p. 672-81.
10. Gregory, D.J., R. Sladek, and e. al., *Comparison of the effects of Leishmania major or Leishmania donovani infection on macrophage gene expression*. Infect Immun, 2008. **76**(3): p. 1186-92.
11. Zhang, S., et al., *Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines*. PLoS neglected tropical diseases, 2010. **4**(3): p. e648.
12. Rabhi, I., et al., *Comparative analysis of resistant and susceptible macrophage gene expression response to Leishmania major parasite*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 723.
13. Rodriguez, N.E., H.K. Chang, and M.E. Wilson, *Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of Leishmania chagasi*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2111-22.
14. Ettinger., N.A. and M. Wilson., *Macrophage and T-Cell Gene Expression in a Model of Early Infection with the Protozoan Leishmania chagasi*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(6): p. 252.
15. Zhang, S., et al., *Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(3): p. e648.
16. Rodriguez, N.E., et al., *Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19000.
17. Misra, S., M.K. Tripathi, and G. Chaudhuri, *Down-regulation of 7SL RNA expression and impairment of vesicular protein transport pathways by Leishmania infection of macrophages*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29364-73.
18. Ettinger, N.A. and M.E. Wilson, *Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan Leishmania chagasi*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(6): p. e252.
19. Alvar, J., et al., *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35671.

20. PAHO, *Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas*. 2013, Pan American Health Organization.
21. Enfermedades-Transmitidas-por-Vectores, G.-. *INFORME DEL EVENTO LEISHMANIASIS HASTA PERIODO EPIDEMIOLÓGICO XIII DEL AÑO 2013 (PRELIMINAR)*. 2014, Instituto Nacional de Salud: Bogotá.
22. De Almeida, M., et al., *Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2003. **98**(7): p. 861-870.
23. Killick-Kendrick, R., *The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host*. Annales de Parasitologie humaine et comparée, 1989. **65**: p. 37-42.
24. Sutterwala, F.S., L.A. Rosenthal, and D.M. Mosser, *Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD 11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(6): p. 883-90.
25. Brittingham, A., et al., *Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4477-84.
26. Maia, C., et al., *Infectivity of five different types of macrophages by Leishmania infantum*. Acta Trop, 2007. **103**(2): p. 150-5.
27. Da Silva, R.P., et al., *CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages*. J Immunol, 1989. **143**(2): p. 617-22.
28. Wright, S.D. and S.C. Silverstein, *Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes*. J Exp Med, 1983. **158**(6): p. 2016-23.
29. Blackwell, J.M., et al., *Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum*. J Exp Med, 1985. **162**(1): p. 324-31.
30. Akilov, O.E., et al., *The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(5): p. 1188-96.
31. Wilson, M.E. and R. Pearson, *Evidence that Leishmania donovani utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism*. The Journal of Immunology, 1986. **136**(12): p. 4681-4688.
32. Wright, S.D., et al., *Communication between receptors for different ligands on a single cell: ligation of fibronectin receptors induces a reversible alteration in the function of complement receptors on cultured human monocytes*. J Cell Biol, 1984. **99**(1 Pt 1): p. 336-9.
33. de Veer, M.J., et al., *MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2822-31.
34. Kropf, P., et al., *Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite Leishmania major*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 1920-8.
35. Jean-Frédéric Flandin, F.C.A.D., *RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon-γ-primed macrophages*. European Journal of Immunology 2006. **36**(2): p. 411-420.
36. Buxade, M., et al., *Gene expression induced by Toll-like receptors in macrophages requires the transcription factor NFAT5*. J Exp Med, 2012. **209**(2): p. 379-93.
37. Lodge, R., T.O. Diallo, and A. Descoteaux, *Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosomal membrane*. Cell Microbiol, 2006. **8**(12): p. 1922-31.
38. Desjardins, M. and A. Descoteaux, *Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2061-8.

39. Holm, A., et al., *Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(4): p. 653-8.
40. Vinet, A.F., et al., *The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V*. *PLoS pathogens*, 2009. **5**(10): p. e1000628.
41. Seay, M.B., P.L. Heard, and G. Cahudhuri, *Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of Leishmania mexicana amazonensis promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes*. *Infect. Immun.*, 1996. **64**: p. 5129-5137.
42. Belosevic, M., et al., *Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major*. *J Immunol*, 1989. **143**(1): p. 266-74.
43. Jayakumar, A., et al., *Transcriptional inhibition of interleukin-12 promoter activity in Leishmania spp.-infected macrophages*. *J Parasitol*, 2008. **94**(1): p. 84-93.
44. Bhardwaj, S., et al., *Leishmania interferes with host cell signaling to devise a survival strategy*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 109189.
45. David, M., et al., *Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated jack/Stat pathway by SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1*. *Mol. Cell Biol*, 1995. **15**: p. 7050-7058.
46. Ram, P.A. and D.J. Waxman, *Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(28): p. 17694-702.
47. Haque, S.J., et al., *Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(51): p. 33893-6.
48. Olivier, M., et al., *Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(22): p. 13944-9.
49. Blanchette, J., et al., *Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(11): p. 3737-44.
50. Forget, G., et al., *Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in Leishmania donovani-induced inhibition of nitric oxide production*. *Infect Immun*, 2006. **74**(11): p. 6272-9.
51. Martiny, A., et al., *Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by Leishmania amastigotes*. *Mol Biochem Parasitol*, 1999. **102**(1): p. 1-12.
52. Rosas, L.E., et al., *Development of protective immunity against cutaneous leishmaniasis is dependent on STAT1-mediated IFN signaling pathway*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(7): p. 1799-805.
53. Nandan, D. and N.E. Reiner, *Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with Leishmania donovani: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1*. *Infect Immun*, 1995. **63**(11): p. 4495-500.
54. Ray, M., et al., *Inhibition of interferon-gamma signaling by Leishmania donovani*. *J Infect Dis*, 2000. **181**(3): p. 1121-8.
55. Forget, G., et al., *Regulation of the Leishmania-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(6): p. 1906-17.

56. Forget, G., D.J. Gregory, and M. Olivier, *Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with Leishmania donovani*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30542-9.
57. Guizani-Tabbane, L., et al., *Leishmania major amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 2582-9.
58. Cameron, P., et al., *Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by Leishmania mexicana amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3297-304.
59. Stenger, S., et al., *Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 783-93.
60. Schariton, T.M. and P. Scott, *Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 567-77.
61. Srivastav, S., et al., *Leishmania donovani exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 924-34.
62. Gupta, P., et al., *Leishmania donovani targets tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 3 for impairing TLR4-mediated host response*. FASEB J, 2014.
63. Srivastava, N., R. Sudan, and B. Saha, *CD40-modulated dual-specificity phosphatases MAPK phosphatase (MKP)-1 and MKP-3 reciprocally regulate Leishmania major infection*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5863-72.
64. Flandin, J.F., F. Chano, and A. Descoteaux, *RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages*. Eur J Immunol, 2006. **36**(2): p. 411-20.
65. Dey, R., et al., *A novel approach to regulate experimental visceral leishmaniasis in murine macrophages using CCR5 siRNA*. Scandinavian journal of immunology, 2008. **67**(4): p. 345-353.
66. Canton, J., et al., *Disruption of the fusion of Leishmania parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection*. Cellular Microbiology, 2012. **14**(6): p. 937-948.
67. Chau, C.H., et al., *Etk/Bmx mediates expression of stress-induced adaptive genes VEGF, PAI-1, and iNOS via multiple signaling cascades in different cell systems*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(2): p. C444-54.
68. Minta, J. and L. Pambrun, *In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with phorbol myristate acetate*. The American journal of pathology, 1985. **119**(1): p. 111.
69. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 1995: p. 289-300.
70. Edgar, R. and T. Barrett, *NCBI GEO standards and services for microarray data*. Nature biotechnology, 2006. **24**(12): p. 1471.
71. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
72. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 1-13.

73. Cho, R.J., et al., *Transcriptional regulation and function during the human cell cycle*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 48-54.
74. Huggins, C.E., et al., *Functional and metabolic remodelling in GLUT4-deficient hearts confers hyper-responsiveness to substrate intervention*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(2): p. 270-80.
75. Dissen, G.A., et al., *Using lentiviral vectors as delivery vehicles for gene therapy*, in *Controlled Genetic Manipulations*. 2012, Springer. p. 69-96.
76. Santhosh, C., et al., *A lentiviral vector with novel multiple cloning sites: stable transgene expression in vitro and in vivo*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **371**(3): p. 546-550.
77. Tietz, S.M. and M. Berghoff, *Gene silencing of MK2 in hard-to-transfect human U937 cells*. J Biomol Tech, 2012. **23**(2): p. 47-50.
78. Martinet, W., D.M. Schrijvers, and M.M. Kockx, *Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells*. Biotechnology letters, 2003. **25**(13): p. 1025-1029.
79. Van De Parre, T.J., W. Martinet, and G.R. De Meyer, *mRNA transfection in monocytes and macrophages*, in *New Messenger RNA Research Communications*. Nova Science Publishers, Inc. 2007. p. 181-190.
80. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
81. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annual review of biochemistry, 1998. **67**(1): p. 509-544.
82. Liu, H.-S., et al., *Is green fluorescent protein toxic to the living cells?* Biochemical and biophysical research communications, 1999. **260**(3): p. 712-717.
83. Huang, W.-Y., et al., *Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy*. Nature medicine, 2000. **6**(5): p. 482-483.
84. Krestel, H.E., et al., *Neuronal co-expression of EGFP and β -galactosidase in mice causes neuropathology and premature death*. Neurobiology of disease, 2004. **17**(2): p. 310-318.
85. Agbulut, O., et al., *Green fluorescent protein impairs actin-myosin interactions by binding to the actin-binding site of myosin*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(14): p. 10465-10471.
86. Coumans, J., et al., *Green Fluorescent Protein Expression Triggers Proteome Changes in Breast Cancer Cells*. Experimental cell research, 2013.
87. Zhang, F., et al., *Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2115-2121.
88. McManus, M.T. and P.A. Sharp, *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(10): p. 737-47.
89. Elbashir, S.M., et al., *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs*. Methods, 2002. **26**(2): p. 199-213.
90. Paul, C.P., et al., *Effective expression of small interfering RNA in human cells*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(5): p. 505-8.
91. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. nature, 2001. **411**(6836): p. 494-498.
92. Harborth, J., et al., *Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2003. **13**(2): p. 83-105.

93. Tulac, S., et al., *Silencing lamin A/C in human endometrial stromal cells: a model to investigate endometrial gene function and regulation*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(10): p. 705-11.
94. Lomas-Neira, J.L., et al., *In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(6): p. 846-53.
95. Dong, Q., et al., *GRObeta and its downstream effector EGR1 regulate cisplatin-induced apoptosis in WHCO1 cells*. Oncol Rep, 2011. **25**(4): p. 1031-7.
96. Fellmann, C. and S.W. Lowe, *Stable RNA interference rules for silencing*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(1): p. 10-8.
97. Reynolds, A., et al., *Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent*. RNA, 2006. **12**(6): p. 988-93.
98. Ghosh, S., et al., *Leishmania donovani Suppresses Activated Protein 1 and NF- B Activation in Host Macrophages via Ceramide Generation: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase*. Infection and Immunity, 2002. **70**(12): p. 6828-6838.
99. Giudice, A., et al., *Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with Leishmania braziliensis infection*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 75.
100. Lemaire, J., et al., *MicroRNA expression profile in human macrophages in response to Leishmania major infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(10): p. e2478.
101. Ramírez, C., et al., *Human Macrophage Response to L.(Viannia) panamensis: Microarray Evidence for an Early Inflammatory Response*. PLoS neglected tropical diseases, 2012. **6**(10): p. e1866.
102. Fortéa, J., et al., *Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying Leishmania amazonensis amastigotes*. BMC genomics, 2009. **10**(1): p. 119.
103. Goldston, A.M., R.R. Powell, and L.A. Temesvari, *Sink or swim: lipid rafts in parasite pathogenesis*. Trends Parasitol, 2012. **28**(10): p. 417-26.
104. Pucadyil, T.J., et al., *Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: implications in leishmaniasis*. Molecular and Biochemical Parasitology, 2004. **133**(2): p. 145-152.
105. Goluszko, P. and B. Nowicki, *Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 7791-6.
106. Rabhi, I., et al., *Transcriptomic Signature of Leishmania Infected Mice Macrophages: A Metabolic Point of View*. PLoS neglected tropical diseases, 2012. **6**(8): p. e1763.
107. Osorio y Fortea, J., et al., *Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying Leishmania amazonensis amastigotes*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 119.
108. Peterson, T.R., et al., *mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway*. Cell, 2011. **146**(3): p. 408-20.
109. Majumder, S., et al., *Leishmania-Induced Biphasic Ceramide Generation in Macrophages Is Crucial for Uptake and Survival of the Parasite*. Journal of Infectious Diseases, 2012. **205**(10): p. 1607-1616.
110. Rub, A., et al., *Cholesterol depletion associated with Leishmania major infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function*. Nature immunology, 2009. **10**(3): p. 273-280.
111. Peterson, T.R., et al., *mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway*. Cell, 2011. **146**(3): p. 408-420.
112. Gregory, D.J., et al., *A novel form of NF-kappaB is induced by Leishmania infection: involvement in macrophage gene expression*. Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 1071-81.

113. Jaramillo, M., et al., *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe*, 2011. **9**(4): p. 331-41.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con el apoyo de los miembros del Laboratorio de investigación del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Mis más sinceros agradecimientos:

- A Dios, quien todo lo hace posible.
- A mis papás quienes siempre me enseñaron el valor de aprender.
- A Alber, Laura y Santiago por su invaluable apoyo y motivación. Gracias por amarme, al comprender sin reclamos la importancia de la ciencia para mí.
- A Consuelo Lopez por su apoyo incondicional y voz de aliento en todos los momentos. Gracias por tu amistad.
- Al profesor Carlos Clavijo Ramírez por la conducción del trabajo y por permitirme desarrollar mis propias ideas.
- A Carlos Franco y Diana Londoño por sus aportes, gran apoyo y cariño muy bien correspondido.
- A la Dra. Luisa Porras de Quintana por creer en mí y facilitarme cuando apenas empezaba lo que la mayoría tienen después de un largo caminar.
- Al Profe Orlando Chaparro por su exigencia y aportes desde el primer día de clase.
- A mis amigos y compañeros del Lleras en quienes siempre encontré ayuda.
- A mis amigos de quienes siempre recibí cariño y motivación.
- A Eliana por su gran ayuda, profesionalismo, cariño y buena disposición en conseguir toda la literatura.
- Al Dr. Kwan-Poo Chang por enseñarme más allá de la ciencia.