



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del efecto del silenciamiento del gen *RhoB* (*Ras Homology Family Member B*) sobre el fenotipo de infección de macrófagos derivados de células U937 infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*”

Carlos Esteban Franco Muñoz

**Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá
Facultad de Medicina
Maestría en Bioquímica
2016**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DE GRADO – MAESTRÍA

1. IDENTIFICACIÓN

Maestría: Bioquímica

Estudiante: Carlos Esteban Franco Muñoz

Código: 599458

Directores de Tesis: Clemencia Ovalle Bracho Ph.D.

Título del Trabajo: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN RHOB (RAS HOMOLOGY FAMILY MEMBER B) SOBRE EL FENOTIPO DE INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE CÉLULAS U937 INFECTADOS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

2. SUSTENTACIÓN

Fecha: 29 de febrero de 2016

Lugar: Salón Maestría (salón 407)

3. EVALUACIÓN

Después de analizar el trabajo escrito y participar en la sesión de sustentación, en nuestra calidad de Jurado Calificador, hemos decidido otorgar el trabajo objeto de evaluación. La calificación :

APROBADO



REPROBADO



4. MENCIÓN

Por razones que justificaremos por escrito en documento que presentaremos al Consejo de la Facultad en un lapso no superior a los 15 días, contados a partir de la fecha de la presente Acta, hemos decidido por unanimidad solicitar para el trabajo la siguiente mención:

MERITORIA

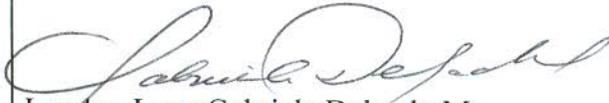


LAUREADA



5. Justificación, observaciones y constancias si el trabajo es reprobado

En constancia de todo lo anterior firmamos en calidad de miembros del Jurado Calificador



Jurado: Lucy Gabriela Delgado M.
Facultad de Ciencias, UNAL

C.C: 52032446 Bte



Jurado: Fredy Salazar Gutierrez
Facultad de Medicina,
Universidad Antonio Nariño

C.C: 74858746



Jurado: María Mercedes Zambrano.
Directora Científica, CORPOGEN

C.C: 31874025

Acta del consejo de Facultad en las que se nombran los miembros del jurado Calificador:
Acta No. 43 del 3 de diciembre de 2015. Oficio CFM-0985

FECHAS DE RECEPCIÓN EN LA SECRETARIA DEL LA FACULTAD

1. Acta de Sustentación debidamente diligenciada:
2. Justificación de la solicitud de mención:

Evaluación del efecto del silenciamiento del gen *RhoB* (*Ras Homology Family Member B*) sobre el fenotipo de infección de macrófagos derivados de células U937 infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*"

Carlos Esteban Franco Muñoz

Tesis presentada como requisito para optar por el título de **Magister en Bioquímica**

Directora

Clemencia Ovalle Bracho MSc. Ph.D

Profesora Adjunta

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Líder de Grupo de Investigación en Dermatología Tropical, Líder Línea de Investigación en Leishmaniasis, Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta E.S.E

Universidad Nacional de Colombia

Sede Bogotá

Facultad de Medicina

Maestría en Bioquímica

2016

“El científico no busca un resultado inmediato. No espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para los que vendrán, señalar el camino”

Nikola Tesla

RESUMEN

El desarrollo de mecanismos de prevención y control de las leishmaniasis se ha dificultado en parte por las pocas opciones terapéuticas y por los vacíos en el conocimiento de la interacción entre el parásito y el hospedero. El parásito posee varios mecanismos para modular la respuesta del macrófago, entre estos, la alteración de la expresión genética del macrófago durante la infección. En un trabajo previo del grupo de investigación, por análisis de microarreglos se reportaron los cambios en la expresión de genes de macrófagos derivados de células U937 infectados durante 72 horas con *Leishmania Viannia braziliensis*. A partir de estos resultados se seleccionó un grupo de genes para ser validados funcionalmente durante la infección *in vitro*. El gen *RhoB* que codifica para una pequeña GTPasa hace parte de un grupo de genes expresados diferencialmente entre macrófagos infectados y no infectados. El control de la expresión de este gen está relacionado con la síntesis del colesterol, proceso que se ha reportado como alterado durante la infección. El objetivo de este trabajo fue validar de manera cuantitativa los niveles de expresión del gen *RhoB* en los macrófagos infectados y determinar el efecto del silenciamiento genético de *RhoB* sobre el fenotipo de infección, medido éste como carga parasitaria y porcentaje de infección en los macrófagos infectados con *L. (V.) braziliensis*.

Los niveles de expresión del gen *RhoB* fueron medidos por PCR en tiempo real en macrófagos entre las 0 y las 120 horas después de la infección *in vitro*, con el fin de describir la cinética de expresión del gen durante la infección. Posteriormente, se utilizó transducción lentiviral para generar líneas celulares derivadas de U937 con expresión constitutiva de shRNAs dirigidos contra *RhoB*. El silenciamiento de *RhoB* y la cantidad de *RhoB*-activa en las líneas celulares fue determinado por western blot y ensayo de pull-down. Las líneas celulares con mayor nivel de silenciamiento fueron infectadas *in vitro* para determinar mediante tinción fluorescente y análisis de imágenes el efecto del silenciamiento sobre el porcentaje de infección y la carga parasitaria.

Los resultados evidenciaron que el gen *RhoB* no presenta cambio en su expresión en los macrófagos entre las 0 y las 24 horas después de la infección, pero si se sobre-expresa entre las 48 y las 96 horas, resultados concordantes con los obtenidos previamente con microarreglos. Mediante la evaluación funcional usando shRNAs se encontró que el silenciamiento de *RhoB* se asocia con reducción en la carga parasitaria y en el porcentaje de infección *in vitro*. Estos resultados permiten preguntarse si la expresión del gen *RhoB* podría relacionarse con el establecimiento de la infección, teniendo cuenta que el intervalo de tiempo en que se sobre-expresa el gen coincide con el intervalo reportado en el que los amastigotes se multiplican activamente en el macrófago.

PALABRAS CLAVE

Leishmania (V.) braziliensis, macrófago, Proteína de unión a GTP RhoB, Silenciamiento genético, RNA de interferencia.

ABSTRACT

The development of mechanisms for prevention and control of leishmaniasis has been hampered in part by the few therapeutic options and gaps in the knowledge of the interaction between the parasite and the host. The parasite has several mechanisms to modulate macrophage response, among these, altered macrophage gene expression during infection. In a previous work of the research group, were reported the changes in the expression of genes derived macrophages infected U937 cells for 72 hours with *Leishmania Viannia braziliensis* by microarray analysis. From these results, a group of genes to be functionally validated for in vitro infection was selected. The RhoB gene encodes a small GTPase is part of a group of genes differentially expressed between infected and uninfected macrophages. The expression controlling of this gene it is associated with cholesterol synthesis, a process that has been reported as altered during infection. The aim of this study was to quantitatively validate the levels of RhoB gene expression in infected macrophages and determine the effect of RhoB gene silencing on the phenotype of infection, measured as parasite load and percentage of infection in *L. (V.) braziliensis* infected macrophages.

The expression levels of the RhoB gene were measured by real-time PCR in macrophages between 0 and 120 hours after *in vitro* infection, in order to describe the kinetics of gene expression during infection. Subsequently, lentiviral transductions were used to generate cell lines derived from U937 with constitutive expression of shRNAs directed against RhoB. RhoB silencing and the amount of RhoB-active in the cell lines was determined by western blot and pull-down assay. Cell lines with higher silencing was infected *in vitro* to determine the effect on the rate of infection and parasite load by fluorescent staining and image analysis silencing

The results showed that RhoB was not change in gene expression in macrophages between 0 and 24 hours after infection, but is over-expressed between 48 and 96 hours, consistent with the results previously obtained by microarrays. The RhoB gene silencing was associated with reduction in parasite load and percentage of *in vitro* infection. These results raise the question whether RhoB gene expression could be related to the establishment of infection, taking account that the time interval in which over-expresses the gene matches the reported range in which they thrive amastigotes in macrophage.

KEYWORDS

Leishmania (V.) braziliensis, macrophage, RhoB GTP-Binding Protein, Gene silencing, RNA Interference.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. MARCO TEÓRICO	13
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
5. OBJETIVOS	23
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1. Cultivos celulares.....	23
6.2. Estrategia experimental para lograr el primer objetivo:	24
6.3. Estrategias experimentales para lograr el segundo objetivo:	26
6.4. Estrategia experimental para lograr el tercer objetivo:	33
6.5. Análisis estadístico.....	36
7. RESULTADOS	36
7.1. ¿Cuáles son los niveles de expresión del gen RhoB durante la infección de macrófagos derivados de U937 infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> ?	36
7.2. ¿Cuál shRNA genera mayor reducción de los niveles de expresión de RhoB a la menor multiplicidad de infección (MOI)?	38
7.3. ¿Cuáles son los niveles de proteína RhoB activada en una línea celular modificada por transducción lentiviral para la expresión de un shRNA dirigido contra RhoB?	41
7.4. ¿Cuál es el efecto del silenciamiento genético mediado por shRNAs del gen RhoB sobre el porcentaje de infección y la carga parasitaria de macrófagos derivados de U937 infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> ?	43
8. DISCUSIÓN.....	45
8.1. Cinética de expresión del gen RhoB durante la infección <i>in vitro</i>	45
8.2. Silenciamiento del gen RhoB y evaluación de la actividad de la proteína en células silenciadas.	48
8.3. Evaluación del efecto de silenciamiento de RhoB sobre el fenotipo de infección.....	48
8.4. Efectos <i>off-target</i>	50
9. CONCLUSIONES.....	52

10. RECOMENDACIONES	54
11. CONSIDERACIONES ÉTICAS, DE BIOSEGURIDAD Y RIESGO AMBIENTAL SEGÚN RESOLUCIÓN 8430 MINISTERIO DE SALUD.....	55
12. FINANCIACIÓN.....	56
13. REFERENCIAS	57
ANEXOS.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los shRNAs dirigidos contra el gen <i>RhoB</i>	27
Tabla 2. Protocolo diseñado con el programa CellProfiler®.....	35
Tabla 3. Niveles de silenciamiento de las líneas celulares transducidas con vectores lentivirales.....	41
Tabla 4. Porcentaje de infección y carga parasitaria calculados para cada una de las líneas celulares transducidas.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de Leishmania.....	15
Figura 2. ¿Cuáles son los niveles de expresión del gen <i>RhoB</i> durante la infección de macrófagos derivados de U937 infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> ?.....	38
Figura 3. ¿Cuál shRNA genera mayor reducción de los niveles de expresión de <i>RhoB</i> a la menor multiplicidad de infección (MOI)?.....	40
Figura 4. ¿Cuáles son los niveles de proteína <i>RhoB</i> activada en una línea celular modificada por transducción lentiviral para la expresión de un shRNA dirigido contra <i>RhoB</i> ?.....	42
Figura 5. ¿Cuál es el efecto del silenciamiento genético mediado por shRNAs del gen <i>RhoB</i> sobre el porcentaje de infección y la carga parasitaria de macrófagos derivados de U937 infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> ?.....	44
Figura 6. Modelo resumen de los resultados obtenidos y lo reportado en la literatura.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPasa: *adenosine triphosphatase* (Adenosintrifosfatasa).

B2M: *beta-2-microglobulin* (β -2-microglobina)

bp: pares de bases

C3b: complement component 3 (Fracción 3 del complemento)

C3bi: *inactive complement protein fragment* (fracción 3 inactiva del complemento)

cDNA: complementary DNA (ADN complementario)

CR3: *complement receptor 3* (receptor 3 del complemento)

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco)

DNAasa: deoxyribonuclease (Desoxirribonucleasa)

ELISA: *enzyme-linked immuno sorbent assay* (Análisis de inmunoabsorción ligada a las enzimas).

FnRs: (*fibronectine receptors*) receptor de fibronectina

GNB2L1: *guanine nucleotide binding protein (G protein), β polypeptide 2-like 1* (Proteína de union a guanina, polipéptido 2- β tipo 1)

Gp63: *glycoprotein 63* (glicoproteína 63)

HRP: *horse radish peroxidase* (peroxidasa de rábano)

IFN- β : *interferon β* (Interferón $-\beta$)

IFU: *infectious units* (unidades infectivas)

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

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

K.O: *Knock-out*

LB: *Luria broth*

LMNA: *lamin A/C* (lámina A/C)

LPG: *Lipophosphoglycan* (Lipofosfoglicano)

miRNA: micro ARN

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

mRNA: *messenger RNA* (ARN mensajero)

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

NCBI: *National Center for Biotechnology Information.*

NF- κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Factor nuclear

NK: *natural killer*

OMS: Organización Mundial de la Salud

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)

PVDF: *polyvinylidene fluoride* (fluoruro de polivinilideno)

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

RhoB: Ras Homology Family Member B

RhoA: Ras Homology Family Member A

RhoC: Ras Homology Family Member C

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

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)

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

shRNA: *short hairpin RNA*

siARN: *small interfering RNA*

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

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

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

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*)

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)

TRAF6: *TNF receptor-associated factor 6* (factor 6 asociado el receptor del factor de necrosis tumoral)

VP: vacuola parasitófora

1. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son enfermedades causadas por parásitos del género *Leishmania*, representan un problema de salud pública en Colombia y están presentes en todos los departamentos excepto en San Andrés y Providencia. Durante el año 2014 se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA 2002-2005) 11.315 casos de leishmaniasis: 11.120 de la forma cutánea (98,3%), 150 casos de la forma mucosa (1,3%) y 45 casos de la forma visceral (0.4%). Hasta la semana 42 del año 2015 se han notificado 6339 casos de leishmaniasis cutánea y 89 casos de leishmaniasis mucosa (INS 2015).

Leishmania es un parásito intracelular obligado con un ciclo digenético, presenta dos estadios en su ciclo de vida: el promastigote que se encuentra en el vector y el amastigote presente en los macrófagos del hospedero mamífero. El entendimiento de la enfermedad se logra en parte mediante el estudio de la interacción entre *Leishmania* y sus células hospederas, considerando que los parásitos son capaces de alterar diferentes procesos biológicos como la maduración de los fagosomas para crear un nicho intracelular favorable (Moradin and Descoteaux 2012). Una de las alteraciones que presenta el macrófago cuando es infectado son los cambios en la expresión génica que terminan en la alteración de diferentes procesos celulares (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015). El estudio de los cambios en la expresión genética de los macrófagos durante la infección es uno de los enfoques para el entendimiento de la patogénesis de las Leishmaniasis, aunque este tema no se ha investigado ampliamente para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, una de las especies más frecuentes en nuestro país.

Con el objetivo de conocer los genes potencialmente relacionados con la interacción macrófago-*Leishmania* una vez establecida la infección, el grupo de Investigación en Dermatología Tropical del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, realizó mediante microarreglos un estudio de expresión diferencial de genes entre macrófagos no infectados e infectados con *Leishmania Viannia braziliensis* a las 72 horas después de la infección, tiempo en el cual los amastigotes se multiplican activamente (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015). Como resultado de este estudio se encontraron 218 genes diferencialmente expresados entre los macrófagos no infectados e infectados. Hay que considerar que el ensayo de microarreglos es una prueba de tamización y es necesario la confirmación de los resultados por métodos cuantitativos como RT qPCR (Jeffery, Higgins et al. 2006). Además, para conocer si los genes

diferencialmente expresados realmente están implicados en la interacción macrófago-*Leishmania*, se recomienda evaluar funcionalmente el papel del gen mediante silenciamiento genético mediado por RNA de interferencia con el fin de determinar si hay algún efecto en el fenotipo de infección al modificar la expresión de un gen.

En un trabajo previo se validó un modelo celular y un sistema de silenciamiento mediado por shRNAs, capaz de detectar cambios en el fenotipo de infección como consecuencia del silenciamiento genético (Ovalle-Bracho, Londono-Barbosa et al. 2015). Con el fin de iniciar la evaluación funcional de los genes de interés se seleccionaron diferentes candidatos a ser evaluados sistemáticamente mediante la tecnología estandarizada.

El gen que codifica para la proteína B homóloga de Ras (*RhoB*) hace parte de un conjunto de genes de interés para el grupo de investigación identificados en el ensayo de microarreglos y cuya expresión genética debe ser confirmada por PCR en tiempo real. El control de la expresión de este gen está relacionado con la síntesis del colesterol, proceso que se ha reportado como alterado durante la infección. Este trabajo se planteó con el objetivo de determinar el efecto del silenciamiento del gen *RhoB* en el fenotipo de infección de macrófagos infectados por *L. (V) braziliensis*.

2. JUSTIFICACIÓN

Aunque la interacción macrófago-*Leishmania* ha sido objeto de estudio dada la importancia de la leishmaniasis, poco es conocido de la interacción de la célula hospedera con *L. (V) braziliensis* una de las especies más frecuentes en nuestro país que se asocia además con la Leishmaniasis mucocutánea, forma complicada de la enfermedad.

Se han realizado múltiples estudios para evaluar las alteraciones en la expresión de genes del macrófago causadas por la infección por parásitos del subgénero *Leishmania*, pero son muy pocos los trabajos realizados con parásitos del subgénero *Viannia*, subgénero prevalente en nuestro país. Además de lo anterior, son muy pocos los genes que se han evaluado de manera funcional en esta interacción. En una búsqueda realizada se encontró que solo se han probado de manera funcional los genes: GP91, IFN-GAMMA, IFN-RECEPTOR, IL-12, IL17, iNOS, MYD88, Prf1, Rag1, Rag2, STAT4, TLR2, TLR4, TNF y TNF-alphaR para el caso de la infección con *L. (V) braziliensis*. Todos estos genes están relacionados principalmente con respuesta inmune y han sido evaluados con base en la patogénesis de la enfermedad y no con base en las modificaciones de su expresión durante la infección, posiblemente por la ausencia de trabajos en este campo.

El gen RhoB es uno de los genes que se encontró sobre-expresado en macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis*. El control de la expresión de este gen está relacionado con la síntesis del colesterol, proceso que se ha reportado como alterado durante la infección. Este gen también se ha reportado sobre expresado en otros trabajos de expresión genética realizados con macrófagos infectados con *L. (L.) donovani*, en contraste con *L. (L.) major* no se registró ningún cambio en la expresión. Lo anterior podría sugerir que la modulación de este gen durante la infección podría variar dependiendo de la especie infectante, lo que es de gran interés debido a que se conoce muy poco de la interacción macrófago-*L. (V.) braziliensis* y se ha reportado asociaciones entre la especie infectante y el comportamiento de la enfermedad.

El estudio funcional de genes posiblemente relacionados en la interacción macrófago-*Leishmania* puede contribuir a la generación de conocimiento aplicable en el desarrollo de nuevos tratamientos, mecanismos de prevención y control de la leishmaniasis.

3. MARCO TEÓRICO

Leishmaniasis un problema de salud pública

Las leishmaniasis son un grupo de manifestaciones clínicas causadas por un parásito protozoario del género *Leishmania* que es transmitido a un mamífero por la picadura de flebotomos. Esta enfermedad está presente en 98 países y se estima que ocurren entre 700.000 y 1.2 millones casos de leishmaniasis cutánea y de 200.000 a 400.000 de casos de leishmaniasis visceral a nivel mundial. Los diez países con el mayor número de casos de leishmaniasis cutánea son: Afganistán, Algeria, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopia, Sudan del Norte, Costa Rica y Perú. Se estima que se presentan entre 20.000 a 40.000 muertes al año por esta enfermedad(Alvar, Velez et al. 2012).

En las Américas se han identificado 15 de las 22 especies de *Leishmania*, que pueden causar enfermedades en los seres humanos, además, se han identificado 54 especies de vectores potencialmente implicados en su transmisión(PAHO 2013). En Colombia la leishmaniasis es un problema creciente en salud pública, debido al número de casos que se presentan, al cambio en el patrón epidemiológico por la aparición de nuevos focos y al proceso de domiciliación y urbanización del ciclo de transmisión. En el 2015, se notificaron al sistema de información Sivigila, 8249 casos de leishmaniasis, de los cuales, 8098 fueron de la forma cutánea y corresponden a un 98,2 %, 114 casos de la forma mucosa, que corresponden a un 1,4 % y 37 casos confirmados para la forma visceral, que corresponden a 0,45 % de los casos.

Ciclo de vida de *Leishmania*

Los parásitos del género *Leishmania* son los agentes etiológicos de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis. Son parásitos intracelulares obligados, de la familia *Trypanosomatidae* que se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*, este último solo presente en el continente americano (Organization Mundial de la Salud 2010).

Los parásitos del género *Leishmania* tienen un ciclo de vida digenético: dentro del vector hematófago (*Lutzomyia* o *Phlebotomus* dependiendo del continente) *Leishmania* sobrevive en su forma flagelada, móvil y extracelular denominada promastigote; dentro del hospedero mamífero *Leishmania* es un parásito intracelular obligado, aflagelado, que se establece dentro de las células del linaje fagocítico mononuclear. Esta forma es conocida como amastigote (Desjardins and Descoteaux 1997, Alexander, Satoskar et al. 1999).

Para sobrevivir y replicarse dentro de los microambientes que le proporcionan el vector y el hospedero, el parásito debe pasar por cambios morfológicos y bioquímicos drásticos. Dentro del vector los promastigotes procíclicos se encuentran unidos a las células epiteliales del intestino y se dividen activamente. Estos promastigotes se despegan de las células epiteliales del intestino, se transforman a promastigotes metacíclicos que es la forma infectiva del parásito y migran hacia el aparato bucal del vector, a través del cual serán inoculados en el hospedero mamífero como consecuencia de la hematofagia del vector (Alexander, Satoskar et al. 1999). Se ha reportado que la transformación de promastigotes procíclicos a promastigotes metacíclicos, no replicativos, involucra cambios en la estructura de los radicales del lipofosfoglicano (LPG), en la regulación positiva del gen de la metaloproteasa gp63 y cambios en el contenido enzimático según la especie (Desjardins and Descoteaux 1997).

Dentro del hospedero mamífero los parásitos metacíclicos son capaces de evadir y resistir los mecanismos de defensa no específicos, como la lisis mediada por el sistema complemento, para ser reconocidos y fagocitados por las células del linaje fagocítico mononuclear, principalmente por los macrófagos. Dentro de las células los parásitos retardan la formación del fago-lisosoma para transformarse a su forma amastigote y una vez formada la vacuola parasitófora los amastigotes se replican dentro de ella. La proliferación de los parásitos causa la ruptura de las células hospederas y la liberación de los amastigotes al medio extracelular donde pueden infectar otros macrófagos cercanos. El ciclo de vida se completa cuando el vector se alimenta de un hospedero infectado, ingiriendo amastigotes que subsecuentemente se diferenciarán a promastigotes procíclicos (Desjardins and Descoteaux 1997, Alexander, Satoskar et al. 1999).

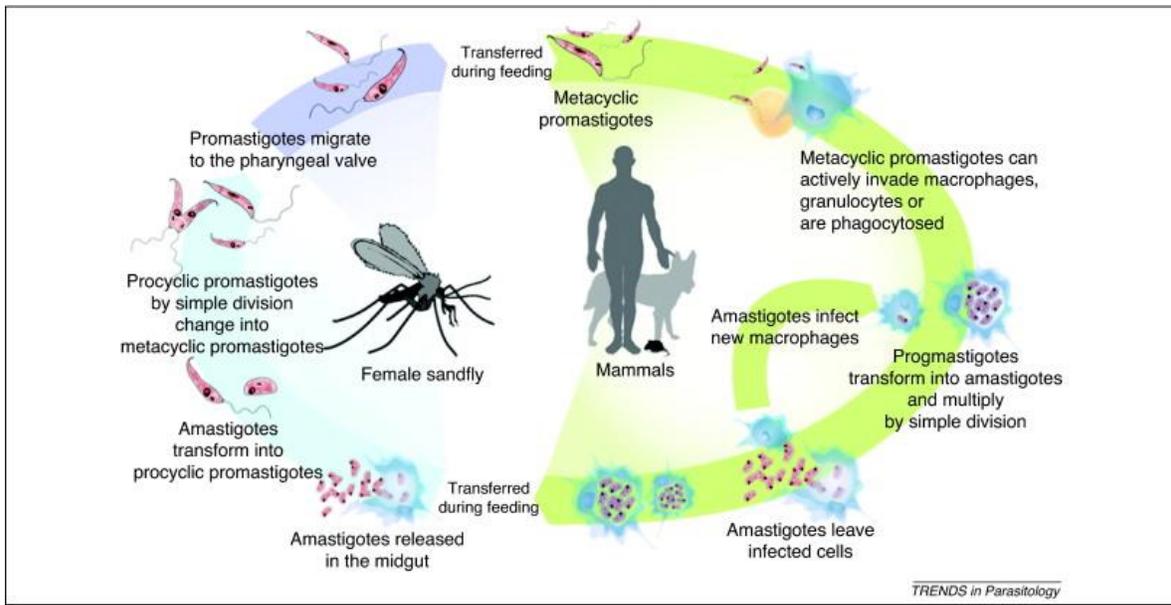


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Tomado de Harhay, Michael O., et al. "Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil." *Trends in parasitology* 27.9 (2011): 403-409.

Interacción macrófago-*Leishmania*

Leishmania es un parásito intracelular que 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. Cuando el vector toma sangre del hospedero inocular promastigotes metacíclicos que pueden activar las vías clásicas y alternativas del complemento por lo cual pueden ser opsonizados o incluso destruidos. Los promastigotes que logran sobrevivir, son internalizados vía fagocitosis mediada por receptores expresados en la membrana del macrófago (Killick-Kendrick 1989, De Almeida, Vilhena et al. 2003). En el macrófago, los promastigotes se transforman en amastigotes donde se replican y posteriormente invaden otros macrófagos.

Los macrófagos hacen parte del linaje celular fagocítico mononuclear, son células especializadas en la destrucción de patógenos, por lo cual, *Leishmania* spp. ha desarrollado a lo largo de su historia biológica diferentes mecanismos de supervivencia para contrarrestar la respuesta del hospedero. Algunos mecanismos descritos incluyen la regulación de la producción de óxido nítrico, la inhibición de la inducción de citocinas necesarias para el normal funcionamiento del macrófago como el interferon gama (IFN- γ) (Dogra, Warburton et al. 2007) y la interleucina 12 (IL-12), la cual es esencial para iniciar la respuesta Th1 (Jayakumar, Widenmaier et al. 2008). Estos mecanismos permiten que el parásito además de evadir la

respuesta inmune, se multiplique dentro del fagolisosoma del macrófago infectado (Olivier, Gregory et al. 2005).

Hay múltiples vías por las cuales *Leishmania* spp. se aprovecha de la maquinaria de la célula hospedera con el fin de sobrevivir y replicarse. Estos mecanismos en general se caracterizan por alteraciones en los eventos de fosforilación y defosforilación de cascadas de quinasas y fosfatasa y pueden generar cambios en la expresión de genes involucrados en funciones inmunes, fisiológicas y por supuesto de señalización. La interferencia con la transducción de señales de los macrófagos es una de las estrategias de supervivencia más usada por los parásitos (Olivier, Gregory et al. 2005, Flannagan, Jaumouille et al. 2012, Ueno and Wilson 2012) así como la inducción de la producción de moléculas inmunosupresoras, como metabolitos del ácido araquidónico y citocinas: factor de crecimiento transformador β (TGF- β) e IL10, relacionados con el retardo en la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (Kumakiri, Oda et al.) y reducción de la actividad de las células *Natural Killer* (Scharton and Scott 1993, Stenger, Thuring et al. 1994, Kedzierski, Sakthianandeswaren et al.). Otro mecanismo empleado por *Leishmania* spp es la regulación del factor nuclear κ B (NF- κ B), importante para la expresión de genes asociados a la supresión de la apoptosis o la producción de citocinas pro-inflamatorias (Cameron, McGachy et al. 2004, Guizani-Tabbane, Ben-Aissa et al. 2004).

Lo descrito es solo una muestra de la capacidad de *Leishmania* de modular la respuesta del macrófago durante la infección, sin embargo, la interacción es mucho más compleja y abarca otros mecanismos no mencionados. Lo anterior sugiere la existencia de genes del macrófago necesarios para la supervivencia y replicación del parásito. Para determinar si un gen puede ser importante o no en el establecimiento de la infección, al interior del grupo se han desarrollado diferentes estrategias para evaluar funcionalmente un gen.

Evaluación funcional de genes de macrófagos infectados por Leishmania

Desde inicios de los años ochenta se ha utilizado el principio de recombinación homóloga para generar ratones knock-out (K.O) o Knock-in y evaluar el fenotipo causado por la ausencia o modificación de un gen específico (Galli-Taliadoros, Sedgwick et al. 1995). En el estudio de la leishmaniasis se encuentran numerosos reportes del uso de esta tecnología tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (macrófagos derivados de ratones Knock-out). Bruhn y colaboradores en un estudio *in vivo* generaron ratones K.O para los receptores X hepáticos alfa y beta (LXR α y LXR β) y se encontró que la eliminación de uno o los dos factores hacía más resistente a los ratones a la infección por *L. chagasi*, además los macrófagos derivados de estos ratones eliminaban más eficientemente los amastigotes y producían mayores cantidades de óxido nítrico (Bruhn, Marathe et al. 2010). En

otro estudio realizado por Ibraim y colaboradores usaron macrófagos derivados de ratones K.O para los receptores tipo *Toll*;TLR2y TLR4 lo que permitió determinar la importancia de la asociación de estos receptores con la producción de óxido nítrico y citocinas en macrófagos estimulados con lipofosfoglicano (LPG) proveniente de diferentes especies de *Leishmania* (Ibraim, de Assis et al. 2013). Son múltiples los ejemplos que se pueden referenciar en el estudio de la interacción macrófago-*Leishmania* con modelos K.O (Sato, Ahuja et al. 2000, Kulkarni, Barbi et al. 2011), especialmente por la especificidad que brinda la metodología. Sin embargo, los procedimientos para generar y mantener los ratones transgénicos son costosos, dispendiosos y requieren mucho trabajo experimental (Salahpour, Medvedev et al. 2007).

El knock-down genético mediado por RNA de interferencia, emerge como una estrategia más versátil y se ha demostrado que mediante esta técnica se pueden obtener fenotipos similares a los obtenidos por knock-out (Martin and Caplen 2007, Salahpour, Medvedev et al. 2007). Esta metodología se basa en el silenciamiento de genes a nivel post-transcripcional mediado por cadenas pequeñas de RNA que son total o parcialmente complementarias con el mRNA del gen de interés (Fire 1999, Elbashir, Harborth et al. 2001). En modelos *in vitro* el knock-down se puede conseguir mediante diferentes tipos de moléculas como *short hairpin RNA* (shRNA), micro RNA (*miRNA*) o *small interfering RNA* (siRNA).

Son pocos los trabajos en los que se utiliza RNA de interferencia en relación a los reportes de knock-out para el estudio de la leishmaniasis. Srivastav y colaboradores en el 2012 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 desubiquitinación. Los autores encontraron que al silenciar el gen se reducía la infección por *L. donovani* en ratones BALB/c (Srivastav, Kar et al. 2012). Este mismo grupo de investigadores en el 2014, utilizaron la misma estrategia de silenciamiento con shRNA dirigido contra el factor 3 asociado el receptor del factor de necrosis tumoral (*TNF receptor-associated factor 3*, TRAF3) en ratones infectados con *L. donovani* y encontraron una reducción en la infección posterior al silenciamiento (Gupta, Giri et al. 2014). Otro gen silenciado por shRNA en el contexto macrófago-*Leishmania major* ha sido la proteína fosfatasa dual específica 1 (*mkp-1*). Los investigadores reportaron que el silenciamiento del gen en ratones BALB/c resulta en reducción de la infección (Srivastava, Sudan et al. 2011). En cuanto a siRNAs, el silenciamiento de genes del macrófago ha sugerido la importancia funcional de los receptores tipo Toll (Flandin, Chano et al. 2006, Srivastav, Kar et al. 2012), receptores de quimiocinas (Dey, Majumder et al. 2008) y proteínas de la familia de receptores de anclaje al factor sensible a N- ethylmaleimida (SNARE) (Canton, Ndjamen et al. 2012) entre otros.

Dado que los experimentos de knock-out y Knock-down son laboriosos y costosos se han planteado estrategias de alto rendimiento para identificar genes que podrían ser importantes en la interacción macrófago-*Leishmania*. Desde la transcriptómica se ha evaluado el perfil de transcripción de genes del macrófago durante la infección mediante estudios de microarreglos y RNAseq. Gran parte de estos trabajos se han realizado en especies del subgénero *Leishmania* (Buates and Matlashewski 2001, Chaussabel, Semnani et al. 2003, Gregory, R. Sladek et al. 2008, Zhang, Kim et al. 2010), lo que contrasta con los escasos estudios realizados con especies del subgénero *Viannia* en donde solo hay un reporte para *L. (V.) panamensis* y no existe reporte para *L. (V.) braziliensis*, siendo estas especies las más frecuentes en nuestro país.

En un trabajo realizado en el Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta y la Universidad Nacional de Colombia se analizó por ensayos de microarreglos la expresión diferencial de genes entre macrófagos no infectados e infectados con *L. (V.) braziliensis* (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015). Producto de este análisis se identificaron 218 genes diferencialmente expresados, los cuales se consideran potencialmente importantes en la interacción hospedero-patógeno. Sin embargo, la evidencia de cambio en los niveles de mRNA requiere ser confirmada funcionalmente *in vitro* e *in vivo* antes de concluir el rol del gen en la infección. Entre los genes diferencialmente expresados se encuentra el gen RhoB el cual es objeto de estudio en este trabajo.

Evaluación funcional de genes en el macrófago en un modelo celular derivado de línea monocítica U937

Los cultivos primarios son el material ideal para el desarrollo de trabajos *in vitro*, sin embargo este modelo presenta dificultades como obtener grandes cantidades de tejido para alcanzar la cantidad de material necesario para los experimentos, más el costo que trae el mantenimiento de los cultivos en donde se incluye; matriz extracelular, factores de crecimiento, entre otros (Allen, Caviedes et al. 2005). La utilización de líneas celulares inmortalizadas permite superar las dificultades del cultivo primario ya que representan una fuente permanente de material biológico, son fáciles de manipular, de modificar genéticamente usando siRNA o vectores de expresión y con la cual pueden obtenerse resultados reproducibles (Elbashir, Harborth et al. 2001)

Se han utilizado diferentes modelos celulares para el estudio de la interacción macrófago-*Leishmania* spp., como macrófagos derivados de líneas humanas, murinas y caninas. Dentro de las líneas celulares humanas se reporta el uso de las células THP-1 y U937. La línea celular U937 es una línea de monocitos, derivada de linfoma histiocítico humano y ha sido ampliamente utilizada como modelo en estudios de interacción macrófago-*Leishmania*. Estudios previos han

demostrado que la línea tiene la capacidad de diferenciarse a macrófagos y que este proceso puede ser inducido por diferentes agentes tales como PMA y VitD3. Baek y colaboradores sugieren que el PMA es un agente inductor de la diferenciación que permite obtener macrófagos derivados de U937 más similares a los macrófagos primarios dado que mantienen marcadores específicos de macrófagos derivados de monocitos humanos (Baek, Haas et al. 2009). La línea celular U937 puede ser infectada *in vitro* por diferentes especies del parásito como: *L. (V.) chagasi* (Maia, Rolao et al. 2007), *L. (L.) major* (Arena, Capozza et al. 1997), *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* (Gamboa Marín and Delgado Murcia 2008) y *L. (V.) braziliensis* (Rey, Travi et al. 1990).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en un trabajo previo se validó un modelo celular derivado de células U937 y un sistema de silenciamiento mediado por shRNAs, capaz de detectar cambios en el fenotipo de infección como consecuencia del silenciamiento genético (Ovalle-Bracho, Londono-Barbosa et al. 2015). El objetivo del trabajo anterior fue caracterizar un modelo celular de macrófagos derivados de células U937 que permitiera identificar fenotipos de infección inducidos por silenciamiento genético con RNA de interferencia, en el contexto del macrófago infectado por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. El modelo fue estandarizado mediante el silenciamiento de un gen exógeno (*gfp*), un gen endógeno (*lmna*) y un gen expresado diferencialmente entre macrófagos infectados y no infectados (*gro-β*). El proceso de silenciamiento fue exitoso para los tres genes estudiados obteniendo reducción con respecto a las correspondientes líneas celulares control 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 el fenotipo de infección de los macrófagos en términos de carga parasitaria y porcentaje de macrófagos infectados como consecuencia del silenciamiento genético. Este modelo celular constituye así una plataforma de investigación para el estudio de interacciones parásito-hospedero y para la identificación de potenciales dianas terapéuticas.

Metabolismo del colesterol durante la infección por *Leishmania*

Los resultados previos del grupo de investigación sugieren la regulación transcripcional negativa de los genes involucrados en la síntesis del colesterol del macrófago infectado. El papel del colesterol durante la infección por *Leishmania* ha sido estudiado en diferentes trabajos.

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 (Pucadyil, Tewary et al. 2004, Goluszko and Nowicki 2005, Goldston, Powell et al. 2012).

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 (Osorio y Fortea, de La Llave et al. 2009, Rabhi, Rabhi et al. 2012).

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 (SREBPs). 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 (Peterson, Sengupta et al. 2011). Durante la infección por *L. (L.) major*, Jaramillo y colaboradores reportaron que la glicoproteína gp63 hidroliza a mTOR e inhibe la formación del complejo mTORC1. 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.

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* (Rub, Dey et al. 2009, Majumder, Dey et al. 2012). 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 (Osorio y Fortea, de La Llave et al. 2009, Rabhi, Rabhi et al. 2012).

RhoB (Ras Homolog Family Member B)

El gen *RhoB* es uno de los genes que el grupo de investigación identificó como diferencialmente expresado entre los macrófagos no infectados y los infectados por *L. (V.) braziliensis*. Este gen codifica para una proteína que hace parte de la superfamilia de pequeñas GTPasas relacionadas con la proteína Ras. *RhoB* forma un grupo con los genes *RhoA* y *RhoC* con los cuales comparte hasta un 86 % de similitud en su secuencia. Las proteínas Rho son codificadas por genes diferentes y tienen diferente función y localización celular, *RhoB* se encuentra principalmente expresada en endosomas tardíos y en la membrana plasmática (Wheeler and Ridley 2004).

Las GTPasas funcionan como *switchs* moleculares pasando de su estado activo (proteína unida a GTP) al estado inactivo (unida a GDP). El paso de su forma activa a inactiva es controlado de diferentes maneras: 1. Por el factor de intercambio de guanina (GEF) que cataliza la reacción de intercambio de GDP por GTP para activar el *switch* (Schmidt and Hall 2002); 2. Por la proteína activadora de GTPasas (GAPs) que estimula la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas para inactivar el *switch* (Bernards 2003) y 3. Por el inhibidor de disociación de guaninas (GDI) que bloquea la activación espontánea de la GTPasa (Olofsson 1999). En su forma activa, las GTPasas llevan a cabo su función regulatoria mediante una interacción específica con proteínas blanco llamadas efectores.

Se han descrito cerca de 50 efectores que interaccionan con las proteínas Rho, Ras y Cdc42 donde se incluyen cinasas serina/treonina, tirosin cinasas, cinasas de lípidos, lipasas, oxidasas y proteínas Scaffold, además se reporta que las GTPasas también podrían reclutar otros blancos a localizaciones celulares o complejos específicos (Jaffe and Hall 2005). Dado lo anterior no es de sorprender que a RhoB se relaciones con diferentes procesos como apoptosis, adhesión celular, tráfico de proteínas y cáncer (Etienne-Manneville and Hall 2002, Jaffe and Hall 2005, Vega and Ridley 2008, Karlsson, Pedersen et al. 2009).

Respecto a la función de las proteínas Rho en el contexto de la leishmaniasis, *RhoB* se reporta como sobre expresado en microarreglos realizados en macrófagos infectados con *L. donovani* respecto a macrófagos fagocitando perlas de látex (Gregory, R. Sladek et al. 2008). En este mismo trabajo se realizaron microarreglos de macrófagos infectados con *L. major* y no se encontró ningún cambio en la expresión de *RhoB*, esto podría sugerir un efecto especie específico de la modulación de la expresión del gen. En otro estudio se encontró que la proteína RhoA, que hace parte de la familia Rho, es necesaria para la fagocitosis de promastigotes de *L. donovani* opsonizados con suero (Lodge and Descoteaux 2005). Los autores señalan que los resultados se pueden relacionar con otros trabajos en donde se concluye que RhoA es requerida en eventos de fagocitosis mediada por el receptor CR3 bajo condiciones de opsonización.

En relación a otros patógenos intracelulares, se ha reportado que las GTPasas de la familia de IRG, proteínas cercanas a las GTPasas Rho, son necesarias para la eliminación de patógenos intracelulares como *Toxoplasma Gondii* (Liesefeld, Parvanova et al. 2011). Finalmente se ha descrito que la activación de RhoB y Cdc42 es necesaria para la fagocitosis de *Pneumocystes* por macrófagos alveolares humanos a través del receptor de manosa (Zhang, Zhu et al. 2005). Lo anterior podría relacionarse con la fagocitosis de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* que también utilizan este receptor para el ingreso al macrófago.

Regulación de la expresión del gen RhoB

La regulación de la expresión del gen RhoB es bastante compleja y se reporta que puede estar vinculada con la vía metabólica del mevalonato (Stamatakis, Cernuda-Morollon et al. 2002). Varios trabajos reportan que el tratamiento de diferentes líneas celulares con estatinas induce la sobre expresión de RhoB de una manera dependiente de la dosis y del tiempo (Stamatakis, Cernuda-Morollon et al. 2002) (Turner, Zhuang et al. 2008).

El mecanismo preciso por el cual la inhibición de HMGCR induce la sobre expresión de RhoB no ha sido completamente descrito. Sin embargo se reporta que la inhibición de las enzimas farnesiltransferasa y la geranyl-geranyl transferasa 1 genera disociación de la enzima histona deacetilasa 1 (HDCA1) y asociación de la enzima histona acetiltransferasa (HAT) con la posterior acetilación de la histona asociada al promotor de RhoB terminando en la sobre expresión del gen (Delarue, Adnane et al. 2007). Teniendo en cuenta lo anterior la inhibición de la enzima HMGCR por el tratamiento de las estatinas puede inducir la actividad transcripcional en el promotor de RhoB.

Por otra parte también se reporta que los niveles de proteína y del mRNA de RhoB se pueden incrementar bajo la estimulación por lipopolisacárido (LPS) en diferentes modelos de macrófagos derivados de ratón y que esta estimulación es dependiente del tiempo (Wang, Wang et al. 2013). De acuerdo a los resultados de Wang la sobre expresión de RhoB está relacionada con la respuesta inflamatoria del macrófago inducida por LPS teniendo en cuenta que la sobre expresión de RhoB generaba un aumento en TNF- α y óxido nítrico.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Teniendo en cuenta que:

- Los análisis de enriquecimiento funcional de los resultados de microarreglos 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 por *L. (V.) braziliensis*.
- Se reporta en la literatura una conexión entre la inhibición del metabolismo del colesterol y la sobre expresión del gen RhoB
- Se cuenta con resultados de análisis de la expresión diferencial de genes entre macrófagos infectados y no infectados que sugieren la modulación de la expresión del gen RhoB durante la infección con *L. (V.) braziliensis*.
- No se ha evaluado funcionalmente el gen RhoB en el contexto de la infección por *Leishmania*.

Se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué efecto tiene sobre el fenotipo de infección *in vitro*, el silenciamiento del gen *RhoB* en macrófagos infectados por *L. (V) braziliensis*?

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el efecto del silenciamiento del gen *RhoB* en el fenotipo de infección de macrófagos infectados por *L. (V) braziliensis*.

Objetivos específicos:

1. Determinar los niveles de expresión del gen *RhoB* en macrófagos derivados de células U937 no infectados e infectados con *Leishmania braziliensis*.
2. Silenciar el gen *RhoB* en células U937 mediante RNA de interferencia.
3. Evaluar el efecto del silenciamiento del gen *RhoB* en términos de carga parasitaria y porcentaje de macrófagos infectados.

6. METODOLOGÍA

6.1. 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), 10% FBS 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. Se cultivó a una concentración inicial de 1×10^6 parásitos

por mL en medio Schneider (Sigma-Aldrich S9895) complementado con 10% de FBS a 26 °C durante seis días hasta alcanzar la fase estacionaria.

6.2. Estrategia experimental para lograr el primer objetivo:

Se evaluó el efecto de la infección por *L. (V.) braziliensis* sobre la expresión del gen *RhoB* en macrófagos derivados células U937 a través del tiempo determinando los niveles de RNA mensajero del gen *RhoB* mediante RT-qPCR en macrófagos no infectados e infectados. Se utilizó la metodología estandarizada para la verificación de los niveles de expresión de un set de genes detectados como expresados diferencialmente en los ensayos de microarreglos. La metodología resumida se describe en la publicación de Ovalle y colaboradores de 2015 (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015).

Diseño y selección de *primers*

Con ayuda del programa *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), se diseñaron *primers* para los genes de referencia (*B2M*, *GNB2L1*). Para el gen *RhoB* (NM_004040), se seleccionaron *primers* de la base de datos *PrimerBank* de *Harvard* que alineaban únicamente con la secuencia del gen de interés (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Con ayuda del programa *Primer Oligo Analyzer 3.1* se verificó que no formaran estructuras secundarias. Se usó como primer forward la secuencia 5'- AGAGAGCTAGGCCGAGTCCA -3' y como primer reverse la secuencia 5'- GCGTTCTCTCGCTGCGCTT -3'. Para la amplificación de los genes de referencia *B2M* y *GNB2L1* se usaron los primer y las condiciones reportadas por Ovalle y colaboradores (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015).

RT- qPCR

- Extracción de ARN. Para evaluar por RT-qPCR la expresión del gen *RhoB* obtenida por ensayos de microarreglos (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015), se extrajo ARN a las 24, 48, 72, 96 y 120 h horas post-infección. Los macrófagos infectados y no infectados fueron lavados tres veces con PBS 1X, pH 7.4 estéril (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄ y 10,1mM Na₂HPO₄) y se trataron con 500 µL de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen 15596-018), siguiendo las instrucciones del fabricante. A la fase acuosa obtenida se adicionó un volumen equivalente de 70% de etanol. Esta solución se transfirió a una mini-columna de centrifugación del *kit RNeasy* (QIAGEN 74104) según las recomendaciones del fabricante para realizar la purificación y precipitación del ARN. La calidad y cantidad de las muestras de ARN fue evaluada mediante

el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

- Síntesis de ADNc. El ARN extraído de macrófagos no infectados e infectados con *L. (V.) braziliensis* se trató con DNAsa I (Invitrogen 18068-015) adicionando 1U de enzima por cada µg de ARN para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico. El ARN tratado se retro-transcribió empleando el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Life Technologies 4387406) según las instrucciones del fabricante. En cada experimento de retro-transcripción se empleó como control negativo ARN tratado con DNAsa pero sin adición de retro-transcriptasa para generar el control (NRT: non retro transcribed).

- RT-qPCR. Se seleccionaron como genes de referencia β-2microglobina (*B2M*) y la proteína de unión a guanina (*GNB2L1*) dado que su expresión entre macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis* y no infectados no varía de acuerdo a los resultados obtenidos por ensayos de microarreglos (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015). Las condiciones de amplificación de los genes de referencia fueron las reportadas. Para el gen RhoB se preparó la mezcla de reacción usando los primers a una concentración de 350 µM y una temperatura de anillamiento de 63 °C. Los ensayos de RT-qPCR se realizaron con el kit *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (BIO-RAD 172-5201) siguiendo las instrucciones del fabricante. El perfil térmico utilizado fue el siguiente: denaturación inicial por 3 minutos a 95°C seguida de 44 ciclos de 30 s a 95°C y 30 s a la temperatura de anillamiento específica para cada gen. Después del paso de amplificación se realizó una curva *melting* entre 65 y 95°C aumentando 1°C por ciclo. Los ensayos se realizaron en el termociclador CFX96™ *Real Time Detection System* de BIO-RAD.

Los valores de expresión se determinaron por el método $\Delta\Delta Cq$ (Livak and Schmittgen 2001) usando el módulo *Gene Expression* del software *CFX manager™* versión 3.0 (BIORAD). La expresión de genes fue normalizada con base en la expresión de los genes de referencia (*Relative expression normalization*; REN). Como condición control se tomó la de macrófagos no infectados con el fin de comparar los niveles de expresión relativa de los genes de los macrófagos no infectados respecto a los infectados con *L. (V.) braziliensis* (*Relative quantification*; RQ). Estos ensayos se realizaron por triplicado para tres réplicas biológicas de cada condición evaluada.

- Normalización de la expresión relativa (REN) por $\Delta\Delta Cq$

$$REN_{gen\ de\ interés} = \frac{RQ_{gen\ de\ interés}}{(RQ_{gen\ referencia\ 1} \times RQ_{gen\ referencia\ 2})^{\frac{1}{n_{genes\ de\ referencia}}}}$$

- Cuantificación relativa de la expresión (Girasol, Albuquerque et al.)

$$RQ_{gen} = (\% \text{ eficiencia} \times 0,01 + 1)^{Cq_{promedio\ (control)} - Cq_{promedio\ (tratamiento)}}$$

6.3. Estrategias experimentales para lograr el segundo objetivo:

Después de evaluar la expresión diferencial del gen *RhoB* en los macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis*, se procedió a generar diferentes líneas celulares con expresión constitutiva de shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB*. La metodología utilizada para alcanzar este objetivo fue la publicada por nuestro grupo de investigación en el trabajo en el que se estableció el modelo celular para realizar la evaluación funcional de genes (Ovalle-Bracho, Londono-Barbosa et al. 2015).

Diseño de shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB*

Los siRNAs dirigidos contra el gen *RhoB* se seleccionaron con base en los siguientes criterios: estar dirigidos contra regiones diferentes del gen, tener una longitud entre 19 a 25 bp, tener un porcentaje de G/C entre 35 a 55% y alinear únicamente con la secuencia del gen de interés.

Se seleccionaron 3 siRNAs para emplear en el proceso de silenciamiento del gen *RhoB*: un siRNA reportado en la literatura que fue empleado exitosamente en otros ensayos de silenciamiento del gen *RhoB* (Monferran, Skuli et al. 2008) y 2 diseñados de *novo* a partir de la secuencia de mRNA de *RhoB* reportada en la base de datos del NCBI y usada por el productor del microarreglo (NM_004040).

Dentro los siRNAs diseñados de *novo*, uno se realizó usando la herramienta *Block-iT RNAi Designer* de Invitrogen (rnaidesigner.invitrogen.com/) (shRNA-RhoB3) y otro se diseñó con la herramienta siSPOTR, de la Universidad de Iowa (<https://sispotr.icts.uiowa.edu>), que proporciona siRNAs con baja probabilidad de presentar efectos *off target* (shRNA-RhoBOff2).

Como control negativo se empleó un siRNA *scrambled* generado a través de la

herramienta *siRNA wizard* (<http://www.sirnazard.com>). La secuencia obtenida no tuvo ninguna homología de secuencia con otra del genoma humano, reportada en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y del European Bioinformatics Institute (EBI). La secuencia de este shRNA también fue evaluada con la herramienta siSPOTR y se encontró que tenía baja probabilidad de generar efectos off-target.

Para formar los shRNAs se usó la herramienta *Block-iT RNAi Designer*. Esta herramienta permite agregar el *loop* y los sitios de unión adecuados a las secuencias de siRNAs seleccionadas para facilitar su clonación dentro del vector de entrada de la tecnología utilizada: pENTR™/H1/TO del kit BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector. Las secuencias de los shRNAs generados contra el gen *RhoB* se relacionan en la tabla 1:

shRNA	Secuencia			
	Sitios de unión	Sentido	Loop	Antisentido
<i>Scrambled</i> Ctrl (-)	CACC	5'- GGCGCACCCGACGACGTAGGT - 3'	CGAA	5' - ACCTACGTCGTCGGGTGCGCC – 3'
shRNA-RhoB1	CACC	5'- GCCGTCTTCGAGAACTATGT -3'	CGAA	5'- ACATAGTTCTCGAAGACGG – 3'
shRNA-RhoB3	CACC	5'- GCCACACTTGACGCTGTAA -3'	CGAA	5'- TTACAGCGTACAAGTGTGG - 3'
shRNA-RhoBOff2	CACC	5'- CTCGTCATTTGCATACGACAA -3'	CGAA	5'- TTGTCGTATGCAAATGACGAG - 3'

Tabla 1. Secuencias de los shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB*. El shRNA-RhoB1 se encontraba reportado en la literatura por Monferran y colaboradores]; el shRNA-RhoB3 fue diseñado empleando la herramienta de invitrogen *RNAi Designer* y el shRNA-RhoBOff2 se diseñó empleando la herramienta siSPOTR, creada para diseñar shRNAs con baja probabilidad generar uniones inespecíficas (*Off targets*). El shRNA control negativo fue reportado en un trabajo previo del grupo (Ovalle-Bracho, Londono-Barbosa et al. 2015).

Generación de constructos

- Vector de entrada: se sintetizaron oligo-nucleótidos de cadena sencilla

conteniendo la secuencia de los shRNAs diseñados, éstos se hibridaron para crear hebras de doble cadena que fueron clonadas en el vector de entrada pENTR™/H1/TO del kit BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAi Entry Vector (Invitrogen K4920-00) mediante una reacción de ligación, siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias quimio-competentes *One Shot®* TOP10 *E. coli* (Invitrogen C404006). Las bacterias transformadas se sembraron en placas con LB agar (Invitrogen 22700-025) más 50 µg/mL kanamicina (Gibco11815-032) como antibiótico de selección y se incubaron toda la noche a 35 °C. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias diferentes, cada una de las cuales se inoculó en 3 mL de medio LB caldo con 50 µg/mL kanamicina para su cultivo durante toda la noche a 35 °C.

Se extrajo ADN plasmídico de las bacterias transformadas en LB caldo usando 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 se corroboraron por polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) usando la enzima BamHI-HF (New England BioLabs R3136S) y secuenciación por el método de Sanger.

- **RFLP:** se utilizó la enzima de restricción BamHI-HF (New England BioLabs R3136S) según las indicaciones del fabricante. El producto de la restricción se corrió en un gel de 1% de agarosa durante 120 minutos a 80 V y se visualizó empleando el equipo GelDoc RX de BIORAD.

El vector de entrada pENTR™/H1/TO tiene un tamaño de 3869 bp y posee dos sitios de restricción para la enzima BamHI: uno en la posición 1805 y otro en la 1978. La inserción de los shRNAs en el vector de entrada se comprobó observando un patrón de restricción de dos bandas: una con un tamaño de 3696 bp y otra de 220 bp. Si el plásmido se ligara sin incorporar las secuencias de los shRNAs, la segunda banda tendría un tamaño cercano a 170 pb.

- Secuenciación por el método de Sanger: para amplificar la muestra de ADN plasmídico se emplearon los *primers* universales M13 dirigidas contra regiones del esqueleto del plásmido pUC del vector de entrada. Para su secuenciación se usó el kit de secuenciación *Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing* (Life Technologies 4337455) y el equipo de secuenciación 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems), de acuerdo a la metodología empleada por la corporación CorpoGen. Con ayuda del programa *Geneious Pro* se visualizaron los resultados de la secuenciación (archivos AB1 y electroferogramas) y se confirmó la inserción de las secuencias de los shRNAs en el vector de entrada, cuyas secuencias no presentaron modificaciones respecto a las sintetizadas inicialmente.

- Vector de expresión: cada vector de expresión se generó realizando una reacción de recombinación (Gavicherla, Ritchey et al.) *Gateway*® entre el vector de entrada pENTR™/H1/TO conteniendo la secuencia que codifica para cada shRNA y el vector destino pLenti4/BLOCK-iT-DEST (Invitrogen K4925-00), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de la recombinación se empleó para transformar bacterias químico-competentes *OneShot*® *Stb13*™ (Invitrogen C737303). Las bacterias transformadas se sembraron en placas con LB agar (Invitrogen 22700-025) más 100 µg/mL ampicilina, como antibiótico de selección y se incubaron toda la noche a 35 °C. Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias diferentes, cada una de las cuales se inoculó en 3 mL de medio LB caldo con 100 µg/mL ampicilina para su cultivo durante toda la noche a 35 °C. Se extrajo ADN plasmídico de las bacterias transformadas en LB caldo usando el kit *Zyppy*™ *Plasmid Miniprep* (*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 secuenciando por el método de Sanger como se describió anteriormente.

Comprobada la generación del vector de expresión conteniendo los shRNAs, las colonias seleccionadas se amplificarán nuevamente en LB caldo para extracción de ADN plasmídico usando el *kit Hi Speed Plasmid Midi* (QIAGEN 12643) con el fin de obtener ADN de alta pureza para ser transfectado durante la producción de los lentivirus.

Generación de lentivirus y transducción de células U937

- Producción de vectores lentivirales conteniendo shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB* y conteniendo shRNA control negativo. Para la producción de lentivirus se utilizaron los constructos: pMD2.G (VSVg), p-Delta-8.74 (cordialmente cedidos por el Doctor David Ann (Chau, Clavijo et al. 2005) y el vector de expresión para cada shRNA, 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 60 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen® 11668019). Las células transfectadas fueron incubadas durante toda la noche en medio DMEM más 10% FBS, a 37°C y a una atmósfera de 5% CO₂.
- Recolección de virus. Se hizo una primera recolección a las 16 horas retirando el medio de cultivo de las células transfectadas y almacenándolo a 4°C. Se adicionó 10 mM de butirato de sodio (Sigma B5887) en medio de cultivo DMEM

complementado con 10 % FBS a las células en cultivo para estimular la producción de virus. Las demás recolecciones de lentivirus se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 h. Después de cada recolección se adicionó medio DMEM complementado con 10 % de FBS a las células en cultivo. Las suspensiones lentivirales se filtraron y concentraron utilizando una columna de concentración Amicon® Ultra-15 (Millipore, UFC903024) según las recomendaciones del fabricante.

- Titulación de virus. El título viral se determinó 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 632200)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Transducción de células U937. A cada población de 5×10^5 células en 1 mL de medio RPMI más 10% FBS se adicionaron 9 µg/mL Polybrene (Sigma H9268) y la cantidad necesaria de lentivirus, conteniendo los constructos codificantes para cada shRNA, para obtener la multiplicidad de infección deseada (MOI): 1, 5 ó 10 virus por célula. Para el cálculo del volumen de virus a utilizar se multiplicó el número de células a transducir por la MOI seleccionada y se dividió por el título viral expresado en Unidades infectivas /ml.

$$\frac{\# \text{ células a transducir} \times \text{MOI}}{\text{título viral}} = \text{volumen de virus}$$

Las células se incubaron durante toda la noche a 37° y 5% CO₂ y al día siguiente se les realizó cambio de medio. Las células transducidas se seleccionaron con 200 µg/mL de Zeocina (Invitrogen R25001) durante 8 días con cambio de medio cada 2 días y cuantificación diaria.

Evaluación del silenciamiento genético

- Extracción de proteínas: se indujo la diferenciación a macrófagos de $3,75 \times 10^6$ células U937 por mL y de las líneas celulares portando los constructos de silenciamiento dirigidos contra el gen *RhoB*, empleando 100 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e incubando por 120 h en cajas de Petri de vidrio matriz de vidrio. Los macrófagos obtenidos se lavaron 3 veces con PBS 1X, pH 7.4 estéril y se lisaron con *buffer* RIPA-Tritón (NaCl 0,25 M en Tris-HCl 0,050 M pH 8.0; 2% Tritón X-100 (w/v), 1% deoxicolato de sodio (w/v), 0.2% SDS (w/v) y 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Roche®, 11836170001). El lisado se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Se

recolectó la fracción soluble del lisado y se cuantificó por el método de Bradford (BIORAD, 5000006).

Como control positivo para la inmuno-detección de la proteína RhoB se usaron células HeLa y la extracción de proteínas se realizó de acuerdo al método mencionado previamente.

- SDS-PAGE. Se cargaron 50 µg de extracto de proteína total de cada línea celular a evaluar y se corrió una electroforesis vertical en un gel de 12% acrilamida/bisacrilamida durante 1h y 30 minutos a 100 V en *buffer* de electroforesis (25 mM tris, 200 mM glicina, 0,5% SDS).

Como control de carga se corrió un gel bajo las mismas condiciones mencionadas previamente, se fijó con una solución de 25% de isopropanol y 10% de ácido acético y se tiñó con 0,006% de azul de Coomassie durante 1h. Para eliminar el exceso de colorante se trató el gel coloreado empleando 10% de ácido acético y finalmente se adquirió una imagen del gel desteñido empleando el equipo GelDoc de BIORAD.

- Western blot. Las proteínas separadas durante la electroforesis en el gel de agarosa fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BIORAD, 162-0177), durante 1 hora y 45 minutos a 200 mA en *buffer* de transferencia (10 mM tris, 34 mM glicina, 10% metanol). Luego de la transferencia, la membrana se incubó con solución de bloqueo (TBS 1X; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 y 5% leche descremada (w/v)) durante 1 h con agitación constante. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario contra *RhoB* (Santa Cruz Biotechnology, sc-180) en una dilución de 1:200 a 4°C, durante toda la noche con agitación constante. La membrana se lavó tres veces con *buffer* Tween-Tris Salino 1X (TTBS 1X; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5 y 0.05% Tween 20 v/v), luego tres veces con TBS y se incubó con el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, sc-2054) en una dilución 1:3000, durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación constante. Se lavó la membrana de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y se reveló empleando el kit *Immun-Star HRP Substrate* (BIORAD, 170-5041) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron tres réplicas para cada línea celular evaluada. Como control de carga se usó la proteína LMNA inmuno-detectada con el anticuerpo primario sc-20681 (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology; sc-2054) en una dilución 1:3000, siguiendo las mismas indicaciones empleadas para la inmuno-detección de la proteína *RhoB*.

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 30 s durante 10 minutos para los extractos proteicos de *RhoB* y cada segundo durante 60 s para los medios condicionados concentrados.

Las imágenes se analizaron por densitometría con ayuda del programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para determinar la densidad relativa de las líneas celulares portando los constructos de silenciamiento respecto a la línea celular sin modificar. A cada uno de los carriles conteniendo la señal de la proteína de interés y del control de carga se le calculó el área integrada, definida como el área en pixeles donde se registra señal por encima del ruido de fondo. Con las áreas integradas se calculó la densidad relativa de los controles de carga:

$$\text{densidad relativa (control)} = \frac{\text{área control de carga } x}{\text{área control de carga } y}$$

Donde *y* es el mayor valor dentro de los controles de carga

El área integrada de la señal de la proteína de interés para cada línea celular se normalizó con el valor de densidad relativa del control de carga correspondiente.

$$\text{área normalizada (línea celular)} = \frac{\text{área de la línea celular } x}{\text{densidad relativa control de carga } x}$$

Una vez obtenidos los valores de área normalizados respecto al control de carga se calcularon los valores de densidad relativa respecto al valor de área normalizada de la línea de referencia.

$$\text{densidad relativa (línea celular } x) = \frac{\text{área normalizada línea celular } x}{\text{área normalizada línea de referencia}}$$

Ensayo de pull-down para detectar proteína RhoB activa (RhoB-GTP)

Para realizar este experimento se utilizó el kit RhoB Activation Assay Kit (Cell Biolabs, STA-403-B) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se indujo la diferenciación a macrófagos de $3,75 \times 10^6$ células U937 por mL y de las líneas celulares portando los constructos de silenciamiento dirigidos contra el gen *RhoB* y *Scrambled*, empleando 100 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e incubando por 120 h en cajas de Petri de vidrio matriz de vidrio. Los macrófagos obtenidos se lavaron 3 veces con PBS 1X, pH 7.4 estéril y se lisaron con *buffer* de lisis NP-40 (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM MgCl₂, 1

mM EDTA, 2% Glicerol) en presencia de inhibidor de proteasas (Roche®, 11836170001). El lisado se centrifugó a 14000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recolectó la fracción soluble del lisado y se procedió con el ensayo de pull-down. Se ajustó el volumen del lisado a 1 ml usando buffer de lisis y se adicionaron 40 µl de la solución de perlas de agarosa unidas a Rhotekina en cada tubo, esta mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C con agitación constante. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 14000 g durante 10 segundos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet de perlas de agarosa se resuspendió en 500 µl de buffer de lisis. Este procedimiento se repitió 3 veces para lavar el precipitado. Después de los lavados se eliminó todo el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 40 µl de buffer de carga SDS-PAGE 2x. Las muestras se hirvieron por 5 minutos y se procedió a realizar la SDS-PAGE, el *Western blot* y el análisis de los resultados siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior.

6.4. Estrategia experimental para lograr el tercer objetivo:

Una vez evaluado el silenciamiento del gen RhoB, se determinó el efecto de esta intervención sobre el fenotipo de infección definido en términos de carga parasitaria y porcentaje de infección. Los rasgos generales de la metodología estandarizada para alcanzar este objetivo fueron publicados en 2015, incluyendo el protocolo semi-automatizada para la determinación del porcentaje de infección y la carga parasitaria utilizando el programa CellProfiler (Ovalle-Bracho, Londono-Barbosa et al. 2015).

- Infección *in vitro*. Se diferenciaron células U937 a macrófagos con 100 ng/mL de PMA durante 120 h en placas de 24 pozos. A las placas conteniendo los macrófagos obtenidos se les retiró el medio y se les adicionó una suspensión de 15 promastigotes de *L. (V.) braziliensis* por macrófago, previamente opsonizados con suero humano AB+. Los macrófagos infectados se incubaron durante dos horas a 34 °C y se lavaron tres veces con PBS 1X, pH 7.4, precalentado a 34°C, para remover los parásitos no adheridos; se les agregó medio RPMI más 10% de FBS y se incubaron a 34 °C y 5% de CO₂ por 72 horas.
- Tinción fluorescente y adquisición de imágenes. A las 72 h pos-infección, los macrófagos no infectados e infectados con *L. (V.) braziliensis* se lavaron con PBS 1X, pH 7.4, precalentado a 37°C y se fijaron 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 para luego permeabilizar las células con 0,2% de saponina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los macrófagos infectados 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 colorear las membranas celulares. Transcurrido este tiempo se adicionaron 1,25 µg/mL del marcador de ADN Hoechst 33258 (*Molecular Probes® H3569*) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los macrófagos coloreados se observaron con el microscopio de fluorescencia *Leica DMI3000B* a una magnificación de 1000 aumentos. Para cada línea celular evaluada se tomaron fotografías de 270 campos para cada uno de los fluorocromos utilizados (DiD, Hoechst), empleando el programa *Leica application suite core® (LAS core)*, acoplado al microscopio de fluorescencia *Leica DMI3000B*.

- Evaluación de carga parasitaria y porcentaje de infección. Se determinó el tamaño de muestra requerido para evaluar carga parasitaria y porcentaje de infección, por medio de la prueba de cambio de Frison y Pocock con medidas repetidas. El tamaño de muestra determinado fue de 125 macrófagos entre infectados y no infectados.

Con el programa *CellProfiler®* se estandarizó un protocolo para identificar macrófagos y amastigotes en las imágenes adquiridas para cada línea celular (Tabla 2). Con el número de macrófagos y de amastigotes se calculó la carga parasitaria y el porcentaje de infección. La carga parasitaria se definió como el número de parásitos por macrófago infectado y el porcentaje de infección se calculó como el número de macrófagos infectados entre la totalidad de macrófagos evaluadas.

Número	Módulo	Función
1	<i>Load images</i>	Carga las imágenes
2	<i>Color to gray (red)</i>	Transforma la imagen, de la tinción de membranas, de color a escala de grises
3	<i>Color to gray (Satoska r, Bluethmann et al.)</i>	Transforma la imagen, de la tinción ADN, de color a escala de Grises
4	<i>Identify primary Objects</i>	Identifica los macrófagos por área (entre 100 a 400 píxeles) y por intensidad de señal (entre 0,1 a 1), empleando el algoritmo de fragmentación <i>Otsu per object</i> .
5	<i>Enhance and suppress features</i>	Aumenta el contraste entre de los objetos y sustrae el ruido de fondo para facilitar la identificación de los amastigotes. Se configuró para aumentar el contraste de los objetos con un área aproximada de 20 píxeles, resaltando los núcleos y los cinetoplastos de los amastigotes para observarlos con mayor Definición
6	<i>Mask images</i>	Superpone las dos imágenes (coloración de membranas y de núcleos) con el fin de confirmar que los amastigotes identificados se encuentren dentro del área que ocupan los macrófagos y de descartar artefactos que se hallen por fuera.
7	<i>Identify primary objects</i>	Identifica los amastigotes tomando en cuenta el área en conjunto del núcleo y el cinetoplastos de cada parásito (entre 7,3 a 15,9 píxeles) y la intensidad de señal (entre 0,052 a 1), empleando el algoritmo de fragmentación <i>Robust background per object</i> .
8	<i>Relate objects</i>	Relaciona cada amastigote con su célula hospedera para facilitar el conteo de parásitos por macrófago.
9	<i>Display data on image</i>	Cuantifica el número de amastigotes por cada macrófago
10	<i>Export data to a spread sheet</i>	Exporta la base de datos generada a una hoja de Excel.

Tabla 2. Protocolo diseñado con el programa CellProfiler® para el análisis de las imágenes de macrófagos infectados con *L. (V) braziliensis*. En este protocolo se menciona cada módulo y su función. Adaptado de Ovalle y colaboradores 2015.

6.5. Análisis estadístico

- Densidades relativas de las señales obtenidas por Western blot. Se calculó la media geométrica de las densidades relativas, normalizadas con el control de carga, de las tres réplicas de las líneas evaluadas. Para cuantificar las diferencias entre las señales obtenidas, 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 existen diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de infección entre las líneas celulares evaluadas se aplicó la prueba de X^2 ; para establecer si hay 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. ¿Cuáles son los niveles de expresión del gen RhoB durante la infección de macrófagos derivados de U937 infectados por *L. (V.) braziliensis*?

A partir de los resultados de microarreglos se encontró que el gen RhoB se hallaba sobre expresado en macrófagos infectados durante 72 horas con parásitos de *L. (V.) braziliensis*. Considerando que el ensayo de microarreglos es una prueba de tamización, la sobre expresión de este gen podría tratarse de un falso positivo del experimento que incluyó la evaluación de más de 12.000 genes. Para confirmar los resultados de expresión del gen RhoB se realizaron mediciones de la expresión de este gen mediante PCR en tiempo real. En primer lugar se evaluó la expresión a las 72 horas después de la infección de los macrófagos, tiempo en el cual se realizaron los ensayos de microarreglos y que corresponde con el aumento de la carga parasitaria *in vitro*. El experimento de RT-qPCR validó los resultados de microarreglos teniendo en cuenta que el gen RhoB se encontraba sobre-expresado a las 72 horas después de la infección, aunque se observa una diferencia en la tasa de cambio de la expresión del gen medida por las dos técnicas (Figura 2A). Este resultado sirvió como antecedente para realizar un análisis más extensivo de la expresión del gen RhoB durante la infección, ya que como se observa en la figura 1C la carga parasitaria *in vitro* cambia a través del

tiempo y si la expresión de RhoB en el macrófago se relaciona con la infección también podría esperarse cambio en el tiempo.

La cinética de expresión del gen RhoB durante la infección (Figura 1B) muestra que este gen no presenta cambio entre las 0 y las 24 horas después de la infección, sin embargo el gen se sobre-expresa entre las 48 y 96 horas. El mayor nivel de sobre expresión se registró a las 48 horas, posteriormente la tasa de cambio fue reduciendo hasta las 96 horas. Después de este tiempo la expresión del gen RhoB en los macrófagos no infectados es muy cercana a la de los macrófagos infectados y se alcanza a registrar como regulada negativamente cerca a las 120 horas después de la infección.

Al comparar los resultados de expresión del gen RhoB con la cinética de la infección *in vitro* se puede observar que el lapso en el que el gen RhoB permanece sobre expresado coincide con el intervalo en el que aumenta la carga parasitaria (Figura 2C). Este resultado sugiere que el gen RhoB podría ser importante para el establecimiento de la infección *in vitro* de *L. (V.) braziliensis*, con base en este resultado se continuó con la generación de una línea celular derivada de U937 con silenciamiento constitutivo del gen RhoB para evaluar la participación de este gen en la infección *in vitro* por *L. (V.) braziliensis*.

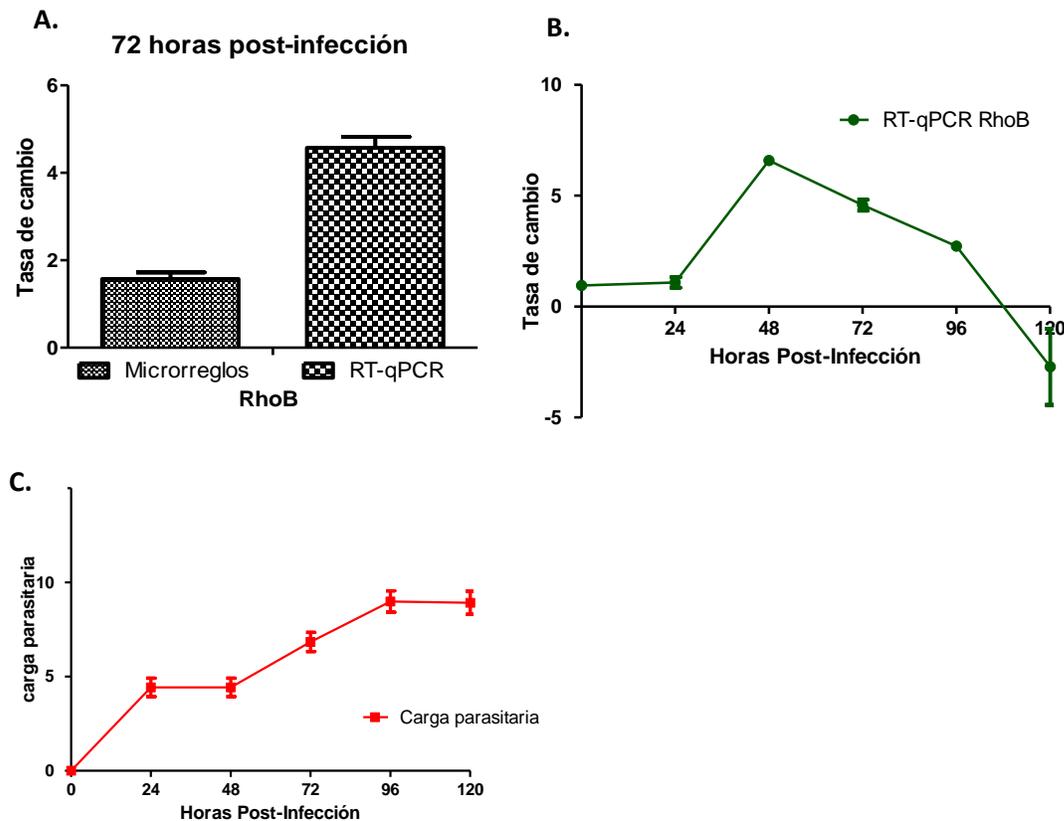


Figura 2. ¿Cuáles son los niveles de expresión del gen RhoB durante la infección de macrófagos derivados de U937 infectados por *L. (V.) braziliensis*? Fue analizada la cinética de expresión de gen RhoB en diferentes momentos en el tiempo. **A).** Comparación de la tasa de cambio para el gen RhoB en los macrófagos infectados durante 72 horas medida por microarreglos y por qPCR. **B).** Evaluación de los niveles de expresión del gen RhoB en macrófagos infectados en diferentes momentos después de la infección. **C).** Carga parasitaria de los macrófagos infectados medida en diferentes momentos después de la infección.

7.2. ¿Cuál shRNA genera mayor reducción de los niveles de expresión de RhoB a la menor multiplicidad de infección (MOI)?

Con el fin de evaluar si el gen RhoB puede ser importante en el proceso de infección *in vitro* por *L. (V.) braziliensis*, se generaron diferentes líneas celulares derivadas de las células U937 mediante transducción lentiviral para la expresión de shRNAs dirigidos contra RhoB. El silenciamiento del gen RhoB se realizó utilizando la metodología publicada por el grupo para la evaluación funcional del silenciamiento genético en macrófagos derivados de U937 usando shRNAs en un modelo de macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis* (Ovalle-Bracho, Londono-Barbosa et al. 2015). Fueron realizadas algunas modificaciones sobre el modelo planteado para reducir la posibilidad de efectos off-target del

silenciamiento, esto incluyó: diferentes fuentes de shRNAs, transducción lentiviral a bajos MOI y transducción de un solo tipo de shRNA por línea celular. Estas modificaciones se realizaron con el objetivo de seleccionar la línea celular que como consecuencia de la expresión de un shRNA presentara la mayor reducción de los niveles de la proteína RhoB utilizando el MOI más bajo.

Como resultado de la evaluación de silenciamiento se observa que la línea celular U937/shRNA-*Scrambled* presenta cierto grado de reducción de los niveles de la proteína *RhoB* en los diferentes MOI utilizados (Figura 3), sin embargo, el silenciamiento genético empleando los shRNAs específicos para *RhoB* presentan un mayor nivel de reducción que el observado en el control negativo. De los tres shRNAs ensayados el que mayor silenciamiento generó fue el shRNA-*RhoB*-3, usando un MOI de 1 (70,9%), sin embargo, los demás MOI empleados para la transducción de los constructos portando la secuencia que codifica para los shRNA tienen un silenciamiento cercano al 50%. Las líneas transducidas con el shRNA-*RhoB*-1, empleando una multiplicidad de infección de 1 y 5 virus por célula (69.7 % y 52,15% respectivamente) tabla 3. La línea celular U937/shRNA-RhoB-off-2 no presentó una reducción significativa de los niveles de la proteína RhoB sugiriendo que el shRNA utilizado no tuvo la potencia necesaria.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió continuar con las líneas celulares U937/shRNA-RhoB-1 y U937/shRNA-RhoB-3 generadas utilizando una MOI de 1 para continuar con el experimento de evaluación del efecto del silenciamiento sobre el fenotipo de infección. Como línea celular control negativo se seleccionó la línea U937/shRNA-scrambled transducida a una MOI 10 con el fin de tener un control con múltiples copias del vector para la expresión de shRNA y detectar de esta manera las alteraciones generadas por la alteración de la homeostasis celular.

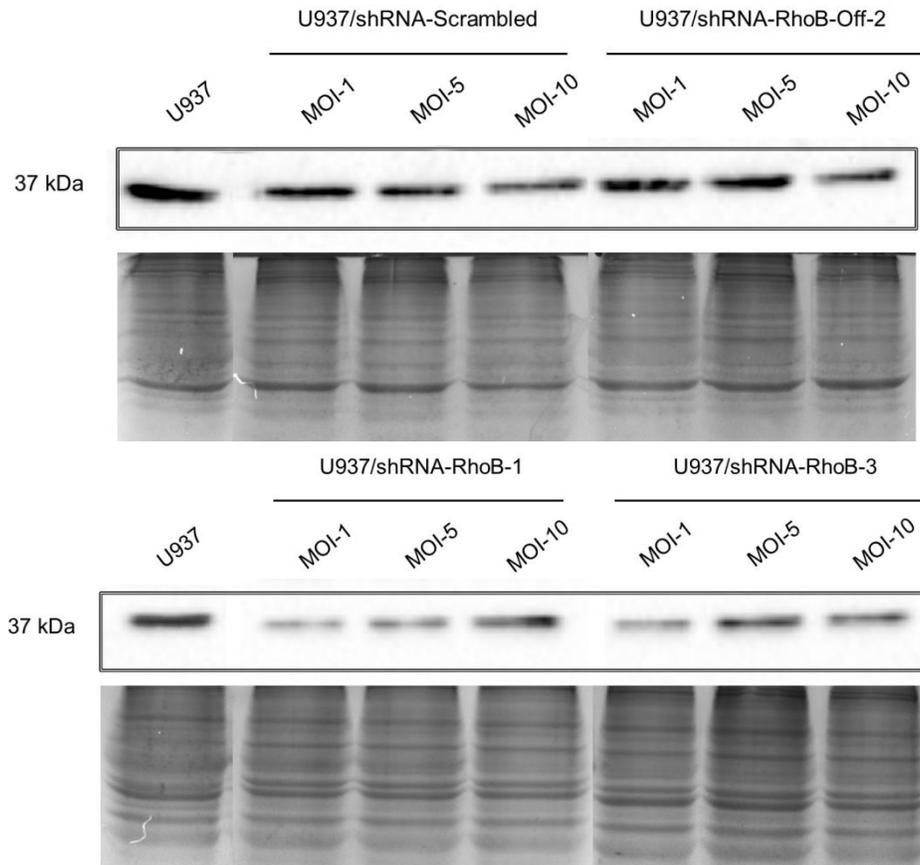


Figura 3. ¿Cuál shRNA genera mayor reducción de los niveles de expresión de RhoB a la menor multiplicidad de infección (MOI)? Inmuno-detección de los niveles de la proteína RhoB en macrófagos derivados de las líneas celulares transducidas con constructos conteniendo shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB* y de la línea U937. Panel superior: señal obtenida para los extractos proteicos de las líneas U937/shRNA-Scrambled y U937/shRNA-RhoB-Off-2; panel superior: señal obtenida para los extractos proteicos de las líneas U937/shRNA-RhoB-1 y U937/shRNA-RhoB-3. Se muestra el gel de poliacrilamida, teñido con azul de *Coomassie*, como control de carga.

	Línea celular	MOI-1		MOI-5		MOI-10	
		% silenciamiento	SD	% silenciamiento	SD	% silenciamiento	SD
RhoB	<i>Scrambled</i>	26.89	0,15	18.36	0,21	12.9	0,14
	U937/shRNA- <i>Off-2</i>	17,49	0,27	18,64	0,85	45,72	0,88
	U937/shRNA- <i>RhoB-1</i>	69.70	0,70	52,15	0,28	33,70	0,78
	U937/shRNA- <i>RhoB-3</i>	70.90	0,18	54,77	0,25	51,11	0,45

Línea celular Seleccionada	Porcentaje de silenciamiento	MOI
U937/shRNA-Rhob-1	69,7%	1
U937/shRNA-Rhob-3	70,9%	1
U937/shRNA- <i>scrambled</i>	12,9%	10

Tabla 3. Niveles de silenciamiento de las líneas celulares transducidas con vectores lentivirales portando constructos para la expresión de shRNAs dirigidos contra los genes *RhoB* shRNAs control negativo (*scrambled*), que no está dirigidos contra ninguna secuencia del transcriptoma humano.

7.3. ¿Cuáles son los niveles de proteína RhoB activada en una línea celular modificada por transducción lentiviral para la expresión de un shRNA dirigido contra RhoB?

En la sección anterior se demostró que con el silenciamiento genético mediado por shRNA se podía reducir la cantidad de proteína RhoB en 70 %, sin embargo con estos resultados no es posible afirmar que el silenciamiento haya afectado la función de RhoB en el macrófago. Con el objetivo de cuantificar la actividad de la proteína RhoB en las líneas celulares con expresión de los shRNAs se realizó un ensayo de pulldown para aislar la proteína RhoB activada a partir de un lisado total de proteínas. La función de RhoB como una GTPasa es pasar de su estado activo (unido a GTP) a sus estado inactivo (Unido a GDP), como se mencionó en el marco teórico. La técnica de pull-down consistió en utilizar perlas de agarosa unidas a Roketina, una proteína efectora que interactúa específicamente con RhoB-GTP. Estas perlas permitían precipitar solo la proteína RhoB activada a partir de los extractos de proteína total para posteriormente ser visualizada y cuantificada por western blot.

Como se observa en la figura 4, las células modificadas mediante transducción lentiviral para la expresión de un shRNA dirigido contra RhoB presentan una disminución significativa de la cantidad de proteína RhoB activada (cerca del 70 %). Lo anterior sugiere que como consecuencia del silenciamiento, no solo se redujo la cantidad de proteína sino que también se afectó la disponibilidad de proteína funcional en la célula modificada.

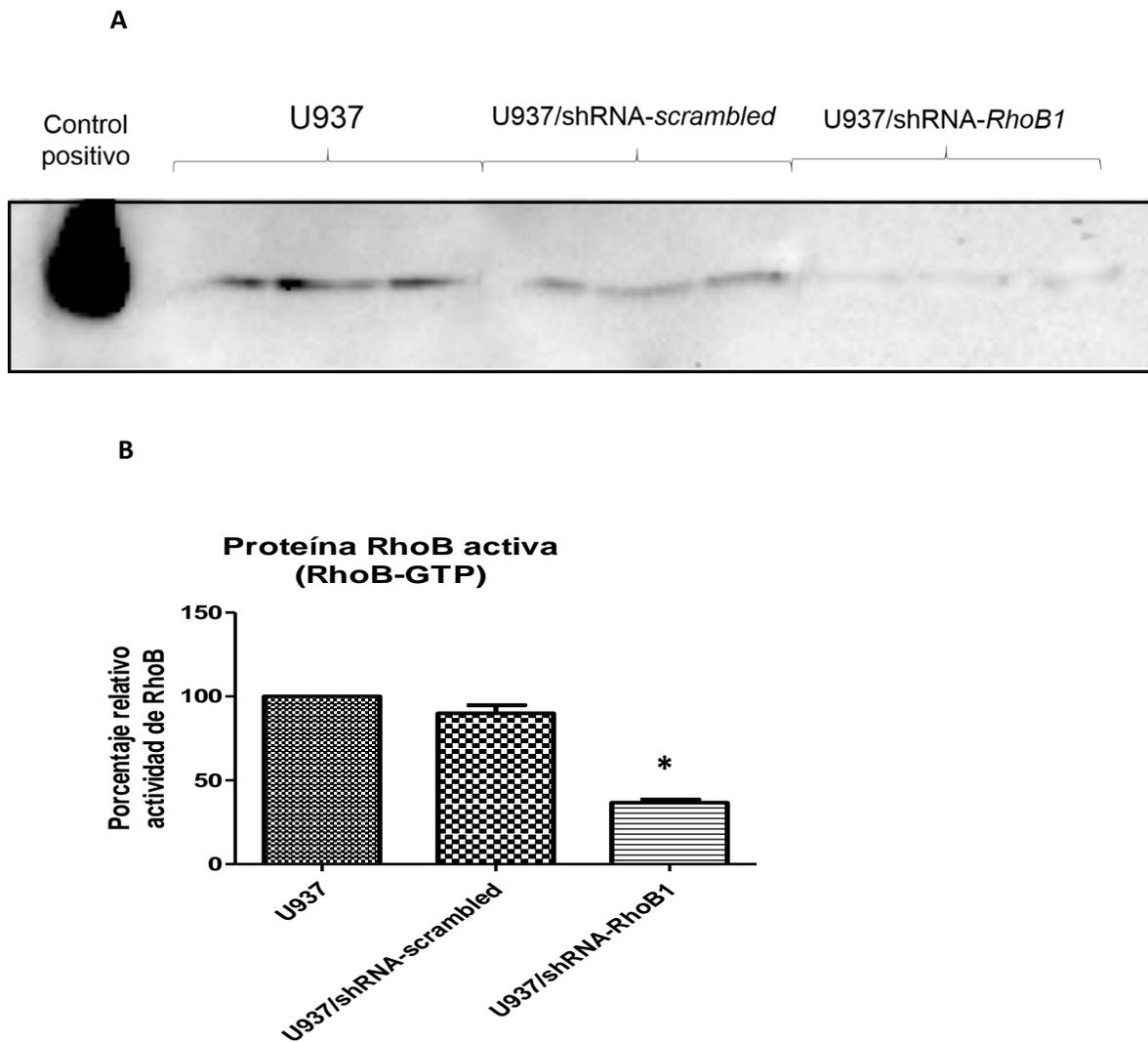


Figura 4. ¿Cuáles son los niveles de proteína RhoB activada en una línea celular modificada por transducción lentiviral para la expresión de un shRNA dirigido contra RhoB? Se realizó un ensayo de pull-down para aislar la proteína RhoB activada (RhoB-GTP) a partir de un extracto de proteína total de células U937, U937/shRNA-Scrambled y U937/shRNA-RhoB1. **A).** Inmuno-detección de la proteína RhoB-GTP aislada mediante el ensayo de pull-down. **B).** Resultados de los análisis densitométricos de las bandas de proteína en el western blot. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. * $p < 0.05$

7.4. ¿Cuál es el efecto del silenciamiento genético mediado por shRNAs del gen RhoB sobre el porcentaje de infección y la carga parasitaria de macrófagos derivados de U937 infectados por *L. (V.) braziliensis*?

Teniendo en cuenta los resultados de las secciones anteriores en donde se describe un posible papel de RhoB en el establecimiento de la infección *in vitro* y en donde se logró generar una línea celular con reducción de los niveles RhoB funcional por expresión constitutiva de shRNAs, se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento de RhoB sobre el fenotipo de infección de macrófagos derivados de las líneas celulares U937 modificadas mediante transducción lentiviral. El fenotipo de infección está definido en términos de porcentaje de infección y carga parasitaria. Como control de los experimentos se utilizaron células U937 sin transducir y células transducidas con un shRNAs *scrambled* como control negativo del proceso de transducción lentiviral.

Mediante el análisis del porcentaje de infección usando la prueba de χ^2 se encontró asociación entre el tipo de línea celular y porcentaje de macrófagos infectados ($p=0,000$). Las líneas celulares expresando los shRNAs RhoB-1 y RhoB-3 presentan un porcentaje de infección inferior al registrado para la línea parental U937 y para la línea control negativo expresando el shRNA *scrambled* (figura 5A y B).

Carga parasitaria				
Línea celular	Promedio	Error estándar de la media (SEM)	IC 95 %	
U937	2,83	0,232	2,37	3,29
U937/shRNA-Scrambled-MOI 10	3,71	0,336	3,05	4,37
U937/shRNA-RhoB-1	1,12	0,086	0,95	1,29
U937/shRNA-RhoB-3	1,07	0,116	0,84	1,30
Porcentaje de infección				
Línea celular	Promedio	Error estándar de la media (SEM)	IC 95 %	
U937	52,84	1,79	49,32	56,35
U937/shRNA-Scrambled-MOI 10	51,47	2,89	45,84	57,09
U937/shRNA-RhoB-1	39,83	1,83	36,24	43,42
U937/shRNA-RhoB-3	43,04	3,22	36,69	49,39

Tabla 4. Porcentaje de infección y carga parasitaria calculados para cada una de las líneas celulares transducidas y evaluadas funcionalmente, portando constructos para la expresión de shRNAs dirigidos contra el *gen RhoB* y los controles negativos. Se muestran los valores promedio, el error estándar de la media y los intervalos de confianza.

En cuanto a la carga parasitaria, mediante la prueba de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las diferentes líneas celulares. Por medio de la prueba pos-hoc de comparaciones múltiples de Dunn

se determinó que las diferencias estadísticas se presentan entre las líneas celulares expresando los shRNAs RhoB-1 y RhoB-3 respecto a la línea parental U937. Estas líneas presentaron una menor carga parasitaria sugiriendo que el silenciamiento de los genes *RhoB* puede generar una alteración del fenotipo de infección. La línea control negativo no mostró diferencias estadísticas en su carga parasitaria cuando se comparó con la línea parental.

Los resultados sugieren que el gen *RhoB* podría ser importante en el proceso de establecimiento de la infección en tanto la reducción de los niveles de proteína funcional se puede asociar con una reducción significativa de la carga parasitaria y el porcentaje de infección.

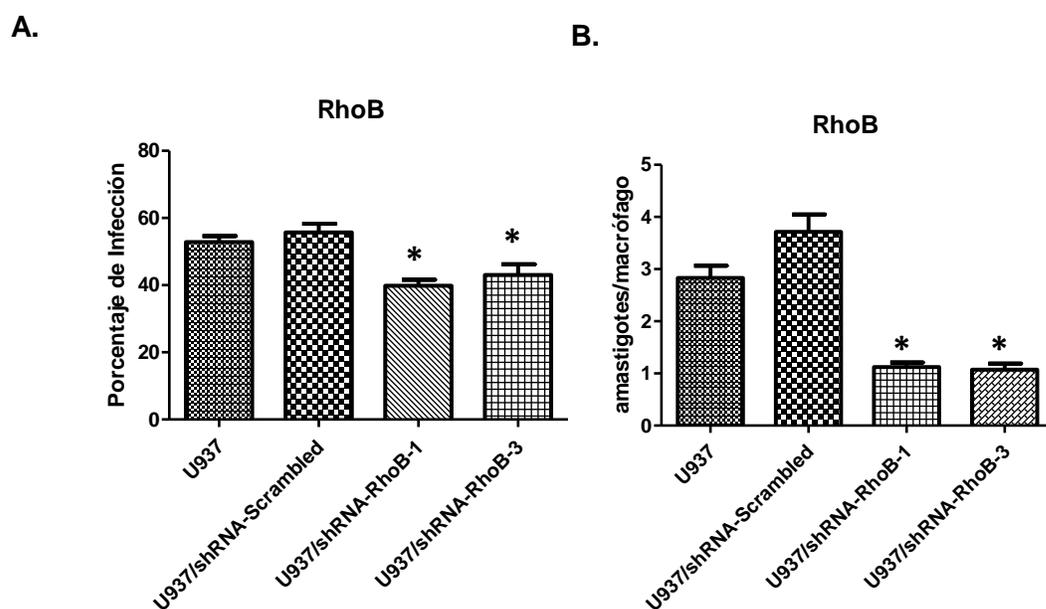


Figura 5. ¿Cuál es el efecto del silenciamiento genético mediado por shRNAs del gen *RhoB* sobre el porcentaje de infección y la carga parasitaria de macrófagos derivados de U937 infectados por *L. (V.) braziliensis*? La determinación del porcentaje de infección y la carga parasitaria fue realizada mediante el análisis de fotografías de fluorescencia y el programa *CellProfiler*. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. A. Porcentaje de infección de las líneas expresando shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB*. B. Carga parasitaria de las líneas expresando shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB*. * $p < 0.05$

8. DISCUSIÓN

Este trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto del silenciamiento del gen *RhoB* en el fenotipo de infección de macrófagos infectados por *L. (V) braziliensis*. Para realizar esto se evaluó en primer lugar la dinámica de expresión del gen *RhoB* durante la infección *in vitro* de macrófagos derivados de U937 con *L. (V.) braziliensis* para confirmar los resultados obtenidos con el ensayo previo de microarreglos. Después de haber confirmado estos resultados, se procedió a generar una línea celular con expresión de un shRNA que generara reducción de los niveles de proteína *RhoB* y finalmente evaluar si esta modificación tenía algún efecto sobre el fenotipo de infección medido como porcentaje de infección y carga parasitaria.

8.1. Cinética de expresión del gen *RhoB* durante la infección *in vitro*

Respecto a la dinámica de expresión del gen durante la infección, en primer lugar, se registra que a las 24 horas después de la infección no hay diferencias en la expresión de este gen entre los macrófagos no infectados y los infectados por *L. (V.) braziliensis*. Este resultado es coherente con varios reportes realizados sobre la interacción macrófago-*Leishmania* utilizando ensayos de microarreglos ya que en la mayoría de ellos se realiza el experimento dentro de las primeras 24 horas después de la infección y no se reporta alteración en la expresión *RhoB* (Chaussabel, Semnani et al. 2003, Zhang, Kim et al. 2010, Ramirez, Diaz-Toro et al. 2012). De los trabajos de microarreglos revisados, solo en uno se reporta la sobre expresión del gen *RhoB* como consecuencia de la infección por alguna especie de *Leishmania*. Gregory y colaboradores reportaron el gen *RhoB* como sobre expresados en macrófagos infectados con *L. (L.) donovani*, en este mismo trabajo no se registra ningún cambio en este gen por la infección con *L. (L.) major*, ni por la fagocitosis de perlas de látex (Gregory, R. Sladek et al. 2008). Lo anterior podría sugerir que la modulación de este gen durante la infección podría variar dependiendo de la especie infectante.

Teniendo en cuenta que el gen *RhoB* no se modula en las primeras 24 horas de la infección *in vitro* se podría sugerir que *RhoB* no está implicado en las fases iniciales de la interacción macrófago-*Leishmania* como el reconocimiento del parásito y la fagocitosis. Esta hipótesis es respaldada por los resultados de Gregory y colaboradores ya que reportaron que la fagocitosis de perlas de látex no altera la expresión del gen. Sin embargo, existen reportes que contradicen esta propuesta, aunque en el contexto de otros microorganismos. Se ha descrito que la activación de *RhoB* y *Cdc42* es necesaria para la fagocitosis de *Pneumocystes* por macrófagos alveolares humanos a través del receptor de manosa (Zhang et. Al

2005) y se conoce que este receptor está implicado en la fagocitosis de *Leishmania* (Akilov, Kasuboski et al. 2007).

A las 48 horas después de la infección se registra que el gen RhoB se encuentra sobre expresado (Figura 2B). Esta regulación se mantiene hasta las 96 horas aunque con menor intensidad en cada tiempo medido. Teniendo en cuenta que el gen RhoB no presenta cambios en el tiempo inicial de la infección, pero si está sobre-expresado después de 48 horas, se podría sugerir que la modulación de la expresión de RhoB podría ser la consecuencia del establecimiento de la infección en el macrófago. Teniendo en cuenta los mecanismos descritos que regulan la expresión del gen RhoB se puede sugerir una hipótesis que podría explicar los resultados encontrados.

La regulación de la expresión del gen RhoB es bastante compleja y que está relacionada con la vía metabólica del mevalonato (Stamatakis, Cernuda-Morollon et al. 2002). Varios trabajos reportan que el tratamiento de diferentes líneas celulares con estatinas induce la sobre expresión de RhoB de una manera dependiente de la dosis y del tiempo (Stamatakis, Cernuda-Morollon et al. 2002) (Turner, Zhuang et al. 2008). Las estatinas son una familia de medicamentos utilizados para el tratamiento de la hipercolesterolemia (Stamatakis, Cernuda-Morollon et al. 2002). El mecanismo de acción de estos medicamentos es la inhibición por competencia de la enzima Hidroximetil-gutaril coenzima A reductasa (HMGCR), la enzima que cataliza el paso limitante de biosíntesis de colesterol, la reducción de la HMG-CoA a mevalonato (Turner, Zhuang et al. 2008).

De acuerdo a los resultados publicados por nuestro grupo de investigación, en los macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis* también se registra inhibición de la biosíntesis del colesterol, en este caso, inhibición transcripcional de diferentes enzimas de la vía como la HMGCR (Ovalle-Bracho, Franco-Munoz et al. 2015). La inhibición de esta enzima y otros genes relacionados con el metabolismo del colesterol se ha reportado en otros estudios realizados en macrófagos infectados por *Leishmania spp.* (Rub, Dey et al. 2009, Majumder, Dey et al. 2012, Ghosh, Bose et al. 2013, Lemaire, Mkannez et al. 2013). Existen dos modelos que pueden explicar la regulación negativa de esta vía metabólica. El primero sería el sugerido por nosotros en 2015, en donde el factor de virulencia GP63 hidroliza mTOR e inhibe la fosforilación de la proteína Lipin1, esta proteína no fosforilada migra al núcleo e inhibe la actividad del factor de transcripción SREBP, inhibiendo a su vez y de manera generalizada la transcripción de diferentes enzimas del metabolismo de colesterol.

Otro modelo que puede explicar la regulación negativa del colesterol en macrófagos infectados es el propuesto por los estudios de Lemaire 2013 y Ghosh 2013 en donde sugieren que GP63 puede alterar el procesamiento de los miRNA

mir-122 y mir-220 mediado por la proteína Dicer1, estando estos dos miRNA relacionados con el control de la expresión de genes relacionados con la vía metabólica del colesterol (Ghosh, Bose et al. 2013, Lemaire, Mkannez et al. 2013).

En conclusión, existe suficiente evidencia que sugiere que el factor de virulencia GP63 de *Leishmania* podría recapitular el efecto de las estatinas en una célula infectada inhibiendo enzimas como HMGCR a nivel transcripcional y posiblemente generando sobre-expresión del gen RhoB como ha sido descrito en la literatura.

El mecanismo preciso por el cual la inhibición de HMGCR induce la sobre expresión de RhoB no ha sido completamente descrito. Sin embargo se reporta que la inhibición de las enzimas farnesiltransferasa y la genaril-genaril transferasa 1 genera disociación de la enzima histona deacetilasa 1 (HDCA1) y asociación de la enzima histona acetiltransferasa (HAT) con la posterior acetilación de la histona asociada al promotor de RhoB terminando en la sobre expresión del gen (Delarue, Adnane et al. 2007). Esto podría explicar lo que sucede en los macrófagos infectados con inhibición de la síntesis de colesterol inducida por los parásitos de *Leishmania*.

Con el objetivo de resumir los resultados y lo reportado en la literatura consultada se propone un modelo para explicar la cinética de expresión del gen RhoB durante la infección *in vitro* por *L. (V.) braziliensis*. En primer lugar, en el tiempo inicial de la infección (24 horas) el factor de virulencia GP63 hidroliza diferentes proteínas blanco en el macrófago como Dicer1 o mTOR lo que resulta en inhibición de la transcripción de mRNA mensajero de enzimas relacionadas con la biosíntesis del colesterol. En el tiempo tardío de la infección (48-96 horas) la inhibición de la farnesiltransferasa y la genaril-genaril transferasa 1 por la ausencia de sustrato (isoprenoides) induce la acetilación de histona asociada al promotor del gen RhoB induciendo la sobre expresión de este gen. Posteriormente, el estímulo inicial disminuye (GP63) y la expresión del gen RhoB se normaliza paulatinamente (Figura 6)

Es necesario resaltar que si el gen que codifica para la proteína RhoB es sobre expresado bajo el modelo mencionado, la proteína resultante correspondería a RhoB no isoprenilada, de acuerdo a los reportes de los trabajos con estatinas. esta versión de RhoB conservaría solo algunas de las funciones asociadas a la proteína.

Las consecuencias de la sobre-expresión de RhoB y su relación con el aumento de la carga parasitaria serán discutidas junto con los resultados de la evaluación de efecto del silenciamiento genético sobre el fenotipo de infección *in vitro* en las siguientes secciones.

8.2. Silenciamiento del gen *RhoB* y evaluación de la actividad de la proteína en células silenciadas.

Los resultados de la evaluación del silenciamiento genético de *RhoB* por *western blot* muestran diferentes grados de reducción de los niveles de las proteínas de interés dependiendo del shRNA y la MOI utilizada. Mediante el análisis de las señales obtenidas por densitometría se seleccionaron las líneas celulares con el mayor porcentaje de silenciamiento y con la menor MOI al momento de la transducción para tratar de reducir los efectos inespecíficos.

Para el proceso de silenciamiento se seleccionaron diferentes tipos de *shRNAs*: reportados por la literatura, diseñados por la herramienta de *RNAi designer* y diseñados con la aplicación *siSPOTR* que genera secuencias reduciendo la posibilidad de efectos *off target*. Los *shRNAs* diseñados mediante *RNAi designer* y los reportados en la literatura presentaron mayor porcentaje de silenciamiento, en todas las MOI utilizadas, respecto a los *shRNAs* diseñados por *siSPOTR* (tabla 1). Las diferencias en los resultados de los porcentajes de silenciamiento entre los dos tipos de shRNA podrían estar relacionadas con el reporte de los desarrolladores de la herramienta *siSPOTR*, los cuales mencionan que con el fin de ganar especificidad en el diseño de los shRNAs se disminuye la potencia de la secuencia generada. Se espera que 1 de cada 4 shRNAs diseñados por esta estrategia generen niveles de silenciamiento superiores al 70% (Boudreau, Spengler et al. 2013). De acuerdo a lo reportado la baja potencia del shRNA-*RhoB-Off2* puede considerarse un resultado esperado.

8.3. Evaluación del efecto de silenciamiento de *RhoB* sobre el fenotipo de infección.

El análisis del fenotipo de infección en términos de carga parasitaria y porcentaje de infección se realizó utilizando las líneas celulares expresando los *shRNAs* que generaron mayor silenciamiento con la MOI más baja para tratar de reducir los efectos *Off-target*. Las líneas celulares portando los shRNAs dirigidos contra *RhoB* presentaron una reducción del 70% en los niveles de proteína y como resultado de la evaluación funcional se obtuvo que estas líneas celulares presentan igualmente una reducción en la carga parasitaria y el porcentaje de infección respecto a la línea parental y el control negativo. Los resultados sugieren que el silenciamiento del gen *RhoB* podría ser la causa del cambio en el fenotipo de infección de las líneas celulares silenciadas.

Respecto al control negativo, en los análisis de *western blot* se halló que la expresión del shRNA-*scrambled* generó una ligera reducción de los niveles de

RhoB. Es posible que estos resultados sean el producto de efectos no específicos del silenciamiento que no dependen de la secuencia del *shRNA*. El uso de las diferentes MOI en los experimentos de transducción permitió detectar que la reducción en los niveles de las proteínas de interés en las líneas celulares expresando el *shRNA* control negativo era proporcional a la MOI utilizada. En la literatura se reporta que los efectos *off-target* tienen una naturaleza dependiente de la concentración (Persengiev, Zhu et al. 2004).

En la literatura consultada no se encontraron reportes en los que se evaluaran el papel específico de RhoB en la interacción macrófago-*Leishmania*. Si el cambio en el fenotipo de infección asociado con el silenciamiento del gen RhoB es específico, se podrían relacionar los resultados obtenidos con diferentes vías de señalización considerando las funciones de las GTPasas como RhoB,

En la literatura revisada se encontró que para el gen RhoA, que comparte cerca del 90 % de identidad con la secuencia del gen RhoB, se reporta que es necesaria para la fagocitosis de promastigotes de *L. donovani* opsonizados con suero (Lodge et al 2005). Los autores sugieren que RhoA es requerida en eventos de fagocitosis mediada por el receptor CR3 bajo condiciones de opsonización. Teniendo en cuenta la cercanía filogenética de esta proteína con RhoB, la localización celular de RhoB en la membrana plasmática y la participación de RhoB en la modificación de componentes del citoesqueleto para la formación de lamelipodios se podría sugerir que ésta GTPasa también podría intervenir en el proceso de fagocitosis de *L. braziliensis*, lo que es coherente con la reducción en la carga parasitaria y el porcentaje de infección asociada al silenciamiento de RhoB registrada en el presente trabajo.

La participación de RhoB en fagocitosis ha sido estudiada para otros patógenos intracelulares, se ha descrito que la activación de RhoB y Cdc42 es necesaria para la fagocitosis de *Pneumocystes* por macrófagos alveolares humanos a través del receptor de manosa (Zhang et. Al 2015). Este mismo mecanismo podría operar durante la fagocitosis de *Leishmania* teniendo en cuenta que el parásito utiliza este receptor para el ingreso al macrófago. Finalmente, se ha reportado que las GTPasas de la familia de IRG, proteínas cercanas a las GTPasas Rho, son necesarias para la eliminación de patógenos intracelulares como *Toxoplasma gondii* (Liesenfeld et. Al., 2011).

Sin embargo, teniendo en cuenta lo discutido respecto a los resultados de expresión del gen RhoB, se espera que la proteína RhoB que se acumule en la célula no esté isoprenilada. Esto afecta considerablemente la función de la proteína RhoB teniendo en cuenta que ya no estará ubicada en endosomas o membranas por ausencia de motivo isoprenoide que la direcciona a estos organelos.

En la literatura se reporta que la proteína RhoB inducida por efecto de inhibidores como las estatinas se acumula en el citoplasma y solo conserva algunas de sus características funcionales.(Von Zee, Richards et al. 2009). Se reporta como mayor efecto de la sobre-expresión de RhoB no preñada la disrupción del citoesqueleto de actina (Koike, Keino-Masu et al. 2009, Von Zee, Richards et al. 2009), lo cual podría afectar la respuesta del macrófago favoreciendo la infección.

Uno de los mecanismos del macrófago que se reporta como afectado por la disrupción del citoesqueleto de actina por medio de GTPasas de la familia RhoB es el retardo en la activación de la NADPH oxidasa (Rosales-Reyes, Skeldon et al. 2012), lo que podría favorecer la infección cuando RhoB está sobre-expresada. En el caso de los macrófagos con expresión de los shRNAs dirigidos contra RhoB no se registraría este efecto y el macrófago podría tener mejores posibilidades de combatir la infección.

8.4. Efectos *off-target*

Aunque en el desarrollo de los experimentos se incluyeron controles negativos no puede descartarse que los resultados encontrados sean producto de efectos inespecíficos (*off-target*) generados por el uso de shRNAs. Varios reportes sugieren que para demostrar que un fenotipo se relaciona con el silenciamiento de un gen no es suficiente mostrar que el shRNA control negativo falla en silenciar el gen de interés o en producir el mismo fenotipo celular que el shRNA específico (Semizarov, Frost et al. 2003), por lo cual es necesario considerar en el diseño experimental los efectos inespecíficos que esta metodología puede generar, según Fellmann y colaboradores los efectos *off-target* pueden clasificarse según su origen: 1) efectos *off-target* basados en similitud de la secuencia del shRNA con transcritos diferentes al de interés; 2) efectos relacionados con el procesamiento aberrante de miRNAs endógenos o desencadenados por edición no esperada del RNAi experimental y 3) perturbaciones generales de la célula debido a la abundante presencia de vectores y RNA exógenos (Fellmann and Lowe 2014).

En el presente proyecto se implementaron diferentes estrategias experimentales para minimizar los efectos *off-target* y determinar si el fenotipo obtenido era específico del silenciamiento:

- **Uso de varias secuencias de shRNAs.** El uso de diferentes secuencias contra el mismo gen, permite evaluar si el fenotipo obtenido se puede asociar al silenciamiento del gen. La hipótesis de esta estrategia es que si las diferentes secuencias específicas que silencian el gen brindan el mismo

fenotipo y el shRNA empleado como control negativo no presenta cambios en el suyo, es posible relacionar el silenciamiento del gen con el fenotipo obtenido.

En este estudio se usaron shRNAs dirigidos contra diferentes regiones del mRNA del gen: 3 shRNAs para el gen *RhoB*. Cada uno de ellos fue utilizado para generar líneas celulares independientes.

- **Diseño de los shRNAs.** Los shRNAs utilizados en este proyecto fueron diseñados por medio de dos herramientas: la primera de ellas, RNAi Designer (Invitrogen), está enfocada en el diseño de shRNAs potentes con base en la complementariedad de la región semilla (la unidad funcional de un RNA de interferencia, nucleótidos 2-8 de la hebra guía (Lai 2002, Jackson, Burchard et al. 2006, Guo, Ingolia et al. 2010, Boudreau, Spengler et al. 2013)) con el mRNA blanco de silenciamiento. El control realizado para evaluar posibles efectos *off-target* fue alineamiento usando la herramienta BLAST, aunque la utilidad de esta herramienta es discutida debido a que puede pasar por alto posibles candidatos de *off-target* de un shRNA (Yamada and Morishita 2005).

La segunda herramienta utilizada fue siSPOTR (*siRNA Sequence Probability-of-Off-Targeting Reduction*). Esta herramienta se basa en el algoritmo creado por Boudreau y colaboradores en el 2013 para el diseño de siRNA o shRNA altamente específicos. El algoritmo se desarrolló con base en estudios previos en donde se reportaban más de 50 ensayos de microarreglos en donde se evaluaban los efectos *off-target* de diferentes siRNAs. La idea de los investigadores fue desarrollar una herramienta que permitiera reducir la promiscuidad de la región semilla durante el diseño de los RNA interferentes con base en los reportes de microarreglos (Boudreau, Spengler et al. 2013). El principal rasgo del algoritmo es el cálculo de un score denominado POTS (*Probability of Off-target Score*) basado en el riesgo de complementariedad de la región semilla con otros blancos. Los autores definen un POTS ideal ≤ 50 para tener un shRNA específico y sugieren que la potencia de los *shRNAs* diseñados con esta herramienta no se ve tan afectada afirmando que 1 de cada 4 shRNA tendrá una efectividad en el silenciamiento superior al 70 % (Boudreau, Spengler et al. 2013). Teniendo en cuenta el tipo de diseño de los shRNA utilizado en este proyecto los shRNAs seleccionados se pueden clasificar en dos grupos: potentes y específicos.

Transducción utilizando diferentes MOIs en un rango bajo (MOI: 1, 5 10).

Con el fin de reducir los efectos *off-target* que no están basados en la secuencia, se definieron MOIs bajas para realizar la transducción celular. En el manual de la tecnología utilizada para generar el silenciamiento

(pLenti4/BLOCK-iT-DEST) se recomienda usar MOIs cercanas a 10 dado que una MOI baja ayuda a reducir la presencia de vectores y RNA exógenos que puedan alterar los procesos normales de la célula y resultar en cambios de fenotipo (Fellmann and Lowe 2014). De acuerdo a lo anterior se probaron las siguientes MOIs (1, 5 y 10) considerando además que dentro de la naturaleza de los efectos *off-target* se reporta que son dependientes de la concentración. Teniendo en cuenta lo anterior, si un fenotipo obtenido se da por efecto *off-target*, la magnitud del cambio debería reducirse conforme se reduce la MOI utilizada en la transducción lentiviral. En este estudio, la línea celular control negativo no presentó ningún cambio de fenotipo en ninguna de las MOI probadas.

9. CONCLUSIONES

Se encontró que el gen RhoB no presenta cambio en su expresión entre las 0 y las 24 horas después de la infección pero se sobre-expresa entre las 48 y 96 horas como se había registrado en microarreglos (72 horas post-infección).

La modulación positiva del gen coincide con el intervalo en el que aumenta la carga parasitaria *in vitro*, sugiriendo que los niveles de RhoB podrían ser importantes para el establecimiento de la infección.

Mediante la implementación del modelo celular previamente caracterizado por el grupo de investigación se logró generar una línea celular con reducción del 70 % de los niveles de RhoB y reducción de la cantidad de proteína RhoB activada.

La evaluación funcional usando shRNAs muestra que el silenciamiento de RhoB se asocia con reducción en la carga parasitaria y en el porcentaje de infección *in vitro* en los macrófagos derivados de U937.

Se propone un modelo para explicar la cinética de expresión del gen RhoB durante la infección *in vitro* por *L. (V.) braziliensis* (Figura 6). En primer lugar, en el tiempo inicial de la infección (0-24 horas) el factor de virulencia GP63 hidroliza diferentes proteínas blanco en el macrófago como Dicer1 o mTOR lo que resulta en inhibición de la biosíntesis del colesterol y de isoprenoides. En el tiempo tardío de la infección (48-96 horas) la inhibición de la farnesiltransferasa y la genarilgenaril transferasa 1 por la ausencia de sustrato induce la acetilación de histona asociada al promotor del gen RhoB induciendo la sobre-expresión de este gen. La sobre expresión del mRNA aumenta la cantidad de proteína RhoB no isoprenilada que se acumula en el citoplasma e induce la disrupción de F-actina, lo que resulta en inhibición de diferentes mecanismos para el control de la infección como el ensamblaje de la enzima NADH-oxidasa lo que favorece el establecimiento de la infección. Posteriormente, el estímulo inicial disminuye (GP63) y la expresión del gen RhoB se normaliza paulatinamente (Figura 2B). En el caso de las células con

expresión de los shRNAs, se bloquea la expresión de RhoB y los consecuentes efectos adversos favoreciendo el control de la infección como se evidencia en la reducción de la carga parasitaria y el porcentaje de infección.

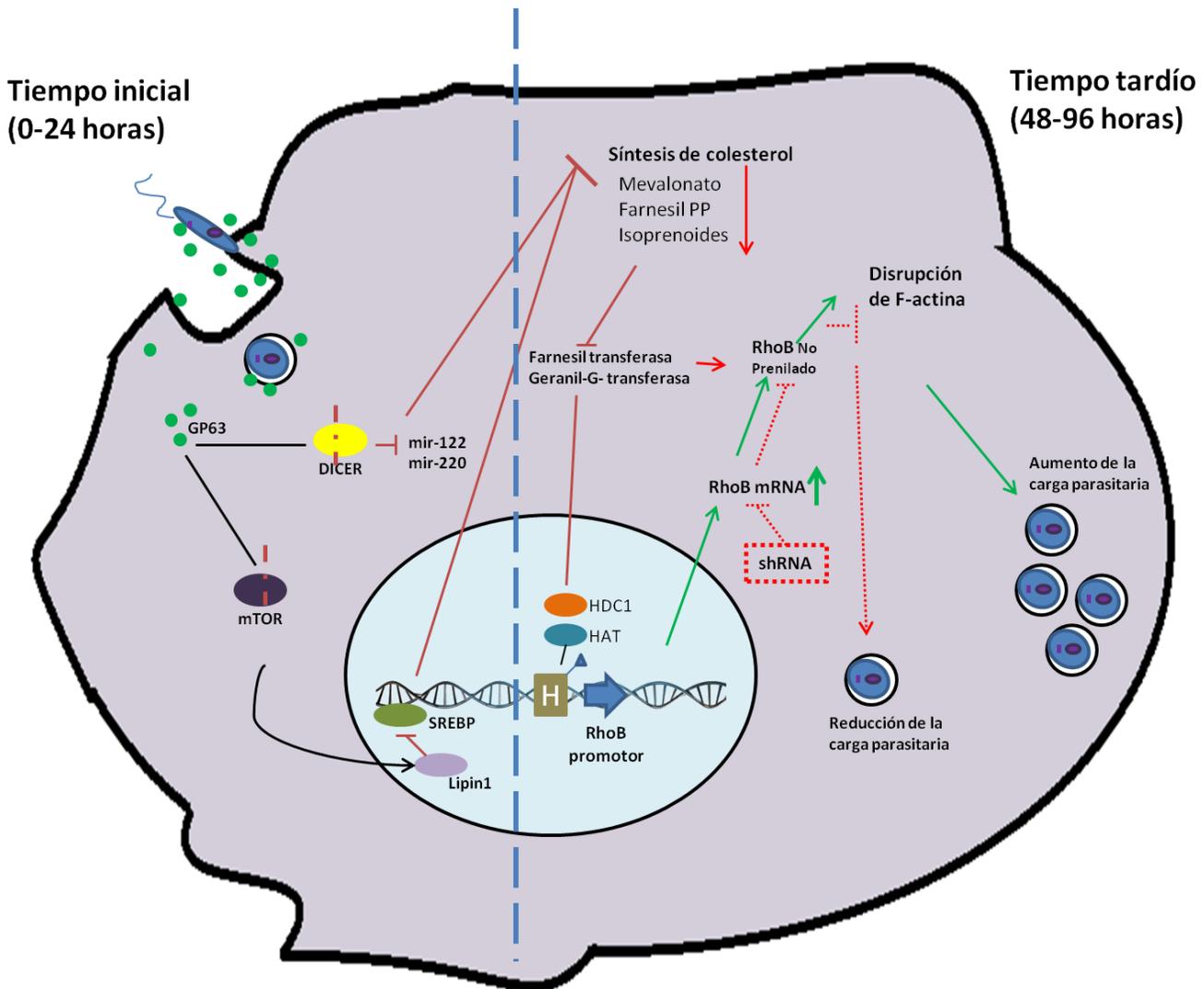


Figura 6. Modelo propuesto en el tiempo inicial de la infección (0-24 horas) el factor de virulencia GP63 hidroliza diferentes proteínas blanco en el macrófago como Dicer1 o mTOR lo que resulta en inhibición de la biosíntesis del colesterol y de isoprenoides. En el tiempo tardío de la infección (48-96 horas) la inhibición de la farnesiltransferasa y la geranyl-geranyl transferasa 1 por la ausencia de sustrato induce la acetilación de histona asociada al promotor del gen RhoB induciendo la sobre-expresión de este gen. La sobre expresión del mRNA aumenta la cantidad de proteína RhoB no isoprenilada que se acumula en el citoplasma e induce la disrupción de F-actina, lo que resulta en inhibición de diferentes mecanismos para el control de la infección como el ensamblaje de la enzima NADH-oxidasa lo que favorece el establecimiento de la infección. Posteriormente, el estímulo inicial disminuye (GP63) y la expresión del gen RhoB se normaliza paulatinamente (Figura 2B). En el caso de las células con expresión de los shRNAs, se bloquea la expresión de RhoB y los consecuentes efectos adversos favoreciendo el control de la infección como se evidencia en la reducción de la carga parasitaria y el porcentaje de infección.

10. RECOMENDACIONES

Los resultados encontrados en este trabajo sugieren la participación del gen RhoB en el establecimiento *in vitro* de la infección por *L. (V.) braziliensis*. Sin embargo es necesario confirmar las predicciones del modelo propuesto con el fin de darle mayor robustez a los mecanismos moleculares descritos teniendo en cuenta que el modelo incluyó resultados reportados por otros autores.

Algunas de las preguntas para plantear nuevos experimentos son las siguientes:

- ¿Cuál es la localización sub-celular de la proteína RhoB sobre-expresada durante la infección?

Según el modelo propuesto, la proteína RhoB sobre-expresada como consecuencia de la infección de *Leishmania* debe encontrarse no prenilada. Esta modificación post-traducciona afecta la distribución celular de RhoB. Es posible realizar un análisis de localización sub-celular de RhoB usando inmunocitoquímica para marcar a RhoB y a otros organelos de la célula para determinar su ubicación. También se podría realizar extracción de proteínas y Western blot de las fracciones solubles en la fase acuosa y las fracciones solubles en detergentes. De esta manera se podría cuantificar la cantidad de RhoB soluble (presente en el citoplasma) en comparación con la fracción no soluble (RhoB unida a membranas).

- ¿Es posible inducir la sobre-expresión de RhoB en los macrófagos sin infectar expuestos a factores difusibles del parásito (exosomas con GP63)

En el modelo se describe el factor de virulencia de *Leishmania* GP63 como el agente desencadenante de las alteraciones celulares que sufre el macrófago y que resultan en la sobre-expresión de RhoB. Si esta propuesta es acertada, se podría recapitular el efecto de la infección (sobre-expresión de RhoB) mediante la exposición de los macrófagos a medio acondicionado de cultivo de promastigotes de *Leishmania*. Este experimento fue realizado por Gregory y colaboradores en el 2008 quienes demostraron que GP63 altera factores de transcripción de la familia NF- κ B.

- ¿Es posible revertir el efecto de la infección por *Leishmania* sobre procesos transcripcionales y post-transcripcionales de RhoB mediante la adición de mevalonato o farnesil pirofosfato?

En el modelo se sugiere que el efecto de la infección sobre la expresión de RhoB es similar al efecto reportado para el tratamiento con estatinas. Una manera de

verificar este supuesto es evaluar si es posible revertir efecto de la infección por *Leishmania* sobre procesos transcripcionales y post-transcripcionales de RhoB mediante la adición de mevalonato o farnesil pirofosfato. Estos experimentos se han realizado en trabajos previos.

11. CONSIDERACIONES ÉTICAS, DE BIOSEGURIDAD Y RIESGO AMBIENTAL SEGÚN RESOLUCIÓN 8430 MINISTERIO DE SALUD.

Consideraciones sobre los procedimientos realizados durante la experimentación

El proyecto no incluyó experimentación con animales ni seres humanos. Tampoco se obtuvieron muestras de seres humanos o animales. Solamente se trabajó con líneas celulares y productos comerciales.

El presente proyecto se desarrolló de acuerdo a las instrucciones del manual de bioseguridad del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta. En cuanto a los experimentos que incluyeron la producción de virus, además de lo consignado en el manual, también se tomaron otras precauciones como programar con anterioridad todos los experimentos e informar a todo el personal de laboratorio las fechas en que se realizaron los experimentos, al igual que se señalizaron las áreas a utilizar con el símbolo de riesgo biológico.

En cuanto a la información generada como producto de la ejecución de este proyecto, ésta fue almacenada en el servidor de archivo del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta (SATURNO01) en una carpeta designada para el proyecto a la cual solo tenían acceso los investigadores del mismo. A los archivos se les realizó un *back up* cada semana según el protocolo el área de sistemas para la información depositada en SATURNO01.

Aspectos ambientales

El desarrollo de este proyecto implicó una serie de actividades que pueden contaminar el medio ambiente ya que incluyó el manejo de microorganismos y reactivos químicos. Desde la perspectiva del riesgo biológico, la manipulación de los microorganismos se realizó sistemáticamente en un espacio cerrado y en cámara de flujo laminar clase II. El CDFLLA cuenta y aplica los procedimientos de esterilización y manejo de residuos acorde con el decreto 2676 del año 2000 sobre la Gestión Integral de Residuos Hospitalarios y Similares, la resolución 1164 del 2002 sobre el Manual de Gestión de Residuos Hospitalarios y Similares y el decreto 4741 de 2005, por el cual se reglamenta el manejo de residuos o desechos peligrosos generados. De igual manera los reactivos empleados para las técnicas de biología molecular, se clasificaron y fueron etiquetados con las

convenciones requeridas para el manejo seguro, las cuales se obtuvieron a partir de las hojas de seguridad de cada reactivo. Adicionalmente, se alimentó la matriz ambiental del CDFLLA y se buscaron las hojas de seguridad de cada uno de los reactivos para contar con la información que contempla todo lo relacionado con los riesgos y medidas preventivas a tomar durante la manipulación del producto, en caso de accidente, las acciones de primeros auxilios, almacenamiento, lucha contra incendio, elementos de protección personal, rótulos de clasificación de peligrosidad, recomendaciones para adecuada manipulación, almacenamiento, transporte y disposición final de residuos al ambiente.

Declaración de no existencia de conflicto de interés

Los investigadores de este proyecto declararon no tener conflictos de intereses en el desarrollo de este trabajo de investigación, no estar involucrados como investigadores en ensayos clínicos en curso sobre el tema, no haber recibido donaciones o beneficios por parte de grupos interesados y no haber sido parte de grupos profesionales con conflictos de interés.

Propiedad intelectual

El grupo de investigadores respeta los principios sobre propiedad intelectual establecidos por el acuerdo No 35 de 2003 que expide el Reglamento de propiedad intelectual de la Universidad Nacional de Colombia que define la misma como un derecho complejo de dominio especial, sobre las creaciones. Se expresa del talento humano que se concede a los autores o parte de los mismos un principio de respeto y confidencialidad sobre los hallazgos científicos obtenidos por la presente investigación, así como por el apoyo dado por la Universidad generado por esta investigación y al apoyo de los estudiantes de posgrado, futuros investigadores, inventores y que a la vez permite a la sociedad hacer uso de sus creaciones.

12. FINANCIACIÓN

La financiación de este proyecto estuvo a cargo del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta – E.S.E., en el marco del proyecto 4000.16.1R, titulado: “Validación de los niveles de expresión de genes diferencialmente expresados en macrófagos infectados con *Leishmania (Viannia) braziliensis* que pueden ser potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de la Leishmaniasis”.

13.REFERENCIAS

- Akilov, O. E., R. E. Kasuboski, C. R. Carter and M. A. McDowell (2007). "The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis." J Leukoc Biol **81**(5): 1188-1196.
- Alexander, J., A. R. Satoskar and D. G. Russell (1999). "Leishmania species: models of intracellular parasitism." Journal of Cell Science **112**(18): 2993-3002.
- Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin and M. den Boer (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.
- Allen, D. D., R. Caviedes, A. M. Cárdenas, T. Shimahara, J. Segura-Aguilar and P. A. Caviedes (2005). "Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies." Drug development and industrial pharmacy **31**(8): 757-768.
- Arena, A., A. B. Capozza, D. Delfino and D. Iannello (1997). "Production of TNF alpha and interleukin 6 by differentiated U937 cells infected with Leishmania major." New Microbiol **20**(3): 233-240.
- Baek, Y. S., S. Haas, H. Hackstein, G. Bein, M. Hernandez-Santana, H. Lehrach, S. Sauer and H. Seitz (2009). "Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells." BMC Immunol **10**: 18.
- Bernardis, A. (2003). "GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila." Biochim Biophys Acta **1603**(2): 47-82.
- Biosciences, L.-C. (2013). "Normalization Accuracy for Western Blotting." 1-10.
- Boudreau, R. L., R. M. Spengler, R. H. Hylock, B. J. Kusenda, H. A. Davis, D. A. Eichmann and B. L. Davidson (2013). "siSPOTR: a tool for designing highly specific and potent siRNAs for human and mouse." Nucleic Acids Res **41**(1): e9.
- Bruhn, K. W., C. Marathe, A. C. Maretti-Mira, H. Nguyen, J. Haskell, T. A. Tran, V. Vanchinathan, U. Gaur, M. E. Wilson, P. Tontonoz and N. Craft (2010). "LXR deficiency confers increased protection against visceral Leishmania infection in mice." PLoS Negl Trop Dis **4**(11): e886.
- Buates, S. and G. Matlashewski (2001). "General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection." The Journal of Immunology **166**(5): 3416-3422.
- Cameron, P., A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G. H. Coombs, J. C. Mottram, J. Alexander and R. Plevin (2004). "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 **173**(5): 3297-3304.
- Canton, J., B. Ndjamen, K. Hatsuzawa and P. E. Kima (2012). "Disruption of the fusion of Leishmania parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection." Cellular Microbiology **14**(6): 937-948.
- Chau, C. H., C. A. Clavijo, H.-T. Deng, Q. Zhang, K.-J. Kim, Y. Qiu, A. D. Le and D. K. Ann (2005). "Etk/Bmx mediates expression of stress-induced adaptive genes VEGF, PAI-1, and iNOS via multiple signaling cascades in different cell systems." American Journal of Physiology-Cell Physiology **289**(2): C444-C454.
- Chaussabel, D., R. T. Semnani, M. A. McDowell, D. Sacks, A. Sher and T. B. Nutman (2003). "Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites." Blood **102**(2): 672-681.

- De Almeida, M., V. Vilhena, A. Barral and M. Barral-Netto (2003). "Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **98**(7): 861-870.
- Delarue, F., J. Adnane, B. Joshi, M. Blaskovich, D. Wang, J. Hawker, F. Bizouarn, J. Ohkanda, K. Zhu and A. Hamilton (2007). "Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors upregulate RhoB expression by HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter." Oncogene **26**(5): 633-640.
- Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan." The Journal of experimental medicine **185**(12): 2061-2068.
- Dey, R., N. Majumder, S. Bhattacharjee and S. Majumdar (2008). "A novel approach to regulate experimental visceral leishmaniasis in murine macrophages using CCR5 siRNA." Scandinavian journal of immunology **67**(4): 345-353.
- Dogra, N., C. Warburton and W. R. McMaster (2007). "Leishmania major abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective." Infect Immun **75**(7): 3506-3515.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." nature **411**(6836): 494-498.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.
- Fellmann, C. and S. W. Lowe (2014). "Stable RNA interference rules for silencing." Nat Cell Biol **16**(1): 10-18.
- Fire, A. (1999). "RNA-triggered gene silencing." Trends Genet **15**(9): 358-363.
- Flandin, J. F., F. Chano and A. Descoteaux (2006). "RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages." Eur J Immunol **36**(2): 411-420.
- Flannagan, R. S., V. Jaumouille and S. Grinstein (2012). "The cell biology of phagocytosis." Annu Rev Pathol **7**: 61-98.
- Galli-Taliadoros, L. A., J. D. Sedgwick, S. A. Wood and H. Korner (1995). "Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice." J Immunol Methods **181**(1): 1-15.
- Gamboa Marín, Y. A. and G. Delgado Murcia (2008). "Study of Leishmania Viannia infection by means of flow cytometry and Giemsa stain using human and murine macrophage lines (U-937 and J-774)." Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas **37**(1): 84-95.
- Gavicherla, B., L. Ritchey, A. Gianfelice, A. A. Kolokoltsov, R. A. Davey and K. Ireton (2010). "Critical role for the host GTPase-activating protein ARAP2 in InlB-mediated entry of Listeria monocytogenes." Infection and immunity **78**(11): 4532-4541.
- Ghosh, J., M. Bose, S. Roy and S. N. Bhattacharyya (2013). "Leishmania donovani targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection." Cell host & microbe **13**(3): 277-288.
- Girasol, A., G. G. Albuquerque, E. Mansour, E. P. Araujo, G. Degasperi, R. G. Denis, J. B. Carnevali, M. J. Saad and L. A. Velloso (2009). "Fyn mediates leptin actions in the thymus of rodents." PLoS One **4**(11): e7707.
- Goldston, A. M., R. R. Powell and L. A. Temesvari (2012). "Sink or swim: lipid rafts in parasite pathogenesis." Trends Parasitol **28**(10): 417-426.

- Goluszko, P. and B. Nowicki (2005). "Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells." Infect Immun **73**(12): 7791-7796.
- Gregory, D. J., R. Sladek and e. al. (2008). "Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression." Infect Immun **76**(3): 1186-1192.
- Guizani-Tabbane, L., K. Ben-Aissa, M. Belghith, A. Sassi and K. Dellagi (2004). "*Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis." Infect Immun **72**(5): 2582-2589.
- Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman and D. P. Bartel (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." Nature **466**(7308): 835-840.
- Gupta, P., J. Giri, S. Srivastav, A. G. Chande, R. Mukhopadhyaya, P. K. Das and A. Ukil (2014). "*Leishmania donovani* targets tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 3 for impairing TLR4-mediated host response." FASEB J.
- Ibraim, I. C., R. R. de Assis, N. L. Pessoa, M. A. Campos, M. N. Melo, S. J. Turco and R. P. Soares (2013). "Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages." Parasit Vectors **6**: 54.
- Jackson, A. L., J. Burchard, J. Schelter, B. N. Chau, M. Cleary, L. Lim and P. S. Linsley (2006). "Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity." RNA **12**(7): 1179-1187.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-269.
- Jayakumar, A., R. Widenmaier, X. Ma and M. A. McDowell (2008). "Transcriptional inhibition of interleukin-12 promoter activity in *Leishmania* spp.-infected macrophages." J Parasitol **94**(1): 84-93.
- Jeffery, I. B., D. G. Higgins and A. C. Culhane (2006). "Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data." BMC Bioinformatics **7**: 359.
- Karlsson, R., E. D. Pedersen, Z. Wang and C. Brakebusch (2009). "Rho GTPase function in tumorigenesis." Biochim Biophys Acta **1796**(2): 91-98.
- Kedzierski, L., A. Sakthianandeswaren, J. M. Curtis, P. C. Andrews, P. C. Junk and K. Kedzierska (2009). "Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines." Curr Med Chem **16**(5): 599-614.
- Killick-Kendrick, R. (1989). "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 **65**: 37-42.
- Koike, S., K. Keino-Masu, T. Ohto, F. Sugiyama, S. Takahashi and M. Masu (2009). "Autotaxin/lysophospholipase D-mediated lysophosphatidic acid signaling is required to form distinctive large lysosomes in the visceral endoderm cells of the mouse yolk sac." J Biol Chem **284**(48): 33561-33570.
- Kulkarni, M. M., J. Barbi, W. R. McMaster, R. L. Gallo, A. R. Satoskar and B. S. McGwire (2011). "Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection." Cell Microbiol **13**(6): 913-923.
- Kumakiri, J., S. Oda, K. Kinoshita and S. Miyazaki (2003). "Involvement of Rho family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by *Clostridium difficile* toxin B." Dev Biol **260**(2): 522-535.

- Lai, E. C. (2002). "Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation." Nat Genet **30**(4): 363-364.
- Lemaire, J., G. Mkannez, F. Z. Guerfali, C. Gustin, H. Attia, R. M. Sghaier, K. Dellagi, D. Laouini and P. Renard (2013). "MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection." PLoS Negl Trop Dis **7**(10): e2478.
- Liesenfeld, O., I. Parvanova, J. Zerrahn, S. J. Han, F. Heinrich, M. Munoz, F. Kaiser, T. Aebischer, T. Buch, A. Waisman, G. Reichmann, O. Utermohlen, E. von Stebut, F. D. von Loewenich, C. Bogdan, S. Specht, M. Saftel, A. Hoerauf, M. M. Mota, S. Konen-Waisman, S. H. Kaufmann and J. C. Howard (2011). "The IFN-gamma-inducible GTPase, Irga6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens." PLoS One **6**(6): e20568.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method." methods **25**(4): 402-408.
- Lodge, R. and A. Descoteaux (2005). "*Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42." Cellular microbiology **7**(11): 1647-1658.
- Maia, C., N. Rolao, M. Nunes, L. Goncalves and L. Campino (2007). "Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*." Acta Trop **103**(2): 150-155.
- Majumder, S., R. Dey, S. Bhattacharjee, A. Rub, G. Gupta, S. Bhattacharyya Majumdar, B. Saha and S. Majumdar (2012). "*Leishmania*-induced biphasic ceramide generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite." J Infect Dis **205**(10): 1607-1616.
- Majumder, S., R. Dey, S. Bhattacharjee, A. Rub, G. Gupta, S. B. Majumdar, B. Saha and S. Majumdar (2012). "*Leishmania*-Induced Biphasic Ceramide Generation in Macrophages Is Crucial for Uptake and Survival of the Parasite." Journal of Infectious Diseases **205**(10): 1607-1616.
- Martin, S. E. and N. J. Caplen (2007). "Applications of RNA interference in mammalian systems." Annu Rev Genomics Hum Genet **8**: 81-108.
- Monferran, S., N. Skuli, C. Delmas, G. Favre, J. Bonnet, E. Cohen-Jonathan-Moyal and C. Toulas (2008). "Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB." Int J Cancer **123**(2): 357-364.
- Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "*Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages." Frontiers in cellular and infection microbiology **2**.
- Olivier, M., D. J. Gregory and G. Forget (2005). "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view." Clin Microbiol Rev **18**(2): 293-305.
- Olofsson, B. (1999). "Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling." Cell Signal **11**(8): 545-554.
- Organization, W. H. (2010). "Control of the leishmaniasis." World Health Organization technical report series(949): xii.
- Osorio y Fortea, J., E. de La Llave, B. Regnault, J. Y. Coppee, G. Milon, T. Lang and E. Prina (2009). "Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes." BMC Genomics **10**: 119.
- Ovalle-Bracho, C., C. Franco-Munoz, D. Londono-Barbosa, D. Restrepo-Montoya and C. Clavijo-Ramirez (2015). "Changes in Macrophage Gene Expression Associated with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Infection." PLoS One **10**(6): e0128934.

- Ovalle-Bracho, C., D. A. Londono-Barbosa, C. Franco-Munoz and C. Clavijo-Ramirez (2015). "Functional evaluation of gene silencing on macrophages derived from U937 cells using interference RNA (shRNA) in a model of macrophages infected with Leishmania (Viannia) braziliensis." Parasitology: 1-11.
- PAHO (2013). Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas, Pan American Health Organization.
- Persengiev, S. P., X. Zhu and M. R. Green (2004). "Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)." Rna **10**(1): 12-18.
- Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck and D. M. Sabatini (2011). "mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway." Cell **146**(3): 408-420.
- Pucadyil, T. J., P. Tewary, R. Madhubala and A. Chattopadhyay (2004). "Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: implications in leishmaniasis." Molecular and Biochemical Parasitology **133**(2): 145-152.
- Rabhi, I., S. Rabhi, R. Ben-Othman, A. Rasche, A. Daskalaki, B. Trentin, D. Piquemal, B. Regnault, A. Descoteaux and L. Guizani-Tabbane (2012). "Transcriptomic Signature of Leishmania Infected Mice Macrophages: A Metabolic Point of View." PLoS neglected tropical diseases **6**(8): e1763.
- Ramirez, C., Y. Diaz-Toro, J. Tellez, T. M. Castilho, R. Rojas, N. A. Ettinger, I. Tikhonova, N. D. Alexander, L. Valderrama, J. Hager, M. E. Wilson, A. Lin, H. Zhao, N. G. Saravia and D. McMahon-Pratt (2012). "Human macrophage response to L. (Viannia) panamensis: microarray evidence for an early inflammatory response." PLoS Negl Trop Dis **6**(10): e1866.
- Rey, J. A., B. L. Travi, A. Z. Valencia and N. G. Saravia (1990). "Infectivity of the subspecies of the Leishmania braziliensis complex in vivo and in vitro." Am J Trop Med Hyg **43**(6): 623-631.
- Rosales-Reyes, R., A. M. Skeldon, D. F. Aubert and M. A. Valvano (2012). "The Type VI secretion system of Burkholderia cenocepacia affects multiple Rho family GTPases disrupting the actin cytoskeleton and the assembly of NADPH oxidase complex in macrophages." Cellular microbiology **14**(2): 255-273.
- Rub, A., R. Dey, M. Jadhav, R. Kamat, S. Chakkaramakkil, S. Majumdar, R. Mukhopadhyaya and B. Saha (2009). "Cholesterol depletion associated with Leishmania major infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function." Nature immunology **10**(3): 273-280.
- Salahpour, A., I. O. Medvedev, J. M. Beaulieu, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2007). "Local knockdown of genes in the brain using small interfering RNA: a phenotypic comparison with knockout animals." Biol Psychiatry **61**(1): 65-69.
- Sato, N., S. K. Ahuja, M. Quinones, V. KostECKI, R. L. Reddick, P. C. Melby, W. A. Kuziel and S. S. Ahuja (2000). "CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation." J Exp Med **192**(2): 205-218.
- Satoskar, A., H. Bluethmann and J. Alexander (1995). "Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during Leishmania mexicana infection but

does not increase control of *Leishmania donovani* infection." Infect Immun **63**(12): 4894-4899.

- Schariton, T. M. and P. Scott (1993). "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 **178**(2): 567-577.
- Schmidt, A. and A. Hall (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." Genes Dev **16**(13): 1587-1609.
- SIVIGILA 2002-2005, -.
- Srivastav, S., S. Kar, A. G. Chande, R. Mukhopadhyaya and P. K. Das (2012). "*Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response." J Immunol **189**(2): 924-934.
- Srivastava, N., R. Sudan and B. Saha (2011). "CD40-modulated dual-specificity phosphatases MAPK phosphatase (MKP)-1 and MKP-3 reciprocally regulate *Leishmania major* infection." J Immunol **186**(10): 5863-5872.
- Stamatakis, K., E. Cernuda-Morollon, O. Hernandez-Perera and D. Perez-Sala (2002). "Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway." J Biol Chem **277**(51): 49389-49396.
- Stenger, S., H. Thuring, M. Rollinghoff and C. Bogdan (1994). "Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*." J Exp Med **180**(3): 783-793.
- Turner, S. J., S. Zhuang, T. Zhang, G. R. Boss and R. B. Pilz (2008). "Effects of lovastatin on Rho isoform expression, activity, and association with guanine nucleotide dissociation inhibitors." Biochem Pharmacol **75**(2): 405-413.
- Ueno, N. and M. E. Wilson (2012). "Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival." Trends Parasitol **28**(8): 335-344.
- Vega, F. M. and A. J. Ridley (2008). "Rho GTPases in cancer cell biology." FEBS Lett **582**(14): 2093-2101.
- Von Zee, C. L., M. P. Richards, P. Bu, J. I. Perlman and E. B. Stubbs, Jr. (2009). "Increased RhoA and RhoB protein accumulation in cultured human trabecular meshwork cells by lovastatin." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(6): 2816-2823.
- Wang, X. H., Y. Wang, F. Diao and J. Lu (2013). "RhoB is involved in lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse in vivo and in vitro." Journal of physiology and biochemistry **69**(2): 189-197.
- Wheeler, A. P. and A. J. Ridley (2004). "Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility." Exp Cell Res **301**(1): 43-49.
- Yamada, T. and S. Morishita (2005). "Accelerated off-target search algorithm for siRNA." Bioinformatics **21**(8): 1316-1324.
- Zhang, J., J. Zhu, X. Bu, M. Cushion, T. B. Kinane, H. Avraham and H. Koziel (2005). "Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages." Mol Biol Cell **16**(2): 824-834.
- Zhang, S., C. C. Kim, S. Batra, J. H. McKerrow and P. Loke (2010). "Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines." PLoS Negl Trop Dis **4**(3): e648.
- Zhang, S., C. C. Kim, S. Batra, J. H. McKerrow and P. n. Loke (2010). "Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines." PLoS neglected tropical diseases **4**(3): e648.

ANEXOS

Estandarización de la inmunodetección de RhoB

Para evaluar el silenciamiento del gen *RhoB* se estandarizó la inmuno-detección de los niveles de esta proteína por *western blot*, empleando como control positivo la línea celular HeLa. Como resultado se obtuvo la inmuno-detección de dos bandas para la línea celular HeLa: una de 25 kDa y una de 50 kDa como era esperado; y en el caso de los macrófagos derivados de las células U937 se identificó una banda de 37 kDa.

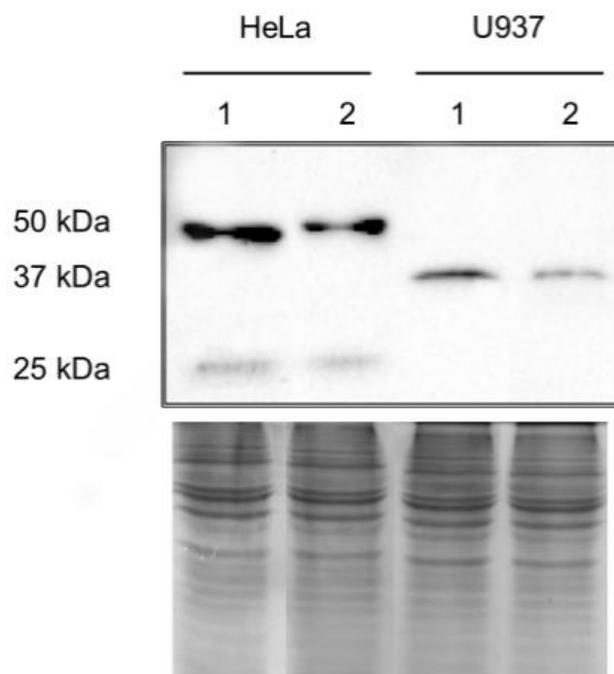


Figura S1. Inmuno-detección de la proteína RhoB en macrófagos derivados de la línea celular U937, empleando HeLa como control positivo.

Con las líneas celulares transducidas con vectores lentivirales conteniendo constructos para la expresión de shRNAs dirigidos contra el gen *RhoB* y las condiciones estandarizadas para la inmuno-detección de RhoB, se procedió a determinar los niveles de proteína en las líneas transducidas. Se empleó como control de silenciamiento célula transducidas con un shRNA *scrambled*.